Značajke neuroinflamacije tijekom kronične intermitentne hipoksije na mišjem modelu opstruktivne apneje spavanja

Polšek, Dora

Doctoral thesis / Disertacija

2017

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:105:474270

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Dora Polšek

Značajke neuroinflamacije tijekom kronične intermitentne hipoksije na mišjem modelu opstruktivne apneje spavanja

DISERTACIJA

Zagreb, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Dora Polšek

Značajke neuroinflamacije tijekom kronične intermitentne hipoksije na mišjem modelu opstruktivne apneje spavanja

DISERTACIJA

Zagreb, 2017.

Disertacija je izrađena na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga u Laboratoriju za neurogenetiku i razvojnu genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i na Institutu za psihologiju, psihijatriju i neuroznanost, Odsjeku za neurooslikavanje, King's College London, London, Velika Britanija.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Srećko Gajović

Suvoditeljica rada: dr. sc. Ivana Rosenzweig

Koračajmo veselo kroz prostor u prostor,
Ne prionimo ni jednom kao zavičaju,
Duh svijeta neće da nas okuje i stijesni.

Herman Hesse, Igra staklenih perli

Izrada ovog doktorata bila je put učenja i sazrijevanja, ne samo stručnog već i osobnog. Na njemu su me stalno podržavali moji mentori prof. dr.sc Srećko Gajović i dr. sc. Ivana Rosenzweig, moja obitelj i prijatelji. Hvala Vam!

Pokusi opisani u ovoj disertaciji ne bi bili mogući bez znanja, truda i upornosti mojih kolega.

Marcell Bagó bio je nezamijenjiv pri izradi hipoksične komore. Zahvalila bih se njemu i cijelom timu sa Instituta Semmelweis u Budimpešti koji su me podržali na samom početku mog doktorata: Zsombor Lacza, Horváthy Dénes, Gyula Németh, Károly Péter Balázs, Márton Németh, István Hornyák, Gabriella Vácz, Julliana Komcsák.

Zahvalila bih se Neuroimaging timu s King's College London: Diani Cash, Camilli Simmons i Mattii Veronese. Unaprijedili su moje imunohistokemijske metode, naučili me stereološku kvantifikaciju te me uveli u problematiku post-procesiranja MRI slika.

Za kraj zahvalila bih se svim svojim kolegama s Hrvatskog instituta za istraživanje mozga i šire koji su svaki za sebe odigrali kritičnu ulogu u nekom trenutku procesa svojom podrškom i savjetima: Siniši Škokiću, Mariji Živaljić, Olji Ulični, Marini Radmilović, Vilmi Dembitz, Dunji Gorup, Ivanu Aliću, Marti Skelin, Mariji Renić, Marti Balog, Sandri Grgić, Željki Punčec, Nataši Kuretić, Valentini Ban Lugarić, Ani Bosak, Dariu Barbariću i timu SMC Industrijske Automatike, Rafaeli Vukasović te iskusnijim kolegama Mariji Ćurlin, Dinku Mitrečiću, Zdravku Petanjeku, Željki Krsnik, Dori Višnjić i Mariji Heffer.

SADRŽAJ

1 UVOD ... 1

1.1 Opstruktivna apneja spavanja ... 1

1.1.1 Dijagnostika i epidemiologija ... 2

1.1.2 Komorbiditeti ... 2

1.1.3 Opstruktivna apneja spavanja i Alzheimerova bolest ... 4

1.1.4 Neurokognitivni poremećaji u pacijenata s opstruktivnom apnejom spavanja ... 4

1.1.5 Oslikavanje mozga u pacijenata s opstruktivnom apnejom spavanja ... 6

1.1.6 Reverzibilnost simptoma opstruktivne apneje spavanja terapijom kontinuiranim pozitivnim tlakom u dišnom putu ... 7

1.2 Osnovne značajke upalnog odgovora mozga ... 8

1.2.1 Uloga mikroglije u upalnom odgovoru mozga ... 9

1.2.2 Neurogena neuroinflamacija ... 11

1.2.3 Uloga astrocita u upalnom odgovoru mozga ... 11

1.3 Receptori nalik na Toll ... 12

1.3.1 Signalni put TLR2 ... 13

1.3.2 TLR2 u neurološkim bolestima ... 14

1.4 Pretklinički modeli intermitentne hipoksije za procjenu upalnog odgovora mozga ... 16

1.4.1 Modeli u upotrebi ... 16

1.4.2 Intermitentna hipoksija ... 17

1.4.3 Saznanja o razvoju i značajkama upalnog odgovora mozga u modelu intermitentne hipoksije ... 18

1.5 Bioluminiscentno oslikavanje ... 19

1.5.1 Prednosti longitudinalnog *in vivo* praćenja ... 19

1.5.2 Principi snimanja bioluminiscencije ... 20

1.5.3 Prednosti i nedostaci snimanja bioluminiscencije u usporedbi s fluorescencijom ... 21

1.5.4 Mišji model korišten za snimanje bioluminiscencije ... 23

2 HIPOTEZA ... 25

3 CILJEVI RADA ... 25

4 MATERIJALI I METODE ... 26

4.1 Pregled metoda korištenih u disertaciji ... 26

4.2 Pokusne životinje ... 26

4.2.1 Usklađenost s etičkim smjernicama i zakonskim propisima ... 26

4.2.2 Mišje linije ... 27

4.2.3 Brojevi životinja korištenih u istraživanju 28
4.2.4 Plan pokusa 29
4.2.5 Genotipizacija miševa 30
4.3 Protokol izlaganja intermitentnoj hipoksiji 31
4.4 Određivanje težine životinja 32
4.5 Snimanje bioluminiscencije 32
4.5.1 *In vivo* snimanje bioluminiscencije 32
4.5.2 Vremenske točke oslikavanja 32
4.5.3 Administracija luciferina 33
4.5.4 Anestezija pri oslikavanju 33
4.5.5 Protokol oslikavanja 34
4.5.6 Izračun signala bioluminiscentnog *in vivo* oslikavanja 34
4.6 3D rekonstrukcija bioluminiscentnog in vivo oslikavanja 35
4.7 *Ex vivo* snimanje bioluminiscencije 36
4.8 Oslikavanje ex vivo in toto 36
4.8.1 Oslikavanje *ex vivo* rezova mozga 37
4.9 Testovi ponašanja miševa 37
4.10 Test visenja na repu 38
4.10.1 Test otvorenog polja 39
4.10.2 Test Y-labirinta 40
4.10.3 Obrada testova ponašanja AnyMaze programom 41
4.11 MRI oslikavanje 42
4.12 MRI analiza 43
4.13 Histološka analiza mišjih mozgova 45
4.13.1 Žrtvovanje životinja i izolacija mozga 45
4.13.2 Priprema histoloških rezova 45
4.14 Imunohistokemijsko bojenje 45
4.14.1 Digitalizacija uzoraka bojenih imunohistokemijom 47
4.15 Stereološka kvantifikacija Iba1 te c-Fos bojanja 48
4.16 Kvantifikacije GFAP bojanja 50
4.17 Bojenje po Nisslu 52
4.18 Izrada korelacijskih matrica 52
4.19 Statistička analiza 53

5 REZULTATI 55
5.1 Brz, precizan i podesiv životinjski model intermitentne hipoksije 55
5.2 TLR2 je pojačano eksprimiran u mozgu nakon intermitentne hipoksije 60
5.3 Lokalizacija ekspresije TLR2 signala 63
5.4 Bioluminiscentni signal primarno dolazi iz stanica mikroglije 67
5.5 Intermitentna hipoksija uzrokuje značajni pad tjelesne težine 68
5.6 IH ne remeti sposobnost prostornog pamćenja 71
5.7 IH ne mijenja ponašanje životinja u otvorenom polju 75
5.8 IH skraćuje vrijeme mirovanja u testu visenja na repu u životinja s funkcionalnim TLR2 genom 78
5.9 Broj apoptoza neurona u podregijama hipokampusa je veći u miševa izloženih IH 79
5.10 Broj stanica mikroglije ne mijenja se tijekom intermitentne hipoksiji ni ne ovisi o TLR2 genu 80
5.11 Površina prekrivena astrocitima ne mijenja se izlaganjem intermitentnoj hipoksiji niti ovisi o TLR2 genu 85
5.12 Broj cFos pozitivnih stanica ne mijenja se izlaganjem intermitentnoj hipoksiji niti ovisi o TLR2 genu 87
5.13 IH uzrokuje strukturne promjene mozga vidljive MRI- jem 89
5.13.1 Manjak TLR2 gena utječe na veći ukupni volumen mozga 89
5.13.2 Promjene u volumenu struktura mozga nakon intermitentne hipoksije izraženije su u miševa s TLR2 genom 90
5.13.3 Mozgovi TLR2 CTRL i $TLR2^{-/-}$ CTRL skupine strukturno se razlikuju 98
5.14 Korelacijski odnosi MRI regija interesa 99
5.15 Korelacijski odnosi histoloških nalaza, ponašanja te MRI regija analiziranih histologijom 102
6 RASPRAVA 105
6.1 Novi sustav za induciranje intermitentne hipoksije ima značajne prednosti nad postojećim sustavima 105
6.2 Intermitentna hipoksija uzrokuje povećanu ekspresiju TLR2 vidljivu bioluminiscentim oslikavanjem 106
6.3 TLR2 signal zabilježen bioluminiscentnim oslikavanjem mjera je aktivnosti mikroglije 108
6.4 $TLR2^{-/-}$ miševi teže kompenziraju pad tjelesne težine nakon izlaganja IH 109
6.5 IH uzrokuje apoptozu neurona hipokampusa 110
6.6 Sposobnost za prostorno pamćenje u Y-labirintu nije narušeno nakon izlaganja IH ... 111

6.7 Ponašanje životinja u otvorenom polju nije promijenjeno nakon izlaganja IH 111
6.8 Test visenja na repu upućuje na hipereksciticaciju nakon izlaganja IH 112
6.9 Broj stanica mikroglije nije promijenjen u regijama interesa nakon izlaganja IH 114
6.10 Površina prekrivena astrocitima nije promijenjena nakon izlaganja IH 115
6.11 Broj c-Fos pozitivnih stanica nije promijenjen nakon izlaganja IH 117
6.12 Magnetskom rezonancom zabilježene su promjene struktura mozga nakon izlaganja intermitentnoj hipoksiji 117
6.12.1 Statistička metodologija korištena u obradi MRI podataka 117
6.13 Hipertrofija hipokampusa nakon izlaganja IH u TLR2 IH skupini 120
6.14 Interpretacija strukturnih razlika između TLR2 IH te TLR2$^{-/-}$ IH skupina 123
6.15 Utjecaj kronične intermitentne hipoksije na razvoj i značajke upalnog odgovora mozga 125
7 ZAKLJUČCI 127
7.1 Novo-razvijeni sustav za induciranje intermitentne hipoksije precizan je i učinkovit model opstruktivne apneje spavanja 127
7.2 Intermitentna hipoksija uzrokuje strukturne promjene mozga 127
7.3 Strukturne promjene uzrokovane intermitentnom hipoksijom manje su izražene u životinja bez Tlr2 gena 127
7.4 Intermitentna hipoksija uzrokuje ograničene funkcionalne promjene mozga 128
7.5 Receptori TLR2 sudjeluju u akutnom i kroničnom odgovoru mozga na intermitentnu hipoksiju 128
7.6 Intermitentna hipoksija uzrokuje apoptozu neurona u CA1, CA3 i DG regiji hipokampusa 128
7.7 Strukturne promjene uzrokovane intermitentnom hipoksijom nisu popraćene proliferacijom mikroglije i astrocita 128
8 SAŽETAK 129
9 SUMMARY 130
10 POPIS LITERATURE 131
11 ŽIVOTOPIS 146

KRATICE

Aβ	amiloid β
ANT	*engl. advanced normalization tools* - alati za napredno normaliziranje
ATP	adenozin-trifosfat
BBB	*engl. blood brain barrier* – krvno-moždana barijera
BDNF	*engl. brain-derived growth factor* - moždani neurotrofni čimbenik
BLI	*engl. bioluminescent imaging* - bioluminiscentno oslikavanje
CA1	*Cornu ammonis 1*
CA3	*Cornu ammonis 3*
CCD	*engl. charge- coupled device* - nabojem spregnuti sklop
CNS	*engl. central nervous system* – središnji živčani sustav
COX	ciklooksigenaza
CPAP	*engl. continuous positive airway pressure* – kontinuirani pozitivni tlak u dišnom putu
CSF	*engl. cerebrospinal fluid* – cerebrospinalni likvor
DAMP	*engl. damage associated molecular patterns* – molekularni obrasci povezani s oštećenjem
DLIT	*engl. diffuse light imaging tomography* - tomografija oslikavanja difuznom svjetlosti
DG	dentatni girus
EEG	elektroencefalogram
FGF2	*engl. fibroblast growth factor 2* - čimbenik rasta fibroblasta 2
fMRI	*engl. functional magnetic resonance imaging* – funkcionalno oslikavanje magnetskom rezonancom
GFAP	*engl. glial fibrillary acid protein* - glijalni fibrilarni kiseli protein
GFP	*engl. green fluorescent protein* - zeleni fluorescentni protein

HIF α	*engl. hypoxia inducible factor α* - čimbenik induciran hipoksijom α
HSP	*engl. heat shock proteins* - proteinini toplinskog šoka
IGF-1	*engl. insulin like growth factor* - čimbenik rasta nalik na inzulin
IH	intermitentna hipoksija
IL	interleukin
IP	ishemično prekondicioniranje
IRES	*engl. internal ribosome entry site* – unutrašnje ribosomalno mjesto ulaza
IVIS	*engl. in vivo imaging system* - sustav za oslikavanje *in vivo*
LPS	lipopolisaharid
MAL/TIRAP	*engl. MyD88-adaptor-like/TIR-associated proteins* - bjelančevine nalik na MyD88-adaptor povezane s Toll/ interleukin-1-receptorom
MHC	*engl. major histocompatibility complex* - glavni kompleks tkivne podudarnosti
MRI	*engl. magnetic resonance imaging* – oslikavanje magnetskom rezonancom
MMSE	*engl. mini mental state examination* – mini-test kognitivnih funkcija
MyD88	*engl. myeloid differentiation factor 88* - mijeloidni čimbenik diferencijacije 88
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat
NF-κB	*engl. nuclear factor-κB* - nuklearni čimbenik-κB
NMDA	*N*-metil-D-aspartat
NREM	*engl. non- rapid eye movement*- bez brzog kretanja očiju
OB	olfaktorni bulbus
OSA	*engl. obstructive sleep apnea* - opstruktivna apneja spavanja
PAMP	*engl. pathogen associated molecular patterns*- molekularni obrasci povezani s patogenima
PBS	*engl. phosphate bufferd saline* – fosfatni pufer
PCNA	*engl. proliferating cell nuclear antigen* - proliferirajući antigen stanične jezgre

PCR	*engl. polymerase chain reaction* - lančane reakcije polimeraze
RAGE	*engl. receptor for advanced glycation* - receptori za krajnje produkte uznapredovale glikacije
REM	*engl. rapid eye movement* – brzo kretanje očiju
RNS	*engl. reactive nitrogen species* – slobodni radikali dušika
ROS	*engl. reactive oxygen species* - slobodni radikali kisika
TBS	*engl. tris buffered saline* – tris-pufer
TLR	*engl. Toll like receptors* – receptori nalik na Toll
TFCE	*engl. threshold free cluster enhancement* - klasteri bez unaprijed zadanog praga
TNF-α	*engl. tumor necrosis factor α* - tumorski čimbenik nekroze α
TRAM	*engl. Toll-receptor-associated molecule* -molekula povezana s Toll-receptorom
TRIF	*engl. Toll-receptor-associated activator of interferons* - aktivator interferona povezan s Toll-receptorom
VBM	*engl. voxel based morphometry* - morformetrija temeljena na vokselima

1 UVOD

1.1 Opstruktivna apneja spavanja

Termin apneja odnosi se na potpuni prestanak disanja dulji od 10 sekundi (1). Apneja spavanja pojavljuje se u trima oblicima: središnja, opstruktivna te s objema komponentama, odnosno mješovita. U središnjoj apneji spavanja radi se o poremećaju povratnih mehanizama u respiratornim centrima ventrolateralne produžene moždine, koji rezultira smanjenjem ili potpunim gubitkom poticaja na disanje tijekom sna (1). Opstruktivna apneja spavanja (OSA - *engl. obstructive sleep apnea)* je najčešći oblik apneje spavanja, a karakterizirana je repetitivnim epizodama opstrukcije gornjeg dišnog puta koje se pojavljuju tijekom spavanja, obično popraćene padom saturacije kisika u krvi (1).

U opstruktivnoj apneji spavanja dolazi do periodičke opstrukcije gornjeg dišnog puta koja rezultira intermitentnom hipoksijom, hiperkapnijom te povećanim naporom pri disanju. Opstrukcija nastaje zbog smanjenog tonusa mišića ždrijela, prekomjernog nakupljanja mekog tkiva na vratu zbog pretilosti ili anatomskih predispozicija kao što su hiperglosija, hipertrofija tonzila ili preduga uvula. Do ovih poremećaja dolazi spontano prirodnim procesom starenja, zbog prethodnog moždanog udara ili druge neurološke bolesti, te zbog nezdravog životnog stila, prekomjernog konzumiranja alkohola ili cigareta prije spavanja (2).

Uz intermitentnu hipoksiju, druga glavna značajka opstruktivne apneje spavanja je fragmentacija sna te promjena arhitekture spavanja, sa promjenom udjela različitih faza nREM-a (engl. *non- rapid eye movement*) i skraćivanjem REM- faze (*engl. rapid eye movement*) u ukupnom noćnom elektroencefalogramu (EEG) (3). Poznato je da san utječe na molekularnu regulaciju sinapsa, ekspresiju gena vezanu za plastičnost neurona, te translaciju proteina (4). Također, klinička istraživanja pokazuju kako niža oksigenacija tijekom noći i kraće sporovalno spavanje mogu biti povezani s mikroinfarktima te atrofijom mozga (5).

1.1.1 Dijagnostika i epidemiologija

Opstruktivna apneja spavanja dijagnosticira se polisomnografijom, kontinuiranim cjelonoćnim snimanjem EEG-a, EKG-a, frekvencije disanja, saturacije krvi kisikom, krvnog tlaka i pokreta tijela, koja omogućuje određivane broja apneja i hipopneja unutar jednog sata spavanja. Uz apneju, koja je definirana kao potpuni prestanak disanja trajanja duljeg od 10 s, hipopneja je definirana kao smanjenje amplitude disanja za 50% ili više u trajanju duljem od 10 s. Indeks apneja- hipopneja je broj epizoda unutar jednog sata, a koristi se za dijagnostiku i procjenu težine bolesti gdje je AHI < 5 smatran normalnim nalazom, AHI između 6 i 15 kategorizira se u blagu OSA-u, 15- 30 epizoda po satu smatra se srednje teškom OSA-om dok je AHI iznad 30 znak teške OSA-e (1).

Opstruktivna apneja spavanja bitan je javnozdravstveni problem jer je prevalencija OSA-e vrlo visoka a bolest ima kroničan progresivni tijek. Od prvih procjena da OSA zahvaća 4% muške i 2% ženske odrasle populacije (6), nedavni pregled epidemiološkog praćenja navodi da 22% muškaraca i 17% žena srednje dobi ima AHI> 5 (7). OSA je nadalje zabilježena i u 1-4% djece (8). Značajt OSA-e također je u tome što kod velikog broja ljudi poremećaj nije dijagnosticiran (9, 10). Muškarci su pod većim rizikom obolijevanja od žena u omjeru 2:1, što bi moglo biti povezano s različitim rasporedom masnog tkiva u tijelu muškaraca i žena, anatomskim razlikama u gornjem dišnom traktu i hormonskim utjecajima na tonus mišića ždrijela (11-13). Dodatni pokazatelj da estrogen ima zaštitnu funkciju na razvoj OSA-e jest to da su žene nakon menopauze sklonije razvoju OSA-e nego žene prije menopause (14, 15). S porastom udjela pretile i starije populacije, procjenjuje se da će OSA postati sve rasprostranjenija u populaciji (7, 16).

1.1.2 Komorbiditeti

OSA je nezavisan rizični faktor za pojavu kardiovaskularnih bolesti poput infarkta miokarda, kongestivnoga srčanog zatajenja i sistemske i plućne hipertenzije, kao i za moždani udar, cerebrovaskularnu disfunkciju te idiopatsku naglu smrt (17-19). Pokazano je kako intermitentna hipoksija rezultira značajnim utjecajem na vazomotoričku reaktivnost u mozgu i poremećajima grušanja krvi (20). Usto, pacijenti s OSA-om imaju niže razine regulatornih T limfocita koji posreduju u upalnim zbivanjima i suprimiraju

stvaranje aterosklerotskih plakova (21). Navedeni čimbenici mogli bi djelomično objasniti povezanost OSA-e s kardiovaskularnim i cerebrovaskularnim bolestima (22).

Nedavno je zabilježena veza OSA-e s kroničnim bubrežnim zatajenjem i OSA-e s pojavom malignih bolesti (23). OSA pogoršava inzulinsku rezistenciju, metaboličke bolesti te gastroezofagealni refluks (24-26).

U pacijenata s OSA-om također su povišeni biljezi kronične upale kao što su adhezivne molekule, protein povezan s mijeloidom 8/14 (*engl. myeloid related protein 8/14*), povišene razine leukotriena te ekspresija receptora nalik na Toll 2 i 4 (TLR - *engl. Toll-like receptor*) na površini cirkulirajućih monocita (21, 27-29). Utjecajem na imunološki sustav mogao bi se objasniti širok dijapazon bolesti s kojima je OSA povezana (30, 31).

Zabilježeno je da 1-3% djece boluje od pedijatrijskog oblika OSA-e (32), sa pojavnosti do 10% u djece do 9 godina (33). U pedijatrijskoj populaciji posebno su pod rizikom za razvoj OSA-e djeca s Downovovim sindromom, Pierre-Robinovim sindromom i drugim kongenitalnim malformacijama gornjega dišnog trakta poput laringomalacije, opstruirajućih hemangioma, atrezije hoana i genetskih sindroma praćenih mikrognatijom i retrognatijom, no također i djeca bez anatomskih predispozicija, ali s dugotrajnom hipertrofijom tonzila (34, 35).

Patofiziološki odnosi pojedinih komorbiditeta i OSA-e su nedovoljno okarakterizirani, kompleksni i dvosmjerni (30, 36). Primjerice, OSA je opisana kao nezavisni rizični faktor za moždani udar (24, 37, 38). Međutim, također i pacijenti koji su preživjeli moždani udar imaju veliku šansu razviti OSA-u, koja zauzvrat dodatno povećava rizik ponovljenog moždanog udara (39). Nadalje, OSA je prepoznata kao nezavisni čimbenik za razvoj Alzheimerove bolesti, no pokazano je da neki patofiziološki mehanizmi koji precipitiraju razvoj AD precipitiraju i razvoj OSA-e (40)(poglavlje OSA i Alzheimerova bolest).

Oko 50% pacijenata koji boluje od OSA-e ima hipertenziju (41). Vrlo je kompleksno istražiti doprinos svakog od ovih patoloških entiteta posebno i donijeti zaključke o njihovom djelovanju na ukupni cerebrovaskularni sustav i zdravlje općenito. Također, mnogi pacijenti koji imaju „samo hipertenziju“ mogli bi bolovati i od nedijagnosticirane OSA-e (41).

1.1.3 Opstruktivna apneja spavanja i Alzheimerova bolest

OSA je 5 puta učestalija u pacijenata s Alzheimerovom bolesti nego među kontrolama iste dobi bez kognitivnog deficita (40). Nadalje, polovica pacijenata s dijagnozom Alzheimerove bolesti imat će simptome OSA-e u nekom trenutku nakon dijagnoze (40). Patogeneza Alzheimerove bolesti u mnogim aspektima se preklapa s patogenezom kognitivnog propadanja u pacijenata s OSA-om (42-45). Nedavno je predložena teorija kojom se tvrdi da ekscesivna i produžena neuronalna aktivnost u kontekstu manjka strukturiranog sna pridonosi usmjeravanju patofizioloških procesa u mozgu prema razvitku AD i OSA-e (46) . Zdravi proces spavanja uklanja višak metabolita nakupljenih u neuronima tijekom dana, poput Aβ iz međustaničnog prostora u mozgu(47). Poremećen san dovodi do smanjenog uklanjanja metabolita, te promjena na razini cerebrovaskularne jedinice i krvno-moždane barijere (47-49). Patofiziološki mehanizmi koji prethode razvoju simptoma AD utječu na promjene u arhitekturi spavanja i regulaciji cirkadijanog ritma (30, 45, 50, 51). Drugi faktori, poput pretilosti i sistemske upale vjerojatno utječu na imunološke procese u mozgu te potpomažu progresiju bolesti (47).

1.1.4 Neurokognitivni poremećaji u pacijenata s opstruktivnom apnejom spavanja

Zbog fragmentacije sna i intermitentne hipoksije, pacijenti s OSA-om pate od neurokognitivnih poremećaja (30, 36). Dio pacijenata s OSA-om pati od pospanosti tijekom dana, smanjene pažnje i produljenog vremena reakcije (52-56). Mnoga istraživanja opisuju poremećaje u kratkoročnom pamćenju, vizualnoj i verbalnoj dugoročnoj memoriji, verbalnom izražavanju, rješavanju problema i uočavanju detalja (57-60). Ovi poremećaji smanjuju produktivnost na radu, destabiliziraju socijalne odnose, povećavaju vjerojatnost sudjelovanja u prometnim nesrećama te općenito utječu na kvalitetu života (61-63).

Djeca koja pate od OSA-e imaju smanjene sposobnosti učenja, hiperaktivnost te lošiju sposobnost koncentracije (33).

Mnogi autori navode da OSA uzrokuje poremećaje izvršnih funkcija, kao što su radna memorija, kognitivna fleksibilnost, kontrola pozornosti i inhibicijska kontrola, rješavanje problema, planiranje i rasuđivanje, one odlike koje su nam potrebne za prilagodbu i kognitivnu kontrolu ponašanja (64-67). Prefrontalni korteks je regija mozga koja omogućava sažimanje informacija i uspješno provođenje većine procesa opisanih izrazom „izvršna funkcija“, tj. ponašanja specifičnog za ljudsku vrstu (64). S obzirom na to da je tijekom dana prefrontalni korteks jedan od najaktivnijih dijelova središnjeg živčanog sustava (CNS- *engl. central nervous system*), prema interpretaciji teorije sinaptičke homeostaze, to je posljedično jedna od regija koja najviše ovisi o „rekalibraciji“ tijekom spavanja te je kao takva najviše pogođena kroničnom fragmentacijom sna (67, 68). Izvršna disfunkcija može biti povezana i s oštećenjem funkcije hipokampusa ili neizravno kroz promijenjenu funkcionalnu povezanost s prefrontalnim i parijetalnim korteksom (62, 69). Intermitentna hipoksija i fragmentacija sna utječu na smanjenje neuronalne ekscitabilnosti, slabije stvaranje mijelina te povećanje oksidativnog stresa (30, 70).

U alternativnoj interpretaciji neurokognitivnih deficita u pacijenata s OSA-om predlaže se da jedan ispad u funkciji „niske razine“ kao što je vizualna pažnja, može negativno utjecati na širok dijapazon različitih kognitivnih deficita „viših razina“ koje ovise o toj funkciji (71). Zastupnici te teorije navode kako su pri deprivaciji sna u ispitanika najčešći konzistentni nalazi promjena moždane aktivnosti u okcipitalnoj i parijetalnoj regiji mozga pri funkcionalnom oslikavanju magnetskom rezonancom (fMRI- *engl. functional magnetic resonance imaging*). Unatoč tome, većina ovih nalaza zabilježena je na zdravim ispitanicima koji su bili podvrgnuti deprivaciji sna, dok je moguće da pacijenti s OSA-om imaju drukčije posljedice ove deprivacije. Nadalje, neke druge studije nisu pronašle nikakve poremećaje u vizualnoj memoriji u velikoj skupini pacijenata s OSA-om (72).

Ritmičko usklađivanje aktivnosti u kortiko- talamo- kortikalnim i cerebelarnim neuralnim mrežama događa se tijekom svih razina svijesti, što se bilježi EEG-om (36). U pacijenata s OSA-om utvrđeno je značajno usporavanje EEG-a u budnom stanju i u REM fazi sna (73-75). Tijekom nREM-sna smanjuje se modulatorni utjecaj moždanog debla i bazalnog telencefalona na talamo- kortikalne oscilacije te se tada stvaraju predominantno spore oscilacije, vretena spavanja i ostali spori ritmovi povezani sa stvaranjem sjećanja i plastičnošću mozga, a koji su bitni za restituciju sinaptičke homeostaze(36). Pokazano je

kako su vretena spavanja neorganizirana u pacijenata s OSA-om što upućuje na promjene u talamo- kortikalnoj regulaciji oscilacija neuralne aktivnosti (36, 76).

Naposljetku, uzroci mnogih neurokognitivnih deficita koji se pojavljuju u pacijenata s OSA-om nisu još u potpunosti razjašnjeni na neurofiziološkoj razini.

1.1.5 Oslikavanje mozga u pacijenata s opstruktivnom apnejom spavanja

Oslikavanja magnetskomom rezonancom (MRI- *engl. magnetic resonance imaging*) kojima se uspoređivala populacija pacijenata s OSA-om sa zdravim kontrolama ukazala su na hipotrofiju hipokampusa kao glavnu promjenu, ali i na mnoge druge strukture poput frontalnog i parijetalnog korteksa, temporalnog režnja, prednjeg cingulatnog korteksa i malog mozga, globusa palidusa i žuljevitog tijela i talamusa (62, 69, 77-80).

Zanimljivo je da je jedno istraživanje korištenjem MRI, mjereći na vokselima temeljenu morfometriju (VBM- *engl. voxel based morphometry*) kod pacijenata s OSA-om utvrdilo povećanje hipokampalnog volumena, smanjenje veličine talamusa te aberantnu povezanost između hipokampusa i malog mozga u usporedbi s kontrolnom populacijom (70). Pronalazak povećanih hipokampusa u pacijenata s OSA-om otvara novu dimenziju patologije OSA-e te potencijalno povezuje nalaze na ljudima s prethodnim pretkliničkim nalazima koji pokazuju pozitivan utjecaj intermitentne hipoksije na hipokampalnu neurogenezu (81).

Kao funkcionalna nadogradnja strukturih nalaza MRI, proučavan je metabolizam mozga u pacijenta s OSA-om. Uspoređujući nalaze gustoće sive tvari i FDG-PET mjerenja metabolizma u mirovanju potvrđeno je da se nalazi poklapaju u prefrontalnom korteksu i u malom mozgu no, u drugim regijama gubitak gustoće sive tvari nije korelirao sa smanjenim metabolizmom (80). Zanimljivo je da su nalazi korelirali s težinom OSA-e i s blagim kognitivnim oštećenjem.

Nalazi MRI-spektroskopije zabilježili su povećanu razgradnju i stvaranje membrana u hipokampusu pacijenata s OSA-om koji implicira postojanje upalnog procesa koji utječe na mijelinizaciju (82). Sukladno tome, pokazana je korelacija povećanog omjera kolin/kreatinin (Cho/CR) s težinom OSA-e, što se interpretiralo kao znak povećane glioze,

oštećenja i promjene u metabolizmu staničnih membrana (83). Znakovi smanjenog neuronalnog metabolizma nađeni su u frontalnim režnjevima (82) i u putamenu (83).

1.1.6 Reverzibilnost simptoma opstruktivne apneje spavanja terapijom kontinuiranim pozitivnim tlakom u dišnom putu

Trenutni zlatni standard terapije OSA-e je terapija kontinuiranim pozitivnim tlakom u dišnom putu (CPAP - *engl. continuous positive airway pressure*). Unatoč jasnom učinku na smanjivanje objektivne i subjektivne pospanosti tijekom dana (3, 84, 85) i dalje nije potpuno utvrđeno kojim populacijama pacijenata CPAP značajno koristi, te koji su učinci CPAP-a na različite organske sustave (59, 69). Naime, pacijenti s OSA-om znatno variraju u težini bolesti, komorbiditetima i u razvijenim simptomima a također i po duljini trajanja bolesti do trenutka dijagnoze. Kroz zadnja dva desetljeća značajan napor je uložen da se istraži koliko CPAP utječe na posljedice OSA-e, i koje posljedice bolesti su reverzibilne, a koje su trajne (56, 57, 59, 61, 63).

Uz to što smanjuje pospanost, pokazano je da CPAP poboljšava rezultate neurokognitivnih testova u pacijenata s OSA-om (52, 53, 69, 86). Promjene sive tvari mozga zabilježene na MRI-ju reverzibilne su već 3 mjeseca nakon terapije, dok je pokazana i normalizacija brzine obrtaja membrana u hipokampusu pacijenata s OSA-om (62, 82). Nedavna studija opisala je difuzno smanjenje integriteta živčanih vlakana u bijeloj tvari u pacijenata s OSA-om, koje se značajno poboljšalo nakon 12 mjeseci terapije CPAP-om (87). Nasuprot tome, nikakva razlika neuronalnog metabolizma nije pronađena MRI-spektroskopijom prije terapije i 6 mjeseci nakon terapije (82). Također, randomizirani klinički pokus u pacijenata sa srednje teškom OSA-om nije pronašao nikakvo neurokognitivno poboljšanje nakon terapije CPAP-om u usporedbi s placebom, osim subjektivno bolje kvalitete sna (52, 85). Nažalost, neki pacijenti loše podnose CPAP te je terapijska suradljivost slaba u usporedbi s medikamentoznom terapijom. Ovu činjenicu također treba uzeti u obzir pri interpretaciji nalaza učinkovitosti CPAP-a, a mnoge studije prate adherenciju terapijskom protokolu pomoću čipova u CPAP-pumpama (84).

1.2 Osnovne značajke upalnog odgovora mozga

Upalni odgovor mozga dinamičan je proces posredovan rezidentnim i sistemskim upalnim stanicama kao i njihovim kemijskim signalima i glasnicima. Za mozak se dugo smatralo da je imunološki izoliran od sistemske upale putem krvno-moždane barijere. Istraživanja sada govore u prilog tome da je CNS u stalnoj komunikaciji s urođenim i stečenim imunološkim sustavom. Rezidentne imunološke stanice CNS-a, mikroglija, povezane su s krvnim imunosnim stanicama koje su u mogućnosti infiltrirati CNS ako dođe do oštećenja krvno- moždane barijere (BBB - *engl. blood brain barrier*)(88, 89).

Moždani udar, multipla skleroza i neurodegenerativne bolesti uzrokuju adaptivni upalni odgovor mozga s ciljem ograničavanja bolesti, čišćenja staničnog debrisa te podrške cijeljenju i regeneraciji. Ipak, zbog različitih čimbenika koji utječu na tijek upale, često je slučaj da neuroinflamacija doprinosi samom patološkom procesu (90, 91). Razumijevanje mehanizama neuroprotektivne i neurodegenerativne uloge upalnog odgovora mozga temelj je istraživanja patogeneze većine bolesti mozga(92).

Upalni odgovor razlikuje se ovisno o tome je li noksa mehanička, kemijska, infektivna ili tumorska, te ovisi o vrsti tkiva i njegovim rezidentnim imunosnim stanicama. Upalni odgovor mozga je specifičan po tome što je CNS mehanički dobro zaštićen lubanjom i kemijski i infektivno izoliran uz pomoć BBB-a, no kada je upalom zahvaćeno čak i ograničeno područje, to može uzrokovati trajne posljedice zbog malog regenerativnog potencijala tkiva, poremećaje funkcije, pa i smrt jedinke (90, 93).

Oštećenje mozga dovodi do aktivacije rezidentnih imunosnih stanica poput mikroglije, makrofaga i dendritičkih stanica. Potom dolazi do promjena u lokalnom protoku krvi i permeablnosti žila, infiltracije pokretnih imunosnih stanica poput neutrofila, limfocita i monocita te proizvodnje lokalnih i sistemskih citokina, poput kemokina, interferona, limfokina i faktora tumorske nekroze (93, 94).

Upalni procesi povezani su s mnogim bolestima središnjega živčanog sustava: Alzheimerovom bolesti, Parkinsonovom bolesti, MS, moždanim udarom, tumorima mozga, traumama mozga i naravno bakterijskim i virusnim bolestima CNS-a. Postoje preliminarni dokazi o upalnim zbivanjima u opstruktivnoj apneji spavanja, dobiveni upravo korištenjem životinjskih modela intermitentne hipoksije (v. poglavlje „Saznanja o

razvoju i značajkama upalnog odgovora mozga u modelu intermitentne hipoksije“)(95-97). Zanimljivo je da je neuroinflamacija u zadnjih nekoliko godina uočena i u psihijatrijskim bolestima poput depresije, shizofrenije i anksioznosti (98).

Upala mozga u nedostatku mikroorganizama naziva se „sterilna neuroinflamacija“ (38). Upalni odgovor najčešće započinje otpuštanjem molekula povezanih s ozljedom (DAMP- *engl. damage associated molecular patterns*), HMGB1, proteinima toplinskog šoka (HSP- *engl. heat shock proteins*), histona, oksidiranih lipida, adenozin-trifosfata (ATP- *engl. adenosine triphosphate*) i amiloida β (Aβ) iz oštećenog tkiva. Zatim slijedi aktivacija TLR-a različitih podtipova te receptora za krajnje produkte uznapredovale glikacije (RAGE- *engl. receptor for advanced glycation endproducts*) s posljedičnom proizvodnjom citokina i adhezivnih molekula koji aktiviraju i pokreću migraciju mikroglije. Zbog promjena permeabilnosti BBB-a započinje infiltracija makrofaga i T-limfocita u mozak. Dolazi do aktivacije astrocita koji pokušavaju kontrolirati infiltraciju T-limfocita. Pokreće se izlučivanje signalnih čimbenika poput neuronalnih neuropeptida, molekula glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (MHC – *engl. major histocompatibility complex*), semaforina i lektina, a na površini membrana astrocita se pojavljuju novi membranski proteini poput kanabinoidnih receptora (90, 93).

1.2.1 Uloga mikroglije u upalnom odgovoru mozga

Glavne imunološke stanice u CNS-u nazivaju se mikroglija, termin koji je 1920ih skovao Pio del Rio-Hortega (99). Mikroglija sačinjava oko 10% ukupne populacije stanica mozga koje su nadležne za gotovo sve procese upale, fagocitozu i čišćenje odumrlih stanica ili oštećenog mijelina, procese cijeljenja i ograničavanje upale uzrokovane virusima ili bakterijama (90-92). Mikroglija je također bitna u razvoju mozga zbog toga što regulira apoptozu prekomjernih neurona. Nadalje, izlučujući različite faktore rasta poput moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF - *engl. brain-derived growth factor*), čimbenika rasta nalik na inzulin (IGF-1 - *engl. insulin like growth fact*or) i čimbenika rasta fibroblasta 2 (FGF 2 - *engl. fibroblast growth factor 2*) sudjeluje u izrastanju i navođenju aksona, neuronalnoj diferencijaciji, angiogenezi te proliferaciji astrocita (92).

Mikroglija je rasprostranjena kroz sivu i bijelu tvar cijelog CNS-a, te je tipično da je pojedina stanica „zadužena“ za volumen od 30 μm^3 u kojem se ne preklapa s drugim stanicama mikroglije (100).

Tijekom embrionalnoga razvoja, monociti iz žumanjčane vreće migriraju u neuroepitel odmah nakon razvoja cirkulacije prije nego što je hematopoeza u užem smislu uopće započela. Nakon zatvaranja krvno-moždane barijere, razvojem pericita i astrocita, ovi monociti se diferenciraju u mikrogliju te proliferacijom stvore cijelu adultnu mikroglijalnu populaciju mozga. Ako dođe do poremećaja krvno moždane barijere u odrasle jedinke, dolazi do infiltracije perivaskularnih makrofaga koji se nalaze između bazalne membrane krvne žile i astrocitnih završetaka. Također dolazi do prodora monocita iz krvi koji se u moždanom tkivu diferenciraju u monocite fenotipa nalik na mikrogliju (88, 89).

U stanju mirovanja mikroglija aktivno nadzire svoju okolinu pokretnim nastavcima, komunicira s astrocitima te izlučuje protuupalne i neurotrofične faktore (101). Nastavci pokazuju vrlo brzu kemotaktičku reakciju na oštećenje i prisutnost ATP-a te stanice iz mirovanja prelaze u aktivni oblik. Podražena mikroglija mijenja morfologiju, njezini izdanci postaju kraći i oskudniji, te migrira prema mjestu oštećenja. Slično kao kod perifernih makrofaga, mogu se razlikovati dva fenotipa aktivirane mikroglije. Proinflamatorni fenotip M1 razvija se kada mikroglija u mirovanju bude podražena lipopolisaharidima ili interferonom γ te odgovara klasičnom aktivacijskom putu makrofaga, gdje mikroglija fenotipa M1 izlučuje interleukin (IL)1β, IL- 6, faktor nekroze α, dušikov (II) oksid, vodikov peroksid i metaloproteinaze matriksa. Antiinflamatorni fenotip M2 aktiviraju interleukin 4 i interleukin 13, a te stanice izlučuju IL-10 i arginazu-1, stimuliraju angiogenezu i tkivno remodeliranje (102). Fenotip M1 je jasno okarakteriziran *in vivo* i *in vitro* pokusima, a za fenotip M2 se još uvijek razmatraju nalazi različitih istraživanja. Moguć je još jedan intermedijarni fenotip aktivirane mikroglije, ako ne i cijeli niz fenotipova između krajnjih točaka M1 i M2 (91). Ako se na podraženu mikrogliju gleda kao na spektar fenotipova, moguće je da mikroglija može istovremeno eksprimirati kombinaciju markera koji su se nekada smatrali protuupalnima ili upalnima (91). Istraživanja mikroglije, kao i istraživanja upale u mozgu općenito pokazuju kako mnogi još nedovoljno razjašnjeni čimbenici određuju hoće li upala rezultirati reparacijom ili perpetuiranjem oštećenja (91, 92, 103).

1.2.2 Neurogena neuroinflamacija

Nedavno je predložena hipoteza u kojoj aktivaciju mikroglije, lučenje citokina i promjene propusnosti krvnih žila ne uzrokuju samo patogeni ili tkivno oštećenje, već je i prekomjerna neuronalna aktivnost dovoljna za inicijaciju kaskade upalnih događaja (46). Uloga neurogene neuroinflamacije jest da omogući CNS-u nositi se s pojačanim metaboličkim potrebama, povećavajući njegove kapacitete te potičući regeneraciju. Neurogena neuroinflamacija postaje maladaptivna kada traje dulje negoli je potrebno tj. fiziološki, primjerice kod epilepsije, psihološkog stresa ili kronične boli (46). S obzirom na to da je jedna od glavnih uloga spavanja redukcija metabolizma mozga radi intenzivnijeg čišćenja metaboličkih produkata, zamislivo je kako pri poremećaju arhitekture spavanja može doći do nastanka uvjeta koji potenciraju razvoj neurogene neuroinflamacije (46, 47, 68).

Koncentracija većine proteina potisteklih iz neurona smanjena je u cerebrospinalnom likvoru (CSF - *engl. cerebrospinal fluid*) pacijenata s OSA-om u usporedbi sa zdravim kontrolama (43). Rezultati su interpretirani u smislu poremećene interakcije CSF-a i intersticija u OSA-i. Vjerojatno je da zbog povećanog napora pri udisaju kroz opstruirani dišni put dolazi do povišenog intratorakalnog i intrakranijalnog tlaka kao i do nagle promjene tlaka na kraju svake apneje, što uzrokuje ponavljajuće fluktuacije visokog tlaka. Ove fluktuacije bi mogle narušavati glimfatički tijek metabolita u CSF-u, dovoditi do njihovog zadržavanja u tkivu mozga te uzrokovati podražaj za razvoj neurogene inflamacije (43). Za ilustraciju, pokazana je 30% veća koncentracija amiloida β u intersticiju mozga mladih ljudi u budnom stanju u usporedbi sa sporo-valnim NREM-spavanjem (43).

1.2.3 Uloga astrocita u upalnom odgovoru mozga

Astrociti su heterogena skupina stanica koji omogućavaju stvaranje, dozrijevanje i funkcioniranje fiziološke sinaptičke signalizacije među neuronima održavajući homeostazu iona i neurotransmitera unutar sinapsi i izlučujući antioksidanse protiv slobodnih radikala kisika (ROS - *engl. reactive oxygen species*) (104). Patologija astrocita

može se razvrstati u astrocitnu asteniju, smanjenu ili neispravnu funkciju astrocita i astrogliozu, pretjeranu proliferaciju astrocita koja dovodi do formiranja glijalnog ožiljka (104). O upalnom odgovoru astrocita na nisku razinu kronične nokse, za kakvu je pretpostavljeno da uzrokuje OSA, vrlo malo se zna. U Alzheimerovoj bolesti astrociti pokazuju znakove morfološke atrofije što dovodi do poremećaja u održavanju sinaptičke homeostaze. Nasuprot tomu, reaktivni astrociti se nakupljaju oko neurofibrilarnih agregata (105).

Nedavno su astrociti implicirani kao glavni regulatori odstranjivanja metabolita u intersticiju putem glimfatičkog sustava koji je reguliran tijekom sna (106). Bubrenje astrocita stvara „mrtve domene“ izvanstaničnog prostora, u kojima je gibanje izvanstanične tekućine onemogućen (107, 108). Predloženo je da bi niska razina upale uzrokovana opetovanom hipoksijom i fluktuacijama u intrakranijalnom tlaku mogla dovesti do povećanja vijugavosti izvanstaničnog prostora gdje bi višak metabolita, poput Aβ, mogao ostati zarobljen (108).

1.3 Receptori nalik na Toll

Receptori nalik na Toll su obitelj receptora koji imaju važnu ulogu u prepoznavanju egzogenih i endogenih molekula povezanih s urođenim imunološkim odgovorom, te u posljedičnoj unutarstaničnoj aktivaciji nizvodnih transkripcijskih faktora (109). TLR potiču sekreciju kemokina i drugih citokina te usklađuju neposrednu specifičnu i globalnu reakciju tkiva u sklopu urođenog imuniteta do trenutka kada će stečena imunost preuzeti tu funkciju. Nadalje, potiču stečenu imunost time što aktiviraju stanice koje prezentiraju antigene, ponajprije makrofage i dendritičke stanice (109). Nedavna istraživanja su počela davati dokaze da TLR u sisavcima također imaju ulogu tijekom embriogeneze, kao i fiziološke i metaboličke uloge u odrasloj jedinki, primjerice u učenju i pamćenju te kod anksioznosti (110).

Prvi Toll-gen identificiran je u kontekstu embriološkog dorzo- ventralnog razvoja vinske mušice, a za taj pronalazak 1985. godine je Nüsslein-Volhard dobila Nobelovu nagradu u području fiziologije ili medicine za otkrića u području genetske kontrole ranog embrionalnog razvoja (111). Istraživanjima koja su uslijedila pokazalo se da Toll-

receptori imaju važnu imunološku funkciju u sklopu imuniteta vinske mušice na infekciju Aspergillus fumigatus (112). Kako su različiti TLR otkrivani, postalo je jasno da su TLR jedna od glavnih odrednica urođenog imuniteta protiv egzogenih patogena. Nedavno je pokazano da su TLR bitni za regulaciju unutarnjih procesa upale nevezanih za vanjske podražaje te je pokazano da njihova uloga nije ograničena samo na urođenu imunost, već i na stečenu. Ova skupina receptora evolucijski je očuvana od morskog ježinca pa do ljudi. U čovjeka je opisano 11, a u miša 14 različitih receptora nalik na Toll (109, 113).

Važnu ulogu u urođenoj imunost ova skupina receptora igra zahvaljujući specijaliziranim izvanstaničnih domenama za prepoznavanje molekularnih uzoraka povezanih s patogenim organizmima (PAMP - *engl. pathogen associated molecular patterns*), koji su tipični za pojedine vrste bakterija i virusa (114). Primjerice, TLR4 se specijalizirao za prepoznavanje lipopolisaharida (LPS) tipični za gram-negativne bakterije, dok TLR2 prepoznaje lipopeptide gram-pozitivnih bakterija. Drugi TLR prepoznaju spojeve poput lipoproteina, glikolipida, jednolančane RNA i flagelina (115). TLR su također povezani s prepoznavanjem DAMP- ova. TLR aktiviraju molekule otpuštene iz nekrotičnih stanica, poput proteina toplinskog šoka70, 80 i 90, proteina jezgre poput HMGB ili produkata razgradnje međustanične tvari - fibronektina, hijaluronana, i heparan-sulfata (110, 116, 117)..

1.3.1 Signalni put TLR2

TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 iz skupine TL-receptora smješteni su na staničnoj membrani dok su TLR7, TLR8 i TLR9 smješteni na membrani endosoma. Postoje ograničeni dokazi kako ova podjela nije fiksna te je opisana lokalizacija TLR4 i TLR5 unutar endosoma i TLR9 na staničnoj membrani (118). TLR imaju transmembransku domenu s N-terminalnim krajem izvan stanice, tj. unutar endosoma. Svojim unutarstaničnim dijelom nalikuju na receptore za interleukin 1 (IL- 1) te se on ponekad naziva IL1/TLR-domena. Nasuprot tome, izvanstanična domena je specifične građe za svaki receptor i posjeduje ponavljanja bogata leucinom (119).

Radi bolje specifičnosti vezanja liganda, TLR se dimeriziraju. Većina TLR formira homodimere, sačinjene od dvaju istih receptora, no TLR2 može stvarati i heterodimere

koje tvore s TLR 1 i 6. Nakon vezanja liganda unutarstanična IL1/TLR-domena reagira s adaptorskim molekulama: mijeloidnim čimbenikom diferencijacije (MyD88 - *engl. myeloid differentiation factor 88*), aktivatorom interferona povezanog s Toll receptorom (TRIF - *engl. Toll-receptor-associated activator of interferons)*, molekulom povezanom s Toll-receptorom (TRAM- *engl. Toll-receptor-associated molecule)* i bjelančevinama nalik na MyD88 adaptor povezane s Toll/interleukin-1 receptorom (MAL/TIRAP - *engl. MyD88-adaptor-like/TIR-associated proteins*). Najčešća je adapterska molekula MyD88, te se TLR-signaliziranje dijeli u ovisno i neovisno o MyD88 (119, 120).

Nakon signalne kaskade, TLR-aktivacija rezultira regulacijom transkripcije, preko važnih čimbenika transkripcije među kojima su nuklearni čimbenik- κB (NF-κB - *engl. nuclear factor κB*), aktivacijski protein 1 (AP-1 - *engl. activation protein 1*) i regulatorni čimbenik interferona, IRF3 i 7 (IRF - *engl. interferon regulatory factor*)(117-120).

TLR je izražen na mnogim stanicama, prvenstveno imunosnim stanicama urođene imunosti kao što su makrofagi, dendritičke stanice, mastociti, NK-stanice i na specifičnoj podgrupi T-limfocita, γδ-limfocitima čija uloga je svojevrsni spoj urođene i stečene imunosti. Također, TLR imaju ulogu i u stečenoj imunosti, te su TLR6, TLR7, TLR9 i TLR10 opisani u endosomima B-limfocita (121).

U mozgu TLR eksprimiraju prvenstveno stanice mikroglije. Pokazano je da su na mikrogliji eksprimirani svi TLR (1-9) dok su na astrocitima eksprimirani TLR2, TLR3 i TLR9, na neuronima TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 a na oligodendrocitima TLR2 i TLR3. U manjoj mjeri TLR su eksprimirani na neuronima, te je nedavno pokazano da su prisutni i na stanicama progenitorima neurona (110, 116). Kombinacije adaptorskih molekula omogućavaju fleksibilnost unutarstaničnog odgovora, pa tako isti receptor aktiviran istim PAMP-om ili DAMP-om neće rezultirati istim efektom ovisno o stanici na kojoj se nalazi (110), što objašnjava diferencijalnu ulogu TLR u imunološkoj reakciji različitih stanica istog tkiva kao i embrionalnom razvoju ili neuronalnoj plastičnosti.

1.3.2 TLR2 u neurološkim bolestima

U zadnjih nekoliko godina postalo je očito da patofiziologija mnogih bolesti središnjeg živčanog sustava u većoj ili manjoj mjeri sadrži komponentu upale s aktivacijom

mikroglije, lučenjem citokina te posljedičnim nizvodnim signalnim kaskadama koje dovode do regulacije transkripcije (116). TLR2 je važan upravo u kontekstu aktivacije mikroglije. U mišjem modelu perifernog oštećenja živca, pokazano je kako životinje bez Tlr2 gena ne pokazuju reaktivnoo nakupljanje mikroglije i astrocita u kralježničkoj moždini niti ne postoji povećana ekspresija IL-β i tumorskog čimbenika nekroze α (TNF-α- *engl. tumor necrosis factor α*) kao u kontrolama. Također, pokazano je kako je demijelinizacija nakon oštećenja smanjena nakon onemogućavanja TLR2, no također kako je TLR2 nužan za početak procesa regeneracije nakon oštećenja (110).

U modelu traumatske ozljede mozga u miša također je pronađena smanjena aktivacija astrocita i mikroglije u životinjama bez TLR2 te posljedično veće sekundarno oštećenje nastalo upalnim procesima nakon ozljede (110).

U mišjem modelu moždanog udara pokazano je kako životinje bez Tlr2-gena imaju smanjenu aktivaciju mikroglije/makrofaga nakon moždanog udara, smanjenu proliferaciju mikroglije, manju veličinu lezije nakon prvih 48h, no dugoročno imaju veću leziju te lošiji kronični tijek bolesti (93). Također, zanimljivo je da iako su $TLR2^{-/-}$ životinje imale smanjene razine ekspresije TNF, marker neuronalne apoptoze kaspaza 8 (CASP) bio je izraženiji u toj skupini u akutnoj i subakutnoj vremenskoj točki (122).

Nedavno je pokazano da oligomerni α sinuklein pokreće upalnu kaskadu direktno aktivirajući TLR1/TLR2-heterodimer te je time TLR2 dobio značenje u patofiziologiji Parkinsonove bolesti (123). Također, pokazana je pojačana ekspresija TLR2 na cirkulirajućim monocitima pacijenata s Parkinsonovom bolesti (124).

U mišjem modelu Alzehimerove bolesti, s mutiranim genom za presenilin 1 i izbačenim genom za TLR2, miševi su pokazali ubrzani gubitak prostornog sjećanja i povišenu razinu $A\beta_{1-42}$. Dapače, ovaj deficit bio je reverzibilan i mogao se nadoknaditi infuzijom lentivirusa sa TLR2-konstruktom u koštanu srž miša (125). Također, pokazano je kako je TLR2 uz koreceptor CD15 potreban za aktivaciju mikroglije nakupinama Aβ (126). Slično kao i u pacijenata s Parkinsonovom bolesti, pokazana je povišena ekspresija TLR2 i TLR4 u cirkulirajućim monocitima pacijenata s kasno nastupajućom Alzheimerovom bolesti te je dapače, ovaj nalaz bio negativno koreliran sa rezultatima na testu kognitivnih funkcija (MMSE - *engl. mini mental state examination*) (127).

Nije poznata uloga TLR2 u opstruktivnoj apneji spavanja, te je određivanje iste primarni cilj ove disertacije. Kliničko istraživanje na 29 pacijenta s OSA-om i 18 kontrola pokazalo je povišenu ekspresiju TLR2 i TLR4 u cirkulirajućim monocitima pacijenata s OSA-om koja se povratila na kontrolnu razinu nakon 8 tjedana liječenja CPAP-om (27). Slična studija s većim brojem pacijenata, stratificiranim po težini OSA-e, pokazala je pojačanu ekspresiju TLR2 i TLR6 na $CD16^+$ neutrofilima, $CD14^+$ monocitima te $CD3^+$ $CD4^+$ T-limfocitima, koja je također reagirala na terapiju CPAP-om (29). Povećana ekspresija TLR4 mRNA pokazana je i u pretkliničkoj studiji na mikrogliji miševa izloženih modelu intermitentne hipoksije (128).

1.4 Pretklinički modeli intermitentne hipoksije za procjenu upalnog odgovora mozga

Opstruktivna apneja spavanja obuhvaća dva glavna patofiziološka entiteta, poremećaj u arhitekturi spavanja i periodičku hipoksemiju i hiperkapniju tijekom noći (30). Pretklinički modeli koriste se za istraživanje ovih patofizioloških entiteta na reproducibilan i kontroliran način pri čemu je bitno razdvojiti uzročno posljedični odnos za svaki čimbenik bolesti pojedinačno. Modeli se razlikuju po preciznosti u reproduciranju patoloških uvjeta, jednostavnosti primjene na većem broju životinja, mogućnosti kontroliranja uvjeta pokusa i troškovima. Ovisno o važnosti svakog od ovih faktora, istraživač izabire model koji mu se čini najrelevantniji.

1.4.1 Modeli u upotrebi

Jedan od najizravnijih načina istraživanja opstruktivne apneje spavanja je bilježenje i proučavanje spontanih apneičnih epizoda u hipertenzivnih, pretilih ili genetski modificiranih miševa, te njihova usporedba sa zdravim kontrolama (129, 130). Prednost ovih modela je mogućnost promjene samo jednog aspekta visoko srođene linije te zaključivanje o izoliranom etiološkom faktoru. Međutim, odnos uzroka i posljedica u prirodnom pojavljivanju poremećaja disanja tijekom sna u glodavaca je kompleksan kao i u ljudi; te prirodno pojavljujući poremećaji disanja mogu biti raznorodni kao i u pacijenata s teškom i blagom apnejom spavanja. Većina istraživanja koja se bavila modelima

prirodno pojavljujućih apneja spavanja u glodavaca koncentrirala se na središnje apneje, bilježeći signale EMG i EEG, promjene u krvnom tlaku i oksigenaciju krvi (131).

Postoje modeli opstruktivne apneje spavanja koji se orijentiraju na opstrukciju gornjeg dišnog puta podvezivanjem traheje ili kanilama s dvostrukim lumenom (132, 133). Ovi modeli dobri su u reproduciranju točnih etiopatoloških čimbenika vezanih uz opstrukciju gornjeg dišnog puta u OSA-i, kao što su povećani inspiratorni napor i povećani intratorakalni tlak. Doduše, ovi modeli moraju biti administrirani dok je miš pod anestezijom, što samo po sebi predstavlja značajno ograničenje.

1.4.2 Intermitentna hipoksija

Najšire korišten model opstruktivne apneje spavanja u glodavaca je intermitentna hipoksija (IH), izlaganje životinja periodima okolišne hipoksije u izmjenama s normalnim razinama kisika. Skupine glodavaca, najčešće miševa ili štakora, obično se drže u svojem svakidašnjem smještaju u kavezima te ih se izlaže kroničnim izmjenama niske i visoke razine kisika tijekom svijetle faze dana, kada glodavci obično spavaju. Najveća prednost ovog modela je da je lagan za izvedbu, visoko kontroliran i reproducibilan te omogućava izlaganje svih životinja u pokusu uniformnim uvjetima intermitentne hipoksije na velikom broju životinja tijekom produljenog trajanja izlaganja.

Najveće ograničenje modela intemitentne hipoksije je u tome što on ne simulira poremećaj spavanja prisutan u OSA-i. Iako u modelu IH postoji poremećaj arhitekture spavanja životinja izloženih tijekom svijetle faze dana, pokazano je kako miševi kompenziraju ovaj nedostatak sna tijekom noći (134).

Precizniji model intermitentne hipoksije dobiven je kad je hipoksija administrirana samo kada je na EEG-u miša verificirano spavanje (135). Ovom modelu uspjelo je biti precizniji od standardnog modela IH, no manjkale su mu druge prednosti - laka izvedba, velike brojke životinja uniformirano izloženih u isto vrijeme i reproducibilnost, što je ograničilo njegovu široku upotrebu.

Nedostatak istraživanja koja koriste model intermitentne hipoksije jest velika raznolikost u protokolima kroz veliki broj studija. Protokoli se razlikuju u vremenu izlaganja tijekom

dana, broju dana izlaganja, brzini pada kisika, razini kisika i trajanju perioda hipoksije. Ova heterogenost sprječava usporedbu rezultata različitih studija intermitentne hipoksije, te također otežava interpretaciju raznolikih nalaza, pogotovo s obzirom na to da je pokazano da neki protokoli IH djeluju detrimentalno, dok neki drugi, blaži, djeluju u smislu hipoksičnog prekondicioniranja (136). Suprotno mišljenju da različiti protokoli IH uzrokuju različite efekte, jedna studija pokazala je kako je korištenje dvaju različitih protokola s periodima hipoksije u trajanju od 90 sekundi i 30 minuta uzrokovalo iste efekte na ponašanje životinja s istim rezultatima analize tkiva obiju skupina životinja (134).

1.4.3 Saznanja o razvoju i značajkama upalnog odgovora mozga u modelu intermitentne hipoksije

Pokazano je kako kronična intermitentna hipoksija uzrokuje stvaranje slobodnih radikala kisika i dušika (ROS- *engl. reactive oxygen species*; RNO- *engl. reactive nitrogen species*) putem aktivacije nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze, ksantin oksidaze i mitohondrijske disfunkcije, te time potiče upalnu kaskadu u mozgu (137). U mišem modelu intermitentne hipoksije, kod životinja koje su imale inaktiviran gen za NADPH oksidazu, eksprimiran ponajprije u neuronima, ROS koncentracije bile su značajno manje a testovi ponašanja pokazali su kako miševi značajno manje pate od anksioznosti te bolje pamte (96).

ROS nakon signalne kaskade potiču aktivaciju transkripcijskih faktora nuklearnog čimbenika κB (NF-κB) i čimbenika induciranog hipoksijom α (HIF- *engl. hypoxia inducible factor*). Pokazano je kako intermitentna hipoksija uzrokuje odumiranje neurona osjetljivih na oksidativni stres, primarno hipokampalnih neurona regije *Cornu ammonis* 1 (CA1) i dentatnog girusa (DG) (95, 134). Posljedično, intermitentna hipoksija uzrokuje neurokognitivne deficite, primarno u vidu slabijih rezultatu na testovima učenja i pamćenja (81, 96, 134). Hipokampalni neuroni nakon intermitentne hipoksije povećavaju razine HSP 60 i 70, poznatih liganada za TLR2 (138). Pokazano je kako indukcija transkripcijskih čimbenika može biti i kompenzatorne prirode, a ne samo štetna. Primjerice, zna se kako NF- κB potiče ekspresiju IL- 6 i TNF-α (139) dok HIF- α potiče faktore rasta pokazane kao bitne u regeneraciji perifernih neurona (140).

S obzirom na dodirne točke patofiziologije OSA s drugim bolestima mozga, nekoliko autora impliciralo je mikrogliju kao bitni čimbenik u posredovanju efekata IH, no malo je studija direktno provjerilo ovu hipotezu (141). Moguće je da IH neposredno utječe na mikrogliju, pokrećući opisanu kaskadu stvaranja slobodnih radikala, no također moguće je da na mikrogliju CIH utječe indirektno, preko efekata koje ima na neurone (141). Periferna upala može indirektno aktivirati mikrogliju preko prolaska proinflamatornih molekula kroz krvno- moždanu barijeru, ili kroz aktivaciju preko vagalnih aferenata koji pokreću upalu središnjeg živčanog sustava (141). DAMP-ovi iz oštećenih stanica CNS-a također mogu aktivirati mikrogliju kroz interakciju sa receptorima za prepoznavanje obrazaca, poput TLR. TLR aktiviraju MAP kinazne- transkripcijski čimbenik signalne putove potrebne za ekspresiju mikroglijalnih upalnih gena. Neki autori također smatraju da postoje epigenetski efekti CIH kao što su miRNA, modifikacije histona te DNA metilacije (141).

1.5 Bioluminiscentno oslikavanje

1.5.1 Prednosti longitudinalnog *in vivo* praćenja

Longitudinalno *in vivo* praćenje omogućava proučavanje dinamike prirodnog procesa unutar iste jedinke kroz vrijeme. Velika prednost ove mogućnosti je bilježenje više vremenskih točaka koje se međusobno mogu sagledati u neposrednom odnosu, s obzirom da su sve bile prisutne unutar iste životinje. Proučavanje uzoraka žrtvovanih životinja omogućava nam proučavanje samo jednog trenutka u vremenu te je jedini način zaključivanja o uzročno- posljedičnim odnosima kroz statističke vrijednosti grupa žrtvovanih u različitim vremenskim točkama. Kod longitudinalnog modela životinje su žive te prolaze proces kroz vrijeme, kao i pacijent čiju bolest bismo htjeli modelirati. Najvažnije za proučavanje upale je upravo razumijevanje vremenske i prostorne dimenzije istraživanog procesa (142, 143). Svaka životinja u ovakvom pokusu može biti sama sebi kontrola, ako je mjerenje napravljeno prije i nakon nokse. Tada se u teoriji ne mora koristiti ni nezavisna kontrolna grupa, ili joj se brojevi mogu značajno smanjiti.

S obzirom da nije potrebna posebna grupa životinja za svaku vremensku točku te da se kontrolna skupina može smanjiti, značajno se smanjuje broj korištenih životinja te se

istraživanje vodi načelom zamjene, smanjenja te optimizacije rada s životinjama u dobroj laboratorijskoj praksi (*engl*. 3R: *replacement, reduction, refinement*).

1.5.2 Principi snimanja bioluminiscencije

Za potrebe bioluminiscentnog oslikavanja koristi se kemijska reakcija enzima luciferaze te njenog supstrata luciferina. Luciferaza je zajednički naziv za porodicu oksidativnih enzima koji stvaraju bioluminiscenciju (Tablica 1.1). U reakciji oksidacije luciferin se, uz prisutnost luciferaze krijesnice, u dva koraka pretvara u inertni oksi-luciferin u prisustvu ATP-a te se pritom oslobađaju fotoni svjetlosti koji se koriste za bilježenje specifičnog signala (144).

luciferin + ATP → luciferil adenilat + PP_i

luciferil adenilat + O_2 → oxiluciferin + AMP + svjetlost

Različite vrste luciferaza prisutne su u prirodi u različitim organizmima (Tablica 1.1) te njihove reakcije emitiraju svjetlost različitih valnih duljina. Na početku bioluminiscentnog oslikavanja koristila se samo luciferaza krijesnice Photinus pyralis, no sada postoji tehnička mogućnost kombiniranja različitih vrsta luciferaza, u istom transgeničnom organizmu ili staničnoj liniji. Nadalje, neke luciferaze stvaraju signal koji je i do nekoliko stotina puta jači od početno korištene zelene luciferaze krijesnice, te se također razlikuju u dinamici emisije svjetla (145). Dok neke luciferaze brzo metaboliziraju supstrat i stvore „bljesak“, druge sporo oksidiraju te imaju plato signala a njihova je svjetlost dugotrajnija.

Vrsta luciferaze	Latinski naziv životinje	Spektar emitirane svjetlosti (nm)	Boja svjetlosti	Supstrat
Zelena luciferaza krijesnice	Photinus pyralis	557	Zelena	D- luciferin
Crvena luciferaza krijesnice	Luciola Italica	609	Crvena	D- luciferin

Zelena luciferaza krijesnice	Luciola Italica	560	Zelena	D- luciferin
Renilla luciferaza (meduza)	Renilla reniformis	530-480	Zelena/plava	Coelenteratin
Gaussia luciferaza (račić veslonožac)	Gaussia Princeps	482	Plava	Coelenteratin
Vargula luciferaza (račić ljuskar)	Vargula Hilgendorfii	460-395	Ljubičasta	Vargulin/ Cypridina luciferin
Metridia luciferaza (račić veslonožac)	Metridia longa	480	Plava	Coelenteratin

Tablica 1.1 **Prikaz vrsta luciferaza prisutnih u prirodi te opis njihovih karakteristika**. *Podaci preuzeti s (http://www.targetingsystems.net/drug-discovery.php).*

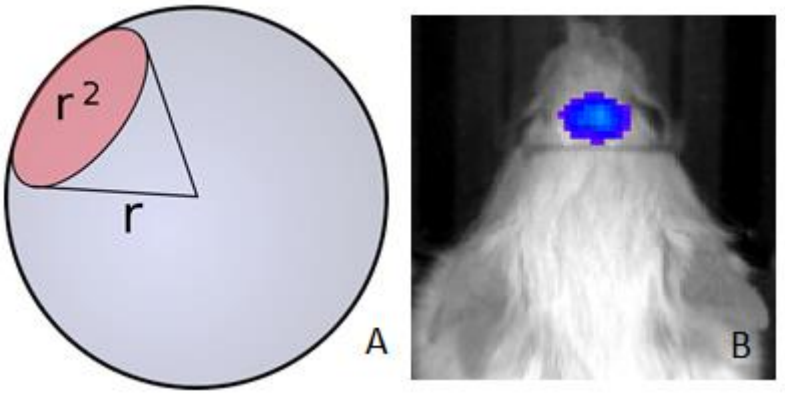
Bioluminiscentno oslikavanje najčešće se koristi u transgeničnim modelima „reporterskih gena“ pomoću kojih se proučava *in vivo* izražaj gena od interesa. Bioluminisceno oslikavanje koristi se u onkološkim i imunološkim mišjim modelima gdje se bilježi utjecaj terapije ili druge intervencije na širenje ili smanjenje signala. Također, često je korištenje bioluminiscentnih staničnih linija koje počinju davati signal tek nakon specifične diferencijacije ili specifičnih procesa od interesa (146). Bioluminiscencija je pogodna metoda i u neuroznanosti, te omogućuje praćenje procesa u neurološkim poremećajima kroz vrijeme (142, 143, 147).

1.5.3 Prednosti i nedostaci snimanja bioluminiscencije u usporedbi s fluorescencijom

Bioluminiscentno oslikavanje uzelo je zamaha pojednostavljivanjem i pojeftinjenjem stvaranja transgeničnih stanica i organizama kojima je pod promotorom od interesa bilo moguće ugraditi enzim krijesnice. Za razliku od fluorescentnog signala, bioluminiscentni signal daje informaciju o prisutnosti ATP-a u stanici, dakle o procesu koji se može odviti samo u živom organizmu, dok fluorescentna molekula otpušta fotone svjetlosti neovisno o

prisutnosti ATP-a. Nadalje, da bi fluorescentni biljeg ili kemikalija otpustila fotone i dala fluorescentni signal, uzorak je potrebno podražiti svjetlošću veće energije i kraće valne duljine. Ovo se u biomedicinskim istraživanjima najčešće izvodi pomoću lasera ili fluorescentne lampe (lampe od ksenona, žive ili LED lampe). Za razliku od toga, bioluminiscencija ne zahtjeva vanjsko podraživanje, već je posljedica intrinzičnog kemijskog procesa. Ovisno o primjeni, svaka od ovih metoda ima svoje prednosti. U *in vivo* oslikavanju prednost bioluminiscencije je signal visoko specifičan za istraživani proces te gotovo nikakav nespecifični signal, tj. nema pozadinskog šuma. Za razliku od toga, fluorescentni signal može u živoj životinji biti zamijenjen autofluorescencijom (npr. hemoglobina) zbog toga što je uz molekulu interesa potrebno podražiti cijelo tkivo pomoću svjetlosti više energije. Energije bioluminiscentnog svjetla puno su niže te su potrebne duže ekspozicije, dok signal ima manju penetraciju kroz tkivo. Pri fluorescentnom oslikavanju signal je puno intenzivniji, vrijeme akvizicije je kraće a penetracija kroz tkivo dublja, što znači da se *in vivo* mogu bilježiti i signali duboko u abdominalnoj šupljini miša (143, 148).

Zbog svoje prirode, svjetlost se širi ravnomjerno u svim smjerovima, poput sfere. Bioluminiscentni signal bilježimo na površini životinje, iako izvire iz vrlo lokaliziranog središta u dubini tkiva te može biti zabilježen na relativno velikoj površini kože (Slika 1.1). Što je signal bliži površini životinje (koži) to je lokaliziraniji, te obrnuto, što je signal dublje, to je naša mogućnost za preciznu lokalizaciju 2 D signala manja. Iz ovog razloga, prikupljeni signal se računa u mjernoj jedinici [p/s/cm2/sr] gdje p označava foton, s sekundu, zajedno p/s jest intenzitet signala u pojedinoj vremenskoj točki, nadalje cm^2 se odnosi na površinu definirane regije interesa dok je sr prostorni kut na plohi kugle, čiji se vrh nalazi u središtu kugle. Steradijan je bezdimenzionalna jedinica koja se koristi upravo zbog gore opisanog fizikalnog svojstva rasapa svjetlosti.



Slika 1.1 **Fizikalno svojstvo rasapa bioluminiscennog signala**. *(A) shema pojma steridijan, važnog za izračun rasapa bioluminiscentnog signala iz dubine tkiva na površinu (preuzeta sa https://en.wikipedia.org/wiki/Steradian). (B) primjer oslikavanja bioluminiscentnog signala.*

Da bismo pokušali odrediti dubinu signala koristi se tomografija oslikavanja difuzne svjetlosti (DLIT - *engl. diffuse light imaging tomography*). U primjeru zelene svjetlosti krijesnice, emitirana svjetlost je valne duljine između 500 i 650 nm. Hemoglobin apsorbira svjetlost do 600 nm, te se ta svjetlost ne može koristiti za ovu metodu. Svjetlost valne duljine od 600 nm do 650 nm se pomoću korištenja filtara razlaže na nekoliko diskretnih varijabli. S obzirom da filtri bilježe svjetlost različitih valnih duljina, dobivaju se slike različitih intenziteta i površina signala na površini kože. Uz informaciju o dubini koju svjetlost pojedine valne duljine može penetrirati te zabilježeni signal pomoću filtara, DLIT metoda može rekonstruirati dubinu i intenzitet izvora signala.

1.5.4 Mišji model korišten za snimanje bioluminiscencije

Za longitudinalno *in vivo* praćenje ekspresije TLR2 gena u mozgu životinja izloženih i ne izloženih intermitentnoj hipoksiji, korištena je trensgenična mišja linija albino C57Bl/6-*Tg(TLR2-luc/gfp)*. Ova linija razvijena je u laboratoriju prof. Križ na Sveučilištu Laval u Quebecu (147). Miševima linije C57Bl6 ugrađen je transgen vođen promotorom gena TLR2 te je iza njega ugrađen gen za zeleni fluorescentni protein (GFP *engl. green fluorescent protein*) te gen za luciferazu. U našem uzgoju linija je povratnim križanjem prebačena na C57Bl6 albino podlogu (detaljno opisano u Metodama).

Transgenična linija se generira tako da se fragment DNA koji pripada mišjem TLR2 promotoru umnoži metodom lančane reakcije polimeraze (PCR *engl. polymerase chain reaction*) te se fragmenti inkorporiraju u unutrašnje ribosomalno mjesto ulaza (IRES *engl. internal ribosome entry site*) vektor. Zatim se fragmenti reporterskih gena za luciferazu i GFP također ugrađuju u isti IRES rekombinantni vektor. Transgenični konstrukt građen od *Tlr2* promotor- luciferaza- GFP transgena zatim se izolira te se mikroinjekcijom inicira u muški pronukleus oplođene C57BL/6 oocite (147).

S obzirom da je regulacija ekspresije enzima luciferaze krijesnice pod regulacijom promotora TLR2, svi biološki čimbenici koji dovode do aktivacije promotora TLR2 u slučaju opisanog eksperimentalnog transgeničnog modela također dovode i do ekspresije luciferaze. Životinja ne odašilje fotone konstitutivno, već samo u prisutnosti dodatnog supstrata luciferina (147). Luciferin se životinji administrira izvana, intraperitonealnom, supkutanom ili intravenskom injekcijom. S obzirom da je količina fotona generirana ovom kemijskom reakcijom zanemariva u usporedbi sa razinom svjetlosti koju ljudsko oko može percipirati, za bilježenje i kvantifikaciju svjetlosti koja proizlazi iz ove reakcije potrebna je specijalna oprema. Sustav za snimanje bioluminiscencije se sastoji od tamne komore te iznimno osjetljive kamere s nabojem spregnutog sklopa (CCD- *engl. charge-coupled device*) hlađene na -90^{o}C. Unutar tamne komore pomična platforma omogućava približavanje i udaljavanje od kamere čime se određuje broj snimanih životinja koji može biti između 1 i 5. U komori je omogućeno održavanje temperature žive anestezirane životinje putem grijane platforme te kontinuirana inhalacijska anestezija koja je pod kontrolom vanjskog sustava za miješanje anestetika. Važno je da su životinje inicirane i tretirane na jednak način s obzirom da biodostupnost luciferina može utjecati na brzinu razlaganja te jačinu zabilježenog signala. Tjelesna temperatura te dubina anestezije također imaju utjecaja na metabolizam luciferina te mogu utjecati na bioluminiscentni signal.

2 HIPOTEZA

Hipoteza ovog rada bila je da u mišjem modelu opstruktivna apneja spavanja zbog kronične intermitentne hipoksije dovodi do upalnog odgovora mozga koji se može pratiti postupcima *in vivo* snimanja. Na osnovu ove hipoteze postavljen je opći cilj rada.

3 CILJEVI RADA

Opći cilj bio je potvrditi utjecaj intermitentne hipoksije na vremenski tijek i značajke neuroinflamacije koristeći suvremene metode oslikavanja mozga

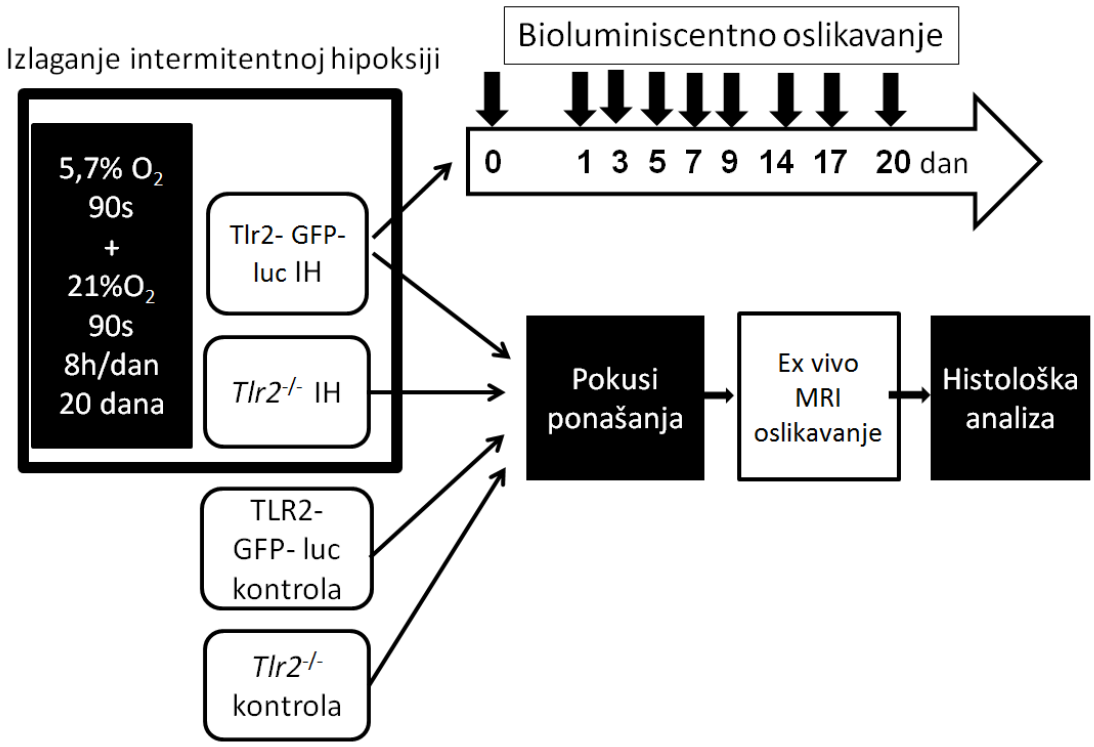
Specifični ciljevi ovog rada bili su:

1. Utvrditi razvoj strukturnih i funkcionalnih promjena tijekom kronične intermitentne hipoksije u miša postupcima MRI i bioluminiscentnog oslikavanja.
2. Korelirati rezultate slikovnih nalaza s histološkim i imunohistokemijskim rezultatima unutar pojedinih skupina miševa.
3. Utvrditi ulogu i vremenski raspored indukcije TLR2, proteina koji sudjeluje u aktivaciji mikroglije, korištenjem transgeničnog mišjeg modela.

4 MATERIJALI I METODE

4.1 Pregled metoda korištenih u disertaciji

Metode korištene u ovoj disertaciji povezane su s planom pokusa koji služe odgovoru na opće i specifične ciljeve. Povezanost metoda i plana pokusa prikazana je na slici 2.1.



Slika 2.1 **Vizualni sažetak metoda korištenih u disertaciji.**

4.2 Pokusne životinje

4.2.1 Usklađenost s etičkim smjernicama i zakonskim propisima

Svi pokusi provedeni su na osnovi dopusnice Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, broj 380-59-10106-14-55/230. Svi postupci su poduzeti kako bi se smanjio broj korištenih životinja te patnja životinja uključenih u pokus. Dora Polšek je završila tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama, kategorije 3, te posjeduje dozvolu za rad s laboratorijskim životinjama br. 75.3-13, HR 191/02/P.

4.2.2 Mišje linije

U izradi pokusa opisanih u tekstu korištene su mišje linije:

- C57BL/6-*Tyr*$^{c\text{-}2J}$(Cg)-*Tg(Tlr2-luc/gfp) 275S Kri*

C57BL/6-*Tyr*$^{c\text{-}2J}$(Cg)-*Tg(Tlr2-luc/gfp) 275S Kri* je linija C57BL/6 albino miševa na čijoj je podlozi ugrađen transgenični konstrukt Tlr2- GFP- luc kako je opisano u radu Lalancette-Hebert, 2009 (147). Mišju liniju je na korištenje ustupila prof. dr. sc. Jasna Križ sa Sveučilišta Laval, Québec, Kanada. Transgenična mišja linija C57BL/6-*Tyr*$^{c\text{-}2J}$(Cg)-*Tg(Tlr2-luc/gfp) 275S Kri* (u daljnjem tekstu TLR2) korištena je u svim opisanim pokusima. Miševi ove linije heterozigoti su za navedeni transgen dok na drugom alelu nose funkcionalni gen TLR2 te se uzgajaju sparivanjem heterozigotnih nositelja konstrukta i homozigotnih C57BL/6-*Tyr*$^{c\text{-}2}$*(Cg) miševa*.

Linija C57BL/6-*Tg(Tlr2-luc/gfp) 275S Kri* je 2011. godine dopremljena u uzgoj Nastambe za laboratorijske životinje Hrvatskog instituta za istraživanje mozga te održavana kroz parenja s mišjom linijom C57BL/6 iz Nastambe. Linija je 2015. godine u uzgoju Nastambe za laboratorijske životinje Hrvatskog instituta za istraživanje mozga povratnim križanjem prebačena na podlogu C57Bl6 albino putem parenja s linijom C57BL/6-Tyr$^{c\text{-}2J}$(Cg) (Charles River, SAD) radi tehničkog poboljšavanja bilježenja fotona koji teže prolaze kroz pigmentirano crno krzno životinje negoli kroz bijelo krzno albino životinje.

- C57BL/6-*Tlr2*^{tm1Kir}

C57BL/6(Cg)-*Tlr2*^{tm1Kir} je linija C57BL/6 albino miševa s onemogućenim genom TLR2 na oba alela, nabavljena od tvrtke The Jackson Laboratory (Maine, SAD) (u katalogu tvrtke također označena i kao soj B6.129-Tlr2^{tm1Kir}/J). Miševi ove linije u daljnjem tekstu označavati će se kraticom TLR2$^{-/-}$. Linija se od 2011. uzgaja u Nastambi za laboratorijske životinje Hrvatskog instituta za istraživanje mozga sparivanjem jedinki iste linije.

Svi korišteni miševi bili su muškog spola, starosti 2-4 mjeseca uzgojeni u Nastambi za laboratorijske životinje Hrvatskog instituta za istraživanje mozga. Ciklus dan- noć bio je definiran na 12 h- 12 h: svjetla faza od 7 h ujutro do 19 h te mračna faza od 19 h do 7 h. Hrana i voda bile su dostupne *ad libitum*, životinje su bile smještene u prozirnim polisulfonskim kavezima Europskog standarda tipa 3, dimenzija 425 mm dužine x 266 mm

širine x 155 mm visine i površine poda 820 cm^2 s pripadajućim rešetkastim metalnim poklopcem (1290D, Tecniplast, Italija). Životinje su smještene u broju do 10 jedinki po kavezu, dok je stelja mijenjana svakog drugog dana. Pri transportu u prostoriju za bioluminiscentno oslikavanje i izlaganje intermitentnoj hipoksiji mišji kavezi su zatvoreni poklopcem s poliesterskim filtrom i sigurnosnim pričvrsnicama (400SU, Tecniplast, Italija).

4.2.3 Brojevi životinja korištenih u istraživanju

Ukupni broj životinja korišten u provedbi svih pokusa opisanih u ovoj disertaciji iznosio je 87 životinja, 38 za bioluminiscentno oslikavanje (N(TLR2 IH)= 26; N(TLR2 CTRL)=12) i 49 za drugi dio pokusa gdje su iste životinje korištene za testove ponašanja, MRI i imunohistokemiju (N(TLR2 IH) = 15; N(TLR2-/- IH) = 15; N(TLR2 CTRL) = 11; N(TLR2-/- CTRL) = 8). Broj životinja korišten za pojedine eksperimente opisan je u tablici 2.1.

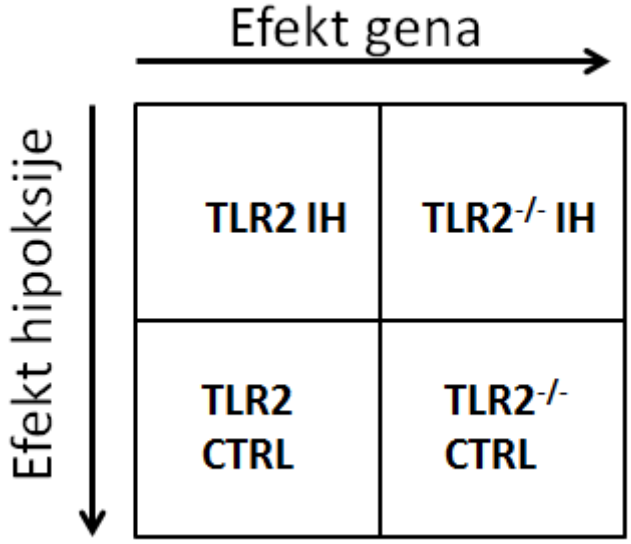
Eksperiment	Podeksperiment	N(TLR2 IH)	N(TLR2 CTRL)	N($TLR2^{-/-}$ IH)	N($TLR2^{-/-}$ CTRL)
Bioluminiscentno oslikavanje	Ukupno	**26**	**12**		
	In vivo	20	6	-	-
	Ex vivo in toto	3	3	-	-
	Ex vivo rezovi	3	3	-	-
Testovi ponašanja, MRI oslikavanje, Imunohistokemija	Ukupno	**15**	**11**	**15**	**8**
Testovi ponašanja		15	11	15	8
	Otvoreno polje	13	11	15	8
	Test visenja na repu	15	9	12	7
	Y labirint	12	11	12	7
MRI oslikavanje		15	11	15	8
Imunohistokemija		15	11	15	8

	Iba1	8	8	8	4
	cFos	5	4	7	4
	GFAP	5	3	6	4
	Nissl (apoptoze)	8	7	-	-
Ukupni broj korištenih životinja		**41**	**23**	**15**	**8**

Tablica 2.1. **Prikaz broja životinja korištenih za pojedine pokuse.** *Iste životinje korištene su za testove ponašanja, MRI oslikavanje i histološku analizu (brojevi otisnuti su **masno**). Razlike u brojevima životinja korištenih za pojedine testove proizlaze iz tehničke izvedbe ponašajnih pokusa i serija rezova korištenih za imunohistokemiju.*

4.2.4 Plan pokusa

Nakon pilot-pokusa kojim se potvrdilo oslikavanjem bioluminiscencijom da gen TLR2 sudjeluje u upalnom odgovoru mozga nakon intermitentne hipoksije (N(TLR2 IH) = 20; N(TLR2 CTRL) = 6), daljnji je pokus dizajniran s četirima skupinama. Skupine TLR2 te TLR2 $^{-/-}$ bile su izložene intermitentnoj hipoksiji (TLR2 IH, TLR2$^{-/-}$ IH) dok su dvije skupine miševa, također s i bez gena TLR2 bile korištene kao kontrolne skupine (TLR2 CTRL, TLR2$^{-/-}$ CTRL) (Slika 2.2).



Slika 2.2. **Dizajn pokusa s četirima skupinama životinja.** *Korištene 4 skupine omogućavaju odvojeno zaključivanje o efektu hipoksije i o efektu gena TLR2.*

Za sve MRI i histološke analize korištene su iste životinje koje su bile uključene u ponašajne pokuse. Razlike u brojevima životinja u pokusima ponašanja posljedica su izbacivanja pojedinih životinja iz obrade podataka zbog tehničke nemogućnosti evaluacije rezultata automatiziranim programom za analizu video-snimke pokusa, kako je opisano u pripadajućem odlomku. Razlike u brojevima životinja u imunohistokemijskom brojanju posljedica je korištenja određenog broja serija rezova a ne svih raspoloživih životinja uključenih u prethodne pokuse.

4.2.5 Genotipizacija miševa

S obzirom da je TLR2-linija heterozigotna za TLR2- GFP- luc-transgen, svako leglo linije TLR2 bilo je genotipizirano metodom lančane reakcije polimeraze (PCR - *engl. polymerase chain reaction*) te su nosioci TLR2-GFP-luc-transgena korišteni u pokusima. $TLR2^{-/-}$ miševi nisu bili genotipizirani s obzirom na to da se radi o homozigotnoj liniji.

DNA je dobivena iz vrha repa uzetog pri odvajanju mladunaca od majke pri jednom mjesecu starosti. Tkivo repa razgrađeno je s 500 µl pufera za razgradnju (*engl. lysis buffer*) (400 ml: 20 mL 1M Tris (pH = 8.0); 80 mL 0,5 M EDTA (pH = 8,0); 40 mL 10% SDS; 40 mL

proteinaze K; 220 mL ultra-čiste vode). Uzorci su u navedenom puferu inkubirani preko noći na 56°C, te čuvani na +4 °C do izvođenja genotipizacije.

Po uzorku, reakcijska otopina za PCR sadržavala je:

− 1 µl DNA
− 1 µl 20 mM kontrolnih početnica E15 H5 5'ACTGTGGGGAGACACAAAGG 3' te E15 H3 5' TCTACCAGGCCGAGT 3' (Microsynth, Švicarska)
− 1 µl 20 mM početnica specifičnih za mišju liniju TLR2-GFP-luc:
5'CAGCAGGATGCTCTCCACTTC3' (Promega, SAD) i
5'GGCGCAGTAGGCAAGGTGGT 3' (Microsynth, Švicarska)
− 1µl 25 mM $MgCl_2$ (Promega, USA)
− 0,5 µl 10 mM dNTP Mix (U1515, Promega, SAD)
− 5µl 5X Green Go Taq reakcijskog pufera (M791A, Promega, SAD)
− 0,30 µl 5 U/µl Taq DNA polimeraze (Promega, SAD)

Za PCR reakciju korišten je slijed od nekoliko koraka:

početna denaturacija (4 minute na 94 °C), 30 ciklusa ponavljanja denaturacije (30 sekundi na 94 °C) i lijepljenja početnica (30 sekundi na 63 °C), produljivanja lanaca (45 sekundi na 72 °C), i završna polimerizacija nedovršenih lanaca DNA (7 minuta na 72 °C).

Rezultati lančane reakcije polimerazom vizualizirani su elektroforezom na 1,8% agaroznom gelu. Gel je pripremljen miješanjem agaroze s 1 x TBE puferom za elektroforezu (Tris-baza 89mM; borna kiselina 89 mM; 2mM EDTA). Nakon zagrijavanja, u otopinu je dodana crvena boja za gel (Biotium, SAD) u razrjeđenju 1/10 000. Gel je izliven u kadice za elektroforezu, a nakon polimerizacije gela u jažice su naneseni uzorci DNA. Pufer za migraciju tijekom elektroforeze bio je također 1 x TBE. Elektroforeza se odvijala pod naponom od 10-15mV/cm gela.

4.3 Protokol izlaganja intermitentnoj hipoksiji

Za izlaganje pokusnih životinja intermitentnoj hipoksiji korištena je komora vlastite proizvodnje opisana u Rezultatima. Protokol izlaganja pokusnih životinja niskim razinama

kisika definiran je prema Xu et al. 2004, te je reguliran na 5,7 % u periodima u trajanju od 90 sekundi koji će se izmjenjivati s periodima također dugim 90 sekundi u kojima će razina kisika u komori biti 20,7 %, tj. normalna razina kisika u zraku (95). Protokol je trajao 8 sati dnevno tijekom 20 dana za redom te se provodio s početkom između 8 i 9 sati ujutro i završavao tijekom 16 i 17 sati poslije podne kako bi koincidirao sa svijetlom fazom dana u kojoj miševi obično spavaju. Kontrolnom skupinom rukovano je na isti način, ali bez izlaganja intermitentnoj hipoksiji. Životinje su bile transportirane svaki dan u sobu za pokus, izložene istoj razini buke, svjetlosti, vlage u zraku i ostalim mogućim zbunjujućim čimbenicima.

4.4 Određivanje težine životinja

Kako bi se utvrdila promjena težine tijekom protokola intermitentne hipoksije, životinje su vagane svaka 3 dana te su za potrebe međusobnog uspoređivanja težine normalizirane tako što je apsolutna težina svakog mjerenja bila podijeljena početnom težinom te životinje.

4.5 Snimanje bioluminiscencije

4.5.1 *In vivo* snimanje bioluminiscencije

Bioluminiscentno oslikavanje izvedeno je opremom *In vivo* imaging system (IVIS) u proizvodnji firme Perkin Elmer, SAD.

4.5.2 Vremenske točke oslikavanja

Grupa transgeničnih miševa (N (TLR2 IH) =20) oslikana je prije izlaganja intermitentnoj hipoksiji. Na taj način je svaki miš bio sam sebi kontrola za snimanja u daljnjim vremenskim točkama. Miševi su oslikani 1., 3., 5., 7., 9., 11., 14., 17. i 20. dana izlaganja intermitentnoj hipoksiji. Skupina transgeničnih miševa koja nije izlagana intermitentnoj hipoksiji (N (TLR2 CTRL)= 6) oslikana je 5 puta tijekom protokola kako bi se provjerila konstantnost signala bez intervencije te mogući učinak rukovanja, transporta i zvukova pokusa na TLR2 signal.

4.5.3 Administracija luciferina

Prah luciferin (XenoLight D-Luciferin - K^+, Perkin Elmer, SAD) je pripremljen u fosfatnom puferu (PBS - *engl. phosphate buffered saline*) kao otopina za skladištenje u koncentraciji od 15 mg/ml. Otopina je pohranjena u Eppendorf-bočice od 1 ml, zaštićena od svjetla aluminijskom folijom te smrznuta do daljnje upotrebe. Prije početka snimanja, otopina luciferina je odmrznuta, životinje su izvagane te je primjenjeno 20µl/g luciferina. Doziranje luciferina temeljeno je na objavljenom testiranju raznolikih doza luciferina i procjeni najboljeg omjera bioluminiscentnog signala i potrošene kemikalije (148). Otopina je administrirana intraperitonealnom injekcijom u donji desni kvadrant abdomena putem igle od 24G te šprice od 1 ml.

4.5.4 Anestezija pri oslikavanju

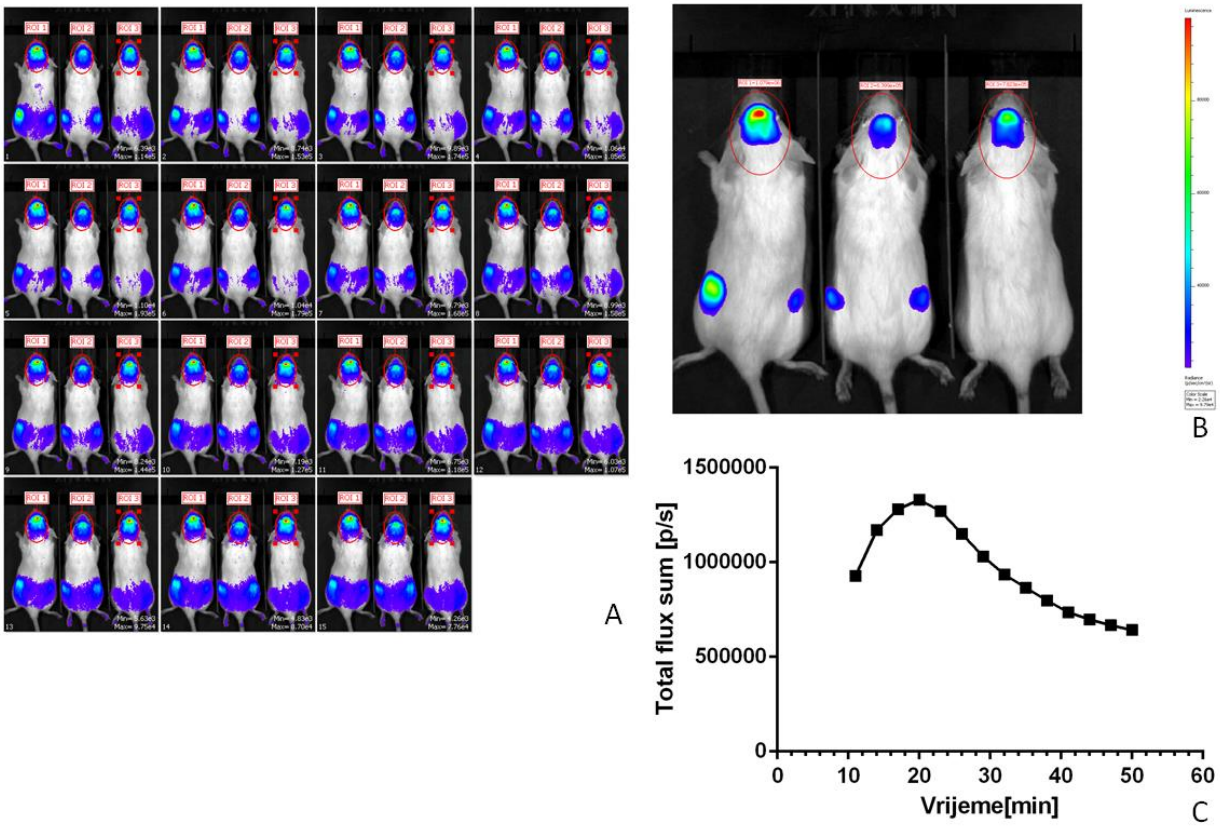
Nakon administracije luciferina miš je prebačen u komoru za anesteziju. Za uvođenje u anesteziju korišten je 3% izofluran (Octal Pharma, Hrvatska) u komprimiranom zraku (Messer, Hrvatska) pomiješan u sustavu za anesteziranje malih životinja (XGI- 8 anesthesia system, Thermo Fisher). Nakon što se miš vidljivo prestao gibati u komori te pri hvatanju za rep nije pokazivao nikakvu reakciju, premješten je u tamnu komoru za snimanje bioluminiscencije. Period uvođenja u anesteziju obično je trajao između 3 i 5 minuta ovisno o tjelesnoj težini i uzbuđenosti miša. Pri postavljanju u IVIS, njuška miša je odmah postavljena u izvod unutrašnjeg sustava za anesteziju kako se životinja ne bi probudila. Za održavanje anestezije tijekom snimanja korištena je koncentracija izoflurana između 0,75 % i 1,5 % u mješavini zraka, u ovisnosti o tjelesnoj težini miša i prema iskustvu istraživača. Sustav za anesteziju koristio je i odsis viška anestetika te njegovo otpuštanje kroz filtar od medicinskog ugljena (Omnicon f/air, Bickford, SAD), kako bi se smanjilo nakupljanje anestetika unutar komore za oslikavanje i u prostoriji za bioluminiscentno oslikavanje te se time poremetila preciznost održavane koncentracije anestetika ili dovelo u opasnost zdravlje istraživača. 2 minute prije kraja oslikavanja anestezija je ugašena kako bi se životinje probudile u što kraćem roku nakon pokusa.

4.5.5 Protokol oslikavanja

Protokol oslikavanja prema Aswend et al. 2012 modificiran je kroz diskusiju s navedenim autorima (148). Primijenjen je protokol snimanja u trajanju od 45 minuta s 15 ekspozicija u trajanju po 3 minute bez pauza između ekspozicija. Snimana su po 3 miša odjednom na povećanju „C“ sustava IVIS koji odgovara odmaku pokretne platforme od kamere od 13 cm (Slika 2.3.A). Nakon pozicioniranja miševa unutar IVIS sustava, a prije protokola oslikavanja bioluminiscentnog signala napravljena je crno-bijela fotografija ekspozicije 0,2 s i fokusa 1,5 cm iznad razine platforme.

4.5.6 Izračun signala bioluminiscentnog *in vivo* oslikavanja

Rezultati oslikavanja prikazani su u programskom sučelju Living Image verzije 4.3.1 (PerkinElmer, SAD) povezanom sa sustavom IVIS. Program je rezultate prikazao kao lažno obojanu mapu gustoće fotona superponiranu na crno bijelu fotografiju. U programu je definirana regija interesa ovalnog oblika površine 4,35 cm^2 koja je ručno postavljena tako da prekrije glavu pojedinog miša (Slika 2.3.B). U toj regiji miša izračunat je ukupni signal u mjernoj jedinici [p/s/cm2/sr] za svaku pojedinu ekspoziciju. Zatim su vrijednosti svih ekspozicija u 45 minutnom protokolu zbrojene za pojedinog miša čime je dobivena vrijednost „zbroj ukupnog protoka“ (*engl. total flux sum*). Također je izrađenakrivulja intenziteta signala u vremenu od 45 minuta koja je na x-osi prikazivala vrijeme, a na y-osi intenzitet signala pojedine ekspozicije (Slika 2.3.C). Nagib krivulje davao je informaciju o brzini resorpcije luciferina u krvotok, prolasku krvno-moždane barijere te njegovom ispiranju iz sustava. Krivulja je korištena za okvirnu procjenu uspješnosti injekcije i brzine metaboliziranja luciferina te testiranje eventualnih odstupanja zbog greške u dubini injekcije ili metaboličkih razlika među miševima prema kriterijima visine u uobičajenom rasponu signala između 0,5 x 10^7 i 3,0 x 10^7 p/s i zvonastog oblika krivulje (Slika 2.3.C).



Slika 2.3. **Snimanje i kvantifikacija bioluminiscencije.** *(A) Životinje su snimane po tri odjednom u seriji od 15 slika s ekspozicijom od 3 minute. (B) Regija interesa ovalnog oblika površine 4,35 cm^2 ručno je postavljena na svaku sliku za svaku životinju. (C) Kvantifikacija metabolizma luciferina tijekom 45 minuta snimanja za pojedinu životinju, svaka točka označava kvantifikaciju signala s jedne slike za 15 slika iste životinje kroz vrijeme. Vidljiv je maksimum signala luciferaze oko 20. minute akvizicije te uobičajen zvonasti oblik krivulje metabolizma luciferina.*

4.6 3D rekonstrukcija bioluminiscentnog in vivo oslikavanja

Za 3D rekonstrukciju bioluminiscenog signala korištena je tomografija oslikavanja difuzne svjetlosti. Za ovu metodu rađena su snimanja odvojena od prethodno opisanih kvantifikacijskih *in vivo* snimanja. Šest miševa također uključenih u *in vivo* kvantifikacijski pokus podvrgnuto je snimanju dan prije i dva dana nakon intermitentne hipoksije. Postupci administracije luciferina i anestezije bili su identični prethodno opisanima. Protokol je bio podešen tako da sustav bilježi svjetlost različitog raspona valnih duljina korištenjem 2 filtra

koja propuštaju svjetlost između 600-620 nm i 620- 640 nm. Program je automatski prepoznao površinu bijelog miša zbog kontrasta s crnom podlogom. Dvije slike kombinirane su s podacima o penetraciji svjetlosti različitih valnih duljina kroz tkivo kako bi se rekonstruirao 3D izvor signala prethodno zabilježenog 2D kvantifikacijskim protokolom.

4.7 *Ex vivo* snimanje bioluminiscencije

Kako bismo poboljšali prostornu razlučivost bioluminiscentnog signala, primijenjen je eksperimentalni protokol kojim je bilježen bioluminiscentni signal mozga miša nakon žrtvovanja životinje i izolacije mozga.

4.8 Oslikavanje ex vivo in toto

Administracija luciferina bila je identična administraciji pri bioluminiscentnom longitudinalnom *in vivo* praćenju. Životinje su nakon injekcije puštene da se slobodno kreću u kavezu tijekom 10 minuta te su potom žrtvovane cervikalnom dislokacijom te su njihovi mozgovi izolirani iz lubanje i stavljeni u petrijevu zdjelicu s medijem DMEM (D6046, Sigma- Aldrich, SAD). Vrijeme od injekcije do žrtvovanja definirano je na temelju studije koja opisuje maksimalni metabolizam luciferina u mozgu 15 minuta od intraperitonealne injekcije (Lalancette-Hebert et al. 2009) i na temelju brzine od trenutka žrtvovanja do početka snimanja protokola koje je trajalo otprilike 3 minute.

Prije bilježenja bioluminiscentnog signala napravljena je crno-bijela fotografija ekspozicije 0,2 s i fokusa 0,5 cm iznad razine platforme. Vrijeme ekspozicije bioluminiscentnog signala bilo je 3 minute na povećanju „A“ sustava IVIS koji odgovara odmaku pokretne platforme od kamere od 3,9 cm. Rezultati oslikavanja prikazani su u programskom sučelju Living Image povezanom sa sustavom IVIS. Program je rezultate prikazao kao lažno obojanu mapu gustoće fotona superponiranu na crno-bijelu fotografiju. Rezultati su korišteni za kvalitativnu procjenu lokalizacije bioluminiscentnog signala.

4.8.1 Oslikavanje *ex vivo* rezova mozga

Administracija luciferina bila je identična administraciji pri bioluminiscentnom longitudinalnom *in vivo* praćenju. Životinje su nakon injekcije puštene da se slobodno kreću u kavezu tijekom 3 minute, nakon čega su bile žrtvovane cervikalnom dislokacijom. Vrijeme od injekcije do žrtvovanja definirano je na temelju studije koja opisuje maksimalni metabolizam luciferina u mozgu 15 minuta od intraperitonealne injekcije (147) i na temelju trajanja rezanja mozga i prijenosa do mjesta oslikavanja koje je trajalo otprilike 12 minuta.

Nakon izolacije mozak je na 1 minutu stavljen u gotovo smrznutu otopinu koja simulira umjetni likvor bez NaCl (238 mM saharoze; 10 mM D- glukoze; 1 mM NaH_2PO_4; 26 mM $NaHCO_3$; 1,3 mM $MgCl_2$; 2,5 mM KCl; 2 mM $CaCl_2$) kako bi se stvrdnuo za rezanje.

Mozak je vibratomom (Vibratome 1000Plus, Biosurplus, SAD) narezan na rezove debljine 300μm. Pri rezanju tkivo je bilo uronjeno u oksigeniranu otopinu koja simulira umjetni likvor (119 mM NaCl; 10 mM D- glukoze; 1 mM NaH_2PO_4; 26 mM $NaHCO_3$; 1,3mM $MgCl_2$; 2,5 mM KCl; 2 mM $CaCl_2$) kako bi se biološki procesi mogli nastaviti u tkivu *ex vivo*.

Rezovi su prebačeni u sustav IVIS, plutajući u otopini koja simulira umjetni likvor. Prije bilježenja bioluminiscentnog signala napravljena je crno-bijela fotografija ekspozicije 0,2 s i fokusa 0,2 cm iznad razine platforme. Vrijeme ekspozicije bioluminiscentnog signala bilo je 3 minute na povećanju „A“ sustava IVIS, koji odgovara razmaku platforme i kamere od 4 cm. Rezultati oslikavanja prikazani su u programskom sučelju Living Image povezanom sa sustavom IVIS. Program je rezultate prikazao kao lažno obojanu mapu gustoće fotona superponiranu na crno-bijelu fotografiju. Rezultati su korišteni za kvalitativnu procjenu lokalizacije bioluminiscentnog signala.

4.9 Testovi ponašanja miševa

Svi testovi ponašanja miševa izvedeni su s početkom oko 20h kada je životinjama nastupila mračna faza dnevnog ciklusa koja je započela gašenjem svjetala s početkom u 19h. S obzirom na to da su miševi noćne životinje, u svojoj su aktivnoj fazi u mraku i tijekom noćnih sati. Zbog toga test slobodnog polja i test Y-labirinta rađeni su pod infracrvenim svjetlom koje ove životinje ne mogu vidjeti. Zbog tehničkih prepreka test visenja na repu izveden je pri

uobičajenom sobnom osvjetljenju. Kako bi se smanjio utjecaj nepoznatih varijabli na testove ponašanja miševa, sve testove izvela je doktorska kandidatkinja bez prisutnosti drugih osoba tijekom izvođenja pokusa. Također izbjegavano je korištenje parfema, sredstva za čišćenje ili drugih intenzivnih mirisa tijekom izvođenja pokusa.

4.10 Test visenja na repu

Test visenja na repu smatra se dobrom zamjenom testa prisilnog plivanja. Test proučava koliko je životinja motivirana za pokušaj micanja iz neugodne pozicije, tj. koliko brzo prestaje davati otpor. Test je dobar za evaluaciju depresivnog ili antidepresivnog učinka nekog čimbenika na životinju.

Test visenja na repu izveden je 18. dana protokola izlaganja intermitentnoj hipoksiji. Pokusne životinje su taj dan, kao i obično, iz Nastambe iznesene u ranim jutarnjim satima, izložene 8 h dugom protokolu te između 16 h i 17 h vraćene u Nastambu. Životinje su puštene 3h da se aklimatiziraju do početka izvedbe pokusa.

Test visenja na repu trajao je 6 minuta za pojedinu životinju u poretku definiranom slučajnim odabirom po pokusnim grupama. Pripadnost životinja pojedinim grupama nije bila anonimizirana, no pokus je bio izveden u skupinama po tri gdje su istovremeno u test stavljene životinje različitih grupa. Postavljene su pregrade između pozicija na platformi kako se životinje međusobno ne bi mogle vidjeti (Slika 2.4). Rep životinje je fiksiran jakom medicinskom trakom dugom 12 cm za rub platforme 50 cm iznad poda te je pušten da slobodno visi. Pokus je zabilježen na videu koji se naknadno koristio za obradu u programu AnyMaze (Stoelting, SAD).



Slika 2.4. **Test visenja na repu**. *Fotografija prikazuje izvođenje testa visenja na repu na 3 životinje istovremeno. Životinje su međusobno odvojene pregradama*.

4.10.1 Test otvorenog polja

Životinje se testiraju u otvorenom polju kako bi se utvrdilo njihovo kretanje u novoj okolini. Miševi su skloni istraživanju novog prostora, no istovremeno instinktivno izbjegavaju otvoreno područje polja jer su izloženiji potencijalnim napadima predatora. Ovim testom utvrđuje se anksioznost i opći parametri pokretnost životinje, kao i motiviranosti i hiperekscitacija u vidu kretanja po sredini otvorenog polja.

Test je izveden 19. dana protokola izlaganja intermitentnoj hipoksiji. Životinje su taj dan, kao i obično, iz Nastambe iznesene u ranim jutarnjim satima, izložene 8 h dugom protokolu te između 16 h i 17 h vraćene u Nastambu. Životinje su puštene 3 h da se aklimatiziraju prije početka izvedbe pokusa.

Test je trajao 10 minuta za pojedinu životinju te je svaka životinja ušla u pokus sama, prema nasumce definiranom redoslijedu. Pripadnost pojedinoj skupini nije bila anonimizirana, no pri izvođenju pokusa redoslijed životinja alterniran je među skupinama. Životinja je bila stavljena u plexiglas-kutiju bez dna dimenzija 40 x 40 x 40 cm. Na dnu je postavljena podloga podijeljena u 25 kvadrata dimenzija 8 x 8 cm. Oko kutije postavljeni su bijeli paravani visine 120 cm kako se miš ne bi mogao orijentirati s obzirom na vizualne podražaje iz prostorije. Video kamera je fiksirana iznad otvorenog polja. Nakon postavljanja miša u otvoreno polje, ispitivač je na 9 minuta izišao iz prostorije kako bi umanjio svoj utjecaj na tijek pokusa.

Između svake životinje cijeli sustav za ispitivanje je prebrisan 70% alkoholom kako bi se umanjio utjecaj prethodnih životinja na tijek pokusa.

4.10.2 Test Y-labirinta

Test Y-labirinta proučava memoriju životinje i sposobnost za prostorno učenje, no također može dati podatke o općoj pokretnosti, anksioznosti i motiviranosti za istraživanje nepoznatog prostora.

Test Y-labirinta izveden je 20. dana protokola izlaganja intermitentnoj hipoksiji. Životinje su taj dan, kao i obično, iz Nastambe iznesene u ranim jutarnjim satima, izložene 8 h dugom protokolu te između 16 h i 17 h vraćene u Nastambu. Životinje su puštene 3 h da se aklimatiziraju prije početka izvedbe pokusa. Nakon kraja pokusa životinje su bile žrtvovane kako je opisano u daljnjem tekstu pod „Izolacija mozga“.

Test je trajao 10 minuta za pojedinu životinju te je svaka životinja ušla u pokus sama, prema nasumce definiranom redoslijedu. Pripadnost pojedinoj skupini nije bila anonimizirana, no pri izvođenju pokusa redoslijed životinja alterniran je među skupinama. Životinja je bila postavljena u prostor od bijelog plexiglasa s tri kraka duga 40 cm, široka 9 cm te visoka 16 cm. Oko labirinta postavljeni su bijeli paravani visine 120 cm kako se miš ne bi mogao orijentirati s obzirom na vizualne podražaje iz prostorije. Video kamera je fiksirana iznad Y-labirinta. Nakon postavljanja miša u Y-labirint, ispitivač je na 9 minuta izišao iz prostorije kako bi umanjio svoj utjecaj na tijek pokusa.

Između svake životinje cijeli sustav za ispitivanje je prebrisan 70% alkoholom kako bi se umanjio utjecaj prethodnih životinja na tijek pokusa.

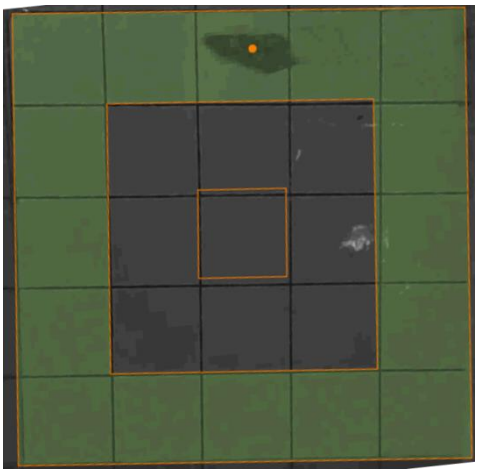
Kako bi se odredilo koliko često miš ulazi u sva tri kraka za redom, definirana je varijabla „postotak spontane alternacije“. Primjerice, ako je miš ušao u krak „A“ zatim u „B“, zatim ponovno u „A“ to se nije brojalo kao spontana alternacija. Ako bi miš ušao u krak „A“, zatim u „B“ i zatim u „C“ neovisno o redoslijedu, ovaj triplet bi se brojao kao spontana alternacija. Postotak spontane alternacije definiran je kao udio pozitivnih u postotku svih kombinacija triju posjećenih zona.

4.10.3 Obrada testova ponašanja programom AnyMaze

Nakon izvedbe pokusa svi videozapisi su pregledani i šifrirani kako bi se anonimizirala pripadnost životinje određenoj skupini.

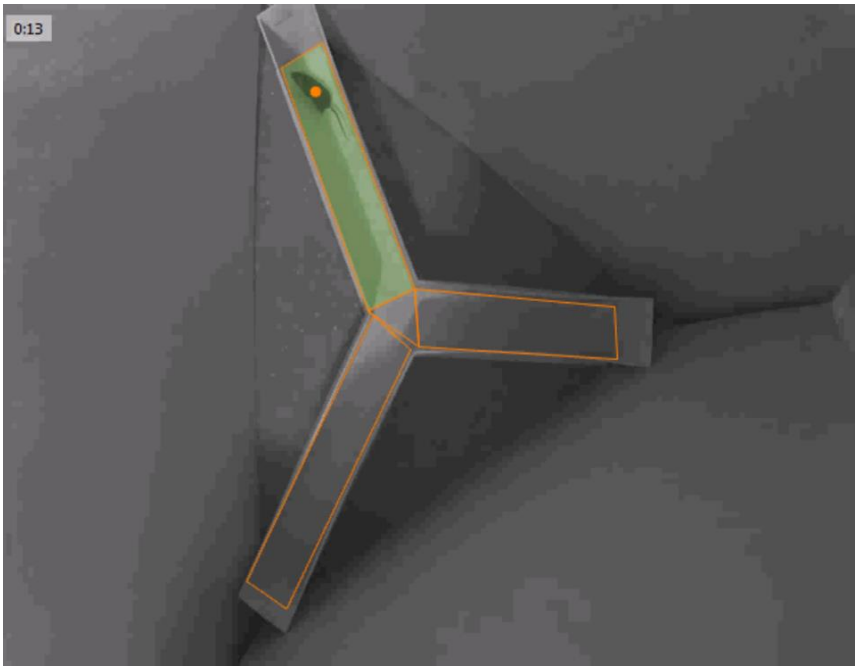
Test visenja repa ručno se ocjenjivao unutar programa AnyMaze. Video zapis testa za svakog miša posebno se ocjenjivao tako što je tipka stisnuta u trenutku kada je miš počeo mirovati, dok je puštena kada se miš ponovno počeo kretati. Svi miševi koji su se tijekom trajanja pokusa popeli po svom repu i time nisu zadovoljavali ni opciju „mirovanje“ ni opciju „kretanje“ bili su izbačeni iz pokusa (N izbačenih: N(TLR2 IH) = 0; N(TLR2 CTRL) = 2; N(TLR2$^{-/-}$ IH) =3; N(TLR2$^{-/-}$ CTRL) =1) .

Za test otvorenog polja definirana je podloga na svakom videu koja je podijeljena u 3 zone: vanjsku sačinjenu od 16 kvadrata uz rub kutije od pleksiglasa, srednju sačinjenu od 8 kvadrata te unutrašnju sačinjenu od jednog kvadrata u sredini (Slika 2.5.). Nakon definiranja podloge sustav za video-praćenje je automatski evaluirao kretanje svakog miša po podlozi tijekom 10 minuta pokusa. Cijelo automatizirano video-praćenje bilo je pregledano od strane ispitivača. U slučaju da video praćenje nije bilo potpuno točno, primjerice u slučaju odsjaja koji bi zbunio program, miš bi bio izbačen iz pokusa (N izbačenih: N(TLR2 IH) = 2; N(TLR2 CTRL) = 0; N(TLR2$^{-/-}$ IH) = 0; N(TLR2 $^{-/-}$ CTRL) = 0) .



Slika 2.5. **Primjer automatizirane kvantifikacije testa otvorenog polja.** *Nakon definiranja dimenzija i podjele podloge sustav za video-praćenje je automatski evaluirao parametre kretanja svakog miša tijekom 10 minuta pokusa.*

Za test Y-labirinta definirana je podloga sačinjena od 4 zone: jedne središnje, te 3 kraka „A“, „B“ i „C“ (Slika 2.6.). Nakon toga automatizirani sustav za video-praćenje evaluirao je kretanje svakog miša po zonama tijekom 10 minuta pokusa. Cijelo automatizirano video praćenje bilo je pregledano od strane ispitivača. U slučaju da video-praćenje nije bilo potpuno točno, primjerice u slučaju odsjaja koji bi zbunio program, miš bi bio izbačen iz pokusa (N izbačenih N(TLR2 IH) = 3; N(TLR2 CTRL) = 0; N($TLR2^{-/-}$ IH) = 3; N($TLR2^{-/-}$ CTRL) = 1).



Slika 2.6. **Primjer automatizirane kvantifikacije testa Y-labirinta.** *Nakon definiranja dimenzija i podjele podloge sustav za video-praćenje je automatski evaluirao parametre kretanja svakog miša tijekom 10 minuta pokusa.*

4.11 MRI oslikavanje

Oslikavanje magnetskom rezonancom izvedeno je na pretkliničkom MR sustavu magnetskog polja 7 tesla (Agilent Technologies, SAD). Uzorci su bili uronjeni u fluoriniziranu tekućinu kako bi se smanjili artefakti uslijed različitih magnetskih svojstava tekućine i tkiva (Galden,

Solvay, Belgija) te su stavljeni po 4 istovremeno u volumnu pobudno-prijamnu (*engl. transmit – receive birdcage*) zavojnicu promjera 39 mm (Rapid GmbH, Njemačka).

Kvantitativne T1 i T2 mape visoke rezolucije snimljene su koristeći modificirani DESPOT1 te DESPOT2- FM protokol (149, 150). Protokol je sadržavao SPGR (*engl. Spoiled Gradient Reacalled*) slike s TE/ TR= 14,6/ 32 ms, širinu frekvencijskog pojasa prijama 10 kHZ i 7 kutova obrtaja (*engl. flip- angles*) (5-35 stupnjeva u koracima po 5 stupnjeva) te bSSFP (*engl. balanced Steady- State Free Precession*) snimke s TE/ TR = 4/ 8 ms, širinom frekvencijskog pojasa prijama 62,5 kHz, 7 kutova obrata (*engl.flip-angles*; 8, 12, 16, 24, 32, 40, 48 stupnjeva) te 4 fazna koraka (*engl. phase increments*) (45, 135, 225 i 315 stupnjeva). Kutevi obrata su izabrani tako da leže unutar optimalnih vrijednosti za očekivane vrijednosti T1 i T2 (151), koje su dobivene pripremnim skenom. Fazni koraci su izabrani tako da bi se izbjeglo fazno stanje od 0 stupnjeva, koje ima slab omjer signal-šum, čak i u slučaju visoke ujednačenosti magnetskog polja. SPGR i SSFP snimke imale su veličine matrice 256 x 256 x 256 s izotropnim vokselima od 125 μm. AFI *(engl.Actual Flip-angle Imaging*) snimka je napravljena za korekciju nehomogenosti gradijentnog polja B1 pri veličini matrice 96 x 96 x 96, izotropnim vokselima dimenzija 333 μm, TE/ TR1/ TR2 = 6,52/ 20/100 ms, širini frekvencijskog pojasa prijama 10 kHz i kuta obrata od 55 stupnjeva (152, 153).

4.12 MRI analiza

MR slike su prvo prebačene u NIFTI format iz zaštićenog formata proizvođača te su zatim procesirane kombinacijom FSL softwarea (154), alata za napredno normaliziranje (ANTs – *engl. advanced normalization tools)(155)* te C++ softvera programiranog na King's College London s korištenjem knjižnice Insight Segmentation and Registration Toolkit **(**dostupne na https://github.com/spinicist/QUIT). Obrada se sastojala od nekoliko koraka. Slike su filtrirane u k-domeni Tukeyevom funkcijom te su zatim izračunate mape za B1, T1 i T2 iz skenova AFI, SPGR te SSFP. Na kraju postupka, umjetna Spin Echo slika je bila sintetizirana iz T1 i T2 mapa s TE/ TR= 40/ 10000 ms za svrhu registracije. Ovo je kreiralo gotovo čistu T2 težinsku sliku, čiji kontrast se podudarao s dostupnim snimkama atlasa (156).

Četiri kombinirane slike su zatim podijeljene u zasebne uzorke (150) te rigidno poravnate s atlasom. Referentna slika za usporedbe je potom konstruirana iz svih uzoraka u studiji i nelinearno poravnata sa slikama atlasa (155).

Logaritmi Jacobijevih determinanti izračunati su iz invertiranih matrica izobličenja u prostornoj domeni kako bi se izračunala promjena volumena. Kombinirane transformacije iz početne domene u domenu atlasa su primijenjene na svim T1 i T2 mapama, koje su onda zaglađene Gaussovim filtrom FWHM (*engl.full width half maximum*) širine 150 μm.

Napravljena je maska moždanog parenhima iz oznaka atlasa izuzimanjem regija ispunjenih cerebrospinalnom tekućinom. Obrnuta vrijednost kombinirane transformacije za svaki uzorak aplicirana je na masku atlasa te su maske specifične za svaki uzorak korištene za izračun volumena mozga i volumena regija interesa za svaki uzorak.

Grupna analiza je zatim napravljena na Jacobijevim determinantama slika dok su T1 i T2 mape analizirane permutacijskim testovima i određivanjem klastera bez unaprijed zadanog praga (TFCE *engl.threshold- free cluster enhancement*) koristeći FSL randomizaciju (157, 158). Procjene volumena mozga bile su uključene kao dodatni regresor u matrici pri analizi jakobijana, no ne za parametarske mape. Prosječne vrijednosti T1 i T2 za svaku regiju označenu po atlasu očitane su u domeni atlasa.

Podaci su prikazani na referentnoj slici mišjeg mozga (156), koristeći pristup dvostrukog kodiranja (159): razlike u log-jakobijanskim varijablama mapirane su nijansom boje dok su pridruženi t-statistički rezultati prikazali prozirnost boje. Iscrtane konture prikazuju statistički značajne razlike ($P<0,01$).

S obzirom na to da su nađene značajne razlike u volumenu cijelog mozga među skupinama, sve daljnje usporedbe volumena pojedinih struktura normalizirane su za ove razlike, te se time izbjeglo bilježenje lažnih razlika u volumenima pojedinih struktura kao posljedica razlika u cijelom volumenu mozga.

4.13 Histološka analiza mišjih mozgova

4.13.1 Žrtvovanje životinja i izolacija mozga

Životinja je uspavana intraperitonealnom injekcijom 2,5 % Avertina (Sigma-Aldrich, SAD) u koncentraciji od 20 μl/g tjelesne težine. Nakon provjere da je životinja potpuno anestezirana, putem pritiska pincetom na kožu na šapi bez uzrokovanja refleksa, životinja je imobilizirana, koža je poprskana alkoholom, škaricama su otvorene abdominalna i torakalna šupljina te je u lijevu klijetku uvedena igla 24G. Desna pretklijetka je otvorena te je provedeno perfuzijsko ispiranje krvi iz cirkulacije s 5 ml fiziološke otopine s 50 IU/ml heparina. Perfuzijska fiksacija je nakon toga provedena s 5 ml 4% paraformaldehida (PFA) u PBS-u. Glava je škaricama odvojena od tijela te je prebačena u 4% PFA na 24h pri 4^{o}C te je potom držana u PBS s 0,05% natrijeva azida na 4^{o}C.

Mozak je ostavljen unutar lubanje s pripadajućim mekim tkivom zbog lakšeg *ex vivo* oslikavanja magnetskom rezonancom.

4.13.2 Priprema histoloških rezova

Nakon *ex vivo* oslikavanja magnetskom rezonancom mozgovi su izolirani iz lubanje kirurškim škaricama te dehidrirani pohranjivanjem u 30% saharozu 3 dana prije rezanja. Mozgovi su rezani na mikrotomu (HM 430 TermoFisher, SAD). Prije rezanja podest mikrotoma ohlađen je suhim ledom te je mozak fiksiran za podlogu tekućinom za uklopljivanje i prekriven suhim ledom kako bi se smrznuo do željene teksture. Uzimajući svaki rez, za svaki mozak napravljeno je 12 serija slobodno plutajućih frontalnih rezova debljine 35 μm pohranjenih u krioprotektantu (45% fosfatnog pufera, 25% etilen-glikola i 30% glicerola). Rezovi su zatim držani na -20^{o}C.

4.14 Imunohistokemijsko bojenje

Imunohistokemijsko bojenje slobodno plutajućih rezova napravljeno je s primarnim protutijelima: Iba1, markerom mikroglije (019-19741, Wako, Japan), GFAP, markerom astrocita (Z033401-2, Agilent Technologies, SAD) i protutijelom cFos, markerom neuronalne aktivnosti vezane s priljevom kalcija (sc-52, Santa Cruz, SAD).

Dvodnevni protokol bojenja opisan je u slijedu postupaka navedenih niže. Svi postupci rađeni su na tresilici (Heidolph Vibramax 100, Heidolph, Njemačka) na brzini od 300 rpm. Kemikalije koje su korištene su tris pufer (TBS - *engl. tris buffered saline*) (T0319, Sigma-Aldrich, SAD), TBS- X (1% Triton X u TBS-u (10254640, Fisher Scientific, SAD), mlijeko u prahu (70166, Sigma-Aldrich, SAD), biotinilirano sekundarno protutijelo protiv kunića pripravljeno u kozi (BA-1000, Vector Laboratories, SAD), set ABC Vectastain (PK-6100, Vector Laboratories, SAD) te 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid-hidratne tablete - DAB (J60972.KW, Alfa Aesar, SAD).

Dan 1:	1. Ispiranje rezova TBS-om za uklanjanje krioprotektanta 2 x 5 minuta
	2. Dodavanje 1% H_2O_2 u TBS-u za blokiranje endogene aktivnosti peroksidaze tijekom 15 minuta
	3. Ispiranje 3 x 5 minuta TBS-om
	4. Blokiranje nespecifičnog vezanja primarnog protutijela 10% mlijekom u prahu u TBS-X tijekom 40 minuta
	5. Ispiranje 3 x 5 minuta u TBS-u
	6. Dodavanje primarnog protutijela. Ostaviti preko noći na tresilici na 4°C
Dan 2	
	1. Ispiranje 3 x 5 minuta TBS-om
	2. Dodavanje sekundarnog protutijela: biotinom obilježeno protutijelo koze na zeca (Vector) 1:1000 tijekom 2 sata u TBS-X na sobnoj temperaturi
	3. Napraviti ABC Vector kit

	4. Ispiranje 3 x 5 minuta TBS-om
	5. Inkubiranje rezova u reagensu ABC (Vectastain) u TBS-X tijekom 1 sata
	6. Ispiranje 3 x 5 minuta TBS-om
	7. Reagiranje u DAB-u te zaustavljanje reakcije prebacivanjem rezova u hladni TBS
	8. Ispiranje 3 x 5 minuta TBS-om

Nakon bojanja uzorci su kistom naneseni prema anatomskom poretku na predmetno stakalce te ostavljeni da se suše na zraku preko noći. Iza toga uzorci su dehidrirani uzlaznim nizom etanola po 5 minuta u svakoj koncentraciji (70%, 80%, 90%, 100%) te potom prebačeni u organsko otapalo (100% Histoclear, Sigma, SAD). Nakon 15 minuta ponovnog sušenja na zraku uzorci su prekriveni medijem za uklopljavanje DPX (06522, Sigma- Aldrich, SAD) te poklopljeni pokrovnim stakalcem. Uzorci su se zatim sušili na zraku barem 3 dana.

4.14.1 Digitalizacija uzoraka bojenih imunohistokemijom

Uzorci su skenirani skenerom Leica SCN400F za preparate (Leica Biosystems, Njemačka) Odjela IQPath, Instituta za neurologiju, University College London do jačine povećanja 40x. Digitalizirani uzorci su zatim učinjeni dostupnima *online* na web-sučelju Digital Image Hub (Slika 2.7.A) (Leica Biosystems, Njemačka) te u računalnim datotekama formata „*scn*“ za svaki skenirani preparat. Ovako digitalizirani uzorci omogućili su računalnu stereološku kvantifikaciju imunohistokemijskih bojanja bez upotrebe stereološkog mikroskopa.

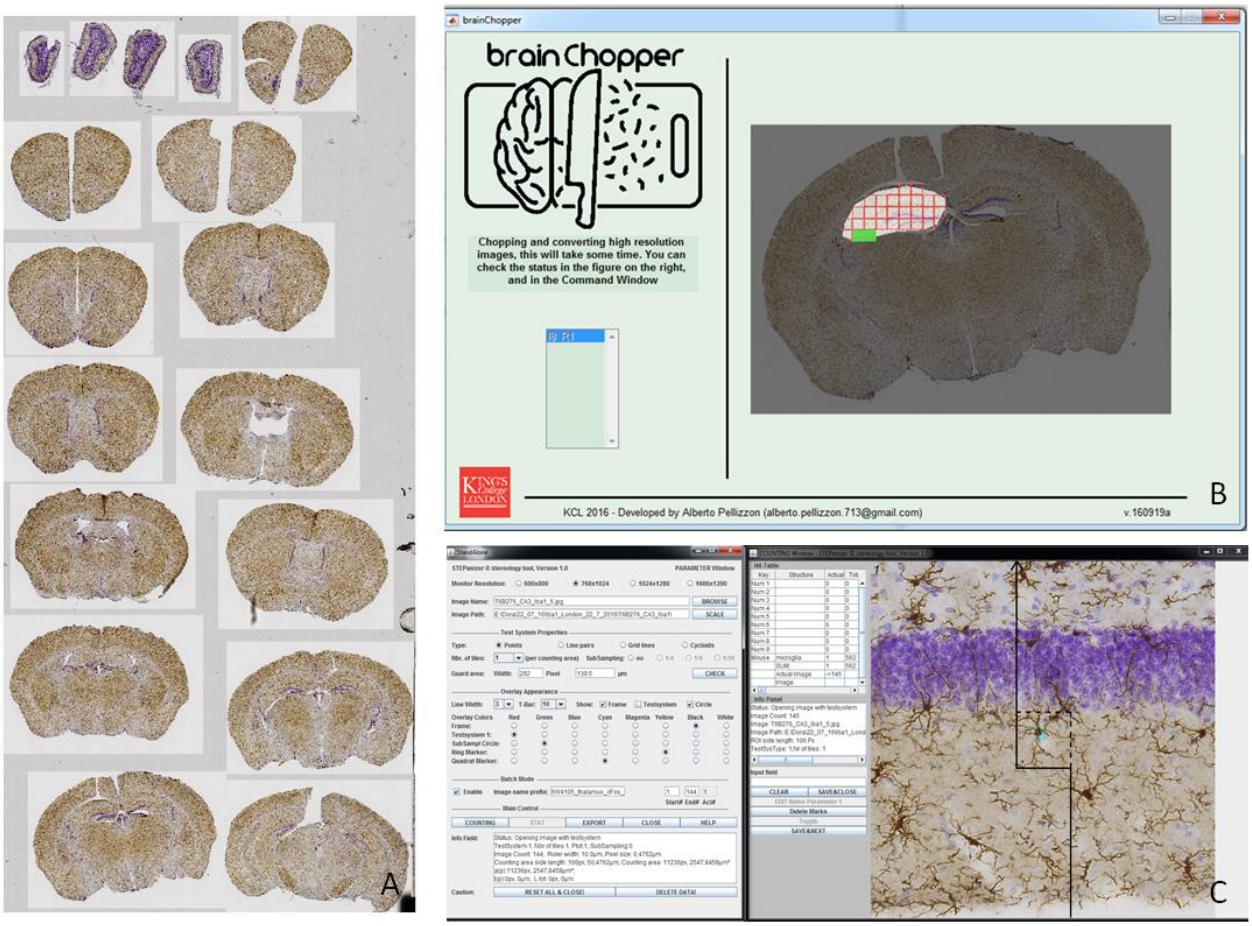
4.15 Stereološka kvantifikacija bojenja Iba1 i c-Fos

Kako bi obojane stanice mogle biti analizirane u precizno definiranim regijama interesa korišten je nekomercijalni program napravljen za potrebe King's College London, BrainChopper (programer Alberto Pellizzon). Program je omogućio ručno iscrtavanje regije od interesa te je zatim navedenu regiju podijelio na slike „*jpg*“ formata čija se dužina stranica mogla definirati unutar programa (Slika 2.7.B).

Bojenje Iba 1 kvantificirano je za talamus i hipotalamus s rešetkom dimenzija 300 μm x 300 μm i za polja hipokampusa CA1, CA3 i *girus dentatus* s rešetkom dimenzija 100 μm x 100 μm.

Bojenje cFos kvantificirano je za talamus, hipotalamus i hipokampus evaluiran u ovom bojenju kao jedinstvena regija interesa s rešetkom dimenzija 300 μm x 300 μm.

Nakon procesiranja programom BrainChopper u MatLabu (Mathworks, SAD) generirana je mapa s nizom .jpg slika određene dimenzije za pojedinu regiju interesa pojedinog preparata i također informacija o veličini ukupne iscrtane površine regije interesa. Ovaj niz slika zatim je korišten u javno dostupnom Java programu Steppanizer (160). Polje u kojem su se brojale stanice smješteno je na sredinu svake „*jpg*“ slike i bilo je dimenzija 50 μm x 50 μm (Slika 2.7. C). Stanice koje su dodirivale lijevi i donji rub polja bile su brojane a stanice koje su dodirivale gornji i desni rub polja nisu brojane.



Slika 4.7. **Proces digitalizacije i kvantifikacije histoloških uzoraka.** *(A) Primjer digitaliziranog seta rezova mozga jedne životinje. (B) Ručno definirana regija interesa te automatizirano generiranje slika u formatu „.jpg“ određenih dimenzija programom brainChopper. (C) Kvantifikacija automatski određenih polja „.jpg“ slike omogućila je nepristranu kvantifikaciju stanica sa signalom.*

Nakon brojanja niza „*.jpg*“ slika za pojedinu regiju interesa pojedinog miša, rezultati su prebačeni u Excel-datoteku u kojoj su bile informacije o ukupnom zbroju stanica i broju stanica po slici.

Kako bi se napravila procjena apsolutnih brojeva stanica u volumenu tkiva, korištena je formula:

$$broj\ stanica\ /_{mm3} = rezultat\ brojanja\ x\ k$$

Koeficijent k je rezultat izračuna:

$$k = \frac{\frac{1}{P(\text{polja}) \div P(slike)} \times (d(realna) \div d(nominalna) \times (1 \div N(broj\ serija\ rezova))}{(P(uk)\ [\mu m2]\ \times 10^3 \times d(nominalna) \times N(broj\ serija\ rezova))}$$

u kojem

P (polja) odgovara površini polja brojanja u μm^2,

P (slike) odgovara površini slike u μm^2,

d (realna) odgovara realnoj debljini reza s obzirom na oštećenje tkiva nožem i koja je definirana kao nominalna debljina reza umanjena za 0,5 µm tkiva sa svake strane,

d (nominalna) odgovara debljini reza postavljenoj na mikrotomu u μm,

N (broj serija rezova) odgovara broju serija rađenih pri rezanju na mikrotomu,

P (uk) odgovara ukupnoj površini označenoj kao regija interesa u BrainChopper programu u μm^2.

Izračunati omjeri koristili su se kao rezultati brojanja prikazani u Rezultatima.

4.16 Kvantifikacije bojenja GFAP

Zbog tehničke prepreke brojanju astrocita označenih markerom GFAP putem opisane stereološke metode, s obzirom na nakupljanje astrocita u grupe u kojima je nemoguće odrediti precizan broj stanica, kvantifikacija GFAP-imunohistokemijskog bojenja izvedena je kao postotak površine regije interesa prekriven signalom.

Datoteka „*.scn*“ je otvorena javno dostupnim programom Aperio Image Scope. Regija interesa postavljena je u vidno polje na pojačanje 4x (Slika 4.8.A). U programu je generirana trikromatska slika s obzirom na pragove zasićenja bojom definirane u programu (Slika 4.8.B). Ova slika je zatim otvorena javno dostupnim programom ImageJ u kojem je napravljena automatizirana serija postupaka (Tablica 4.2):

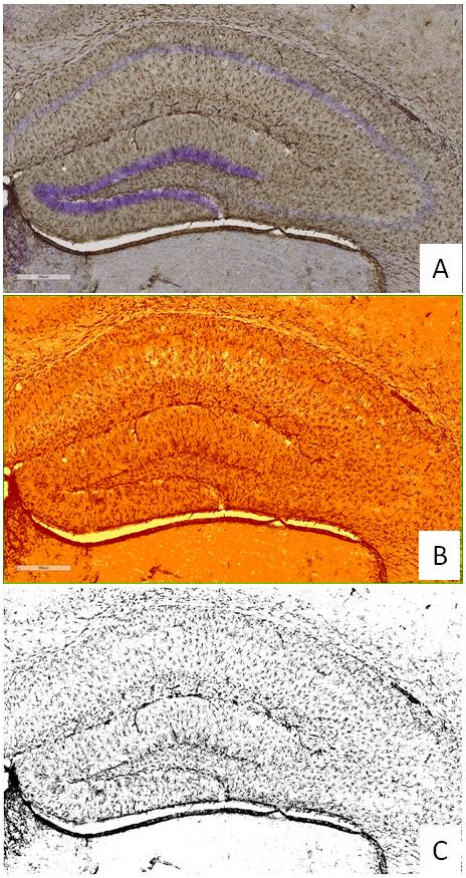
run("Subtract Background...", "rolling=50 light")
run("8-bit")

setAutoThreshold("Huang")
//run("Threshold...")
setThreshold
setOption("BlackBackground", false)
run("Convert to Mask")
Ručno je označena regija interesa
run(„Measure“)

Tablica 4.2. **„Macro“ automatizirana serija postupaka u programu ImageJ za analizu bojenja GFAP.**

Program je generirao Excel-datoteku s informacijama o postotku površine prekrivene signalom GFAP i sliku samo s izračunatim signalom (Slika 4.8.C).

Za kvantifikaciju talamusa korišteno je 4 reza po mozgu, za hipotalamus 5 rezova a za hipokampus 6 rezova po mozgu.



Slika 4.8. **Kvantifikacija signala GFAP izračunom postotka površine regije interesa prekrivene signalom.** *(A) Digitalizirani histološki preparat u programu Aperio Image Scope. (B) Trikromatska slika generirana s obzirom na u programu definirane pragove zasićenja bojom. (C) Analiza slike u programu ImageJ daje podatke o površini prekrivenoj samo određenom bojom.*

4.17 Bojenje po Nisslu

Bojenje po Nisslu je izvedeno kako bi se evaluirala apoptoza neurona u poljima CA1 i CA3 hipokampusa i dentatnom girusu. Kriterij za utvrđivanje apoptoze bila je hiperkromazija, kondenzacija i fragmentacija kromatina ili smanjenje some neurona.

Preparati bojeni protutijelom Iba1 i GFAP također su obojeni blagom Nissl-bojom za lakšu orijentaciju na preparatu.

Boja krezil-violet razrijedila se u dH_2O u koncentraciji 0,5g/100 ml kako bi se pripremila otopina za skladištenje. Prije bojenja, otopina se razrijedila 10 puta u dH_2O te joj je dodana 10% octena kiselina u omjeru 1/200. Radna otopina zagrijala se na 56 stupnjeva te su rezovi uronjeni u boju i držani na 60 ^oC u pećnici oko 20 minuta. Nakon 2 ispiranja u dH_2O, preparati su diferencirani u uzlaznom nizu etilnog alkohola: 70% (5 min); 80% (2min); 90% (2 min); 95% (2 min); 100% (2x 2 min); 50% ksilen- 50% etilni alkohol (2 min); 100% ksilen). Preparati su provjereni te ako je pozadina bila zadovoljavajuće svjetla ostavljeni u ksilenu najmanje 1h. Nakon toga su ostavljeni da se suše na zraku tijekom 15 minuta te uklopljeni medijem DPX za uklopljavanje i prekriveni pokrovnim stakalcem.

4.18 Izrada korelacijskih matrica

Koregistracijom MR oslikavanja s atlasom moždanih struktura dobiveni su podaci o volumenu za 52 parne strukture te 10 neparnih struktura. Za prikaz međusobnog odnosa volumena 114 struktura u svakoj od 4 skupine izračunat je Pearsonov korelacijski koeficijent za svaki par varijabli unutar pojedine skupine. Zatim su sve vrijednosti uvrštene u tablicu te je svakoj vrijednosti pridružena određena nijansa boje. Na taj način je nastala korelacijska matrica tj. „toplinska mapa“ (*engl. heat map*).

Svrha izrade korelacijskih matrica nije bila analizirati pojedine strukture, već uočiti moguće obrasce simetrije međuovisnosti struktura u 4 ispitivane skupine. Sve strukture su grupirane u regije lijeve i desne strane mozga: veliki mozak, produljena moždina, mali mozak, bijela tvar i ventrikularni sustav. Neparne strukture grupirane su unutar većih skupina dvaput, jednom za svaku polovicu mozga.

Slični postupak ponovljen je izračunom Pearsonovih korelacijskih koeficijenata za određene parove različitih varijabli dobivenih od istih životinja: rezultata histoloških kvantifikacija, MRI volumena određenih regija interesa i rezultata ponašajnih testova. Nastala korelacijska matrica prikazivala je međuovisnosti ponašajnih testova, mikroglije, astrocita i volumena regija interesa u mozgu istih životinja po skupinama.

4.19 Statistička analiza

Svi podaci testirani su na normalnost distribucije D'Agostino- Pearson-testom. U slučaju da je D'Agostino- Pearsonovim testom utvrđena normalnost distribucije svih podataka dobivenih jednom metodom, za utvrđivanje statistički značajnih razlika među skupinama korištena je jednosmjerna ANOVA za više varijabli sa Sidakovim testom za korekciju višestrukih usporedbi pri usporedbi unaprijed određenih parova skupina (TLR2 IH i $TLR2^{-/-}$ IH; TLR2 IH i TLR2 CTRL; $TLR2^{-/-}$IH i $TLR2^{-/-}$ CTRL te TLR2 CTRL i $TLR2^{-/-}$ CTRL). U slučaju da D'Agostino-Pearsonovim testom nije utvrđena normalnost distribucije, za utvrđivanje statistički značajnih razlika korišten je Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom za korekciju višestrukih usporedbi pri usporedbi unaprijed određenih parova skupina (TLR2 IH i $TLR2^{-/-}$ IH; TLR2 IH i TLR2 CTRL; $TLR2^{-/-}$IH i $TLR2^{-/-}$ CTRL te TLR2 CTRL i $TLR2^{-/-}$ CTRL).

Za statističku obradu MRI podataka korištena je statistička metoda TFCE korištenjem FSL alata opisana u podpoglavlju 4.12 (154).

Za korelacijske matrice izračunat je Pearsonov korelacijski koeficijent za svaki par varijabli posebno.

Statistički značajna vjerojatnost (P) definirana je kao <0,05. Sva statistička obrada podataka osim MRI analize izvedena je programom GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, SAD).

Svi rezultati biti će prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Kada su uspoređivane samo 2 skupine, biti će navedena P vrijednost. Kada je uspoređivano više od dvije skupine testom s višestrukim usporedbama, biti će navedena prilagođena P vrijednost za usporedbu dvije skupine o kojima je riječ u tekstu koja je korigirana za utjecaj višestrukih usporedbi.

5 REZULTATI

5.1 Brz, precizan i podesiv životinjski model intermitentne hipoksije

Za potrebe proučavanja opstruktivne apneje spavanja osmislio se i uspostavio brz, precizan i etički prihvatljiv životinjski model intermitentne hipoksije. Kako bismo životinje izložili reproducibilnim i maksimalno kontroliranim uvjetima koji simuliraju intermitentnu hipoksiju koja nastupa u pacijenata s opstruktivnom apnejom spavanja, postojalo je nekoliko preduvjeta koje je takav sustav trebao zadovoljiti (Tablica 5.1.).

Uvjet	**Tehničko rješenje**
Maksimalna prilagodljivost u dizajniranju eksperimentalnih protokola s obzirom na razinu hipoksije te duljinu perioda izlaganja	• Regulator koji omogućava postavljanje dvije različite razine kisika te dvije duljine vremenskih perioda
Brzi prelazak između različitih razina kisika koji omogućava kratke periode hipoksije	• Odvojeni ulaz podataka na kontrolnu ploču iz dvaju senzora za kisik • Pretkomora za miješanje sa senzorom za kisik • Mali volumen komore • Visok protok plinova
Precizna kontrola kisika u komori	• Pretkomora za miješanje sa senzorom za kisik • Odvojeni ulaz podataka na kontrolnu ploču iz dva senzora za kisik • Korištenje kaveza Tecniplast GM500 s patentiranim dizajnom zatvaranja
Jednakomjerno raspoređen protok plinova kroz komoru	• Modifikacija Tecniplast GM500 kaveza s patentiranim ergonomskim dizajnom
Smanjivanje ometanja životinja na najmanju	• Sustav kompatibilan s regularnim kavezom za smještaj životinja

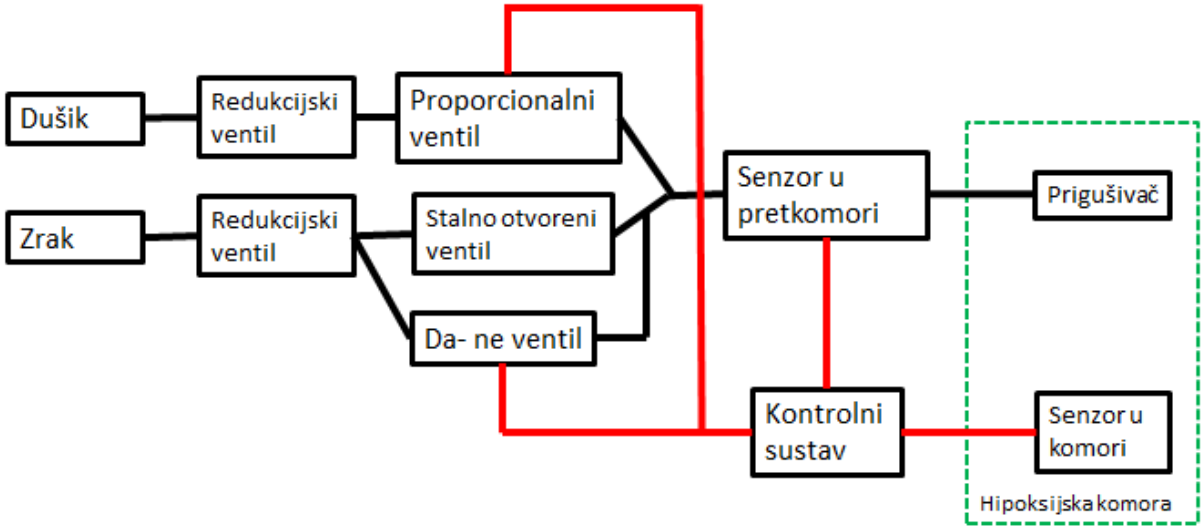
moguću razinu	• Ovlaživač plinova • Prigušivač plinova • Standardna veličina smještaja za pokusne životinje

Tablica 5.1. **Uvjeti i tehnička rješenja novorazvijenog sustava za izlaganje intermitentnoj hipoksiji.**

Specifikacije novorazvijenog sustava

Model je razvijen koristeći individualno ventilirani mišji kavez tvrtke Tecniplast (GM500, Italija) koji ima samo jedan ulaz i izlaz plinova. Korišten je komprimirani dušik čistoće 99,996% (Messer, Hrvatska) za potiskivanje viška kisika iz zraka u komori. Za vraćanje atmosferske razine kisika u komori korišten je tihi kompresor (SAI2088, SMC, SAD) koji je upuhivao sobni zrak u komoru.

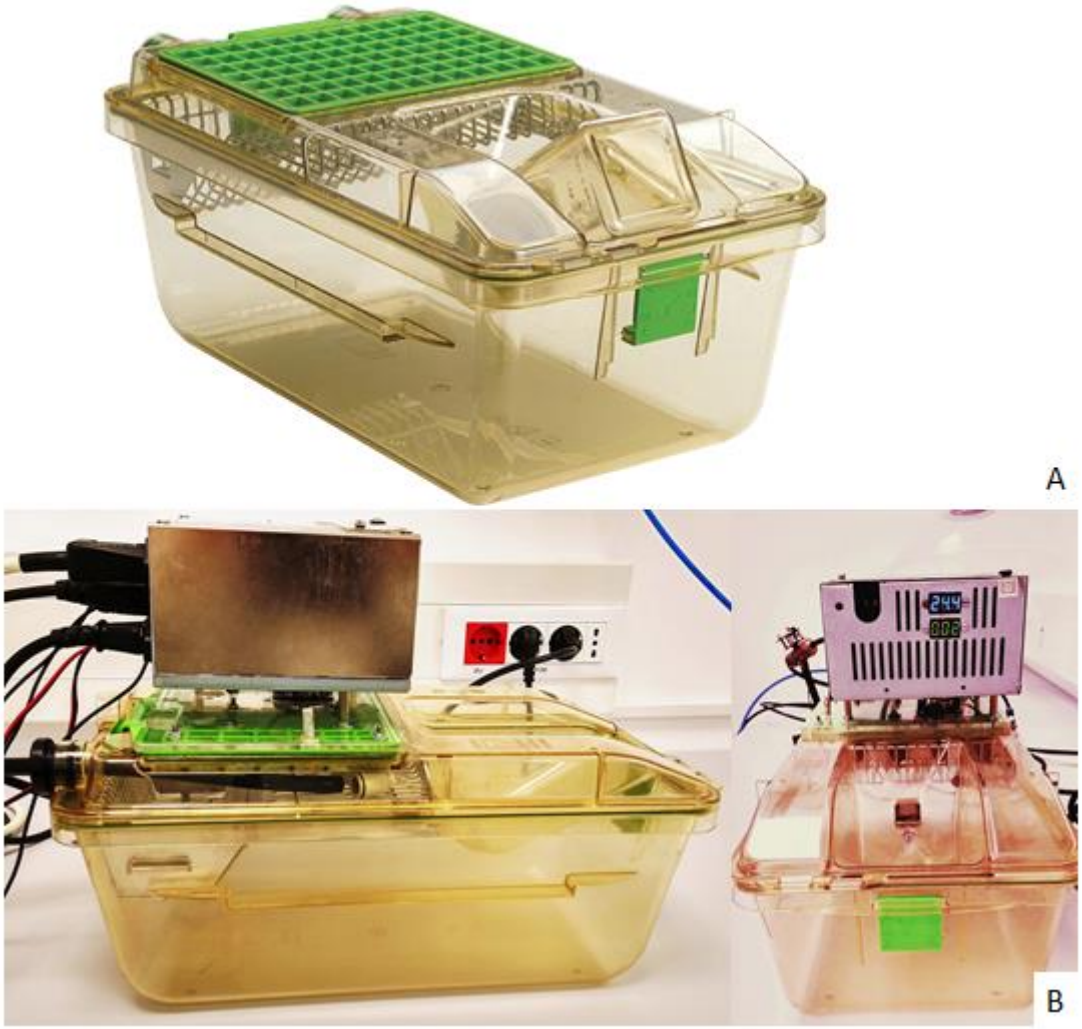
Izvor dušika i kompresor spojeni su na vlastite redukcijske ventile te je izlazni tlak bio namješten na 2 bara za dušik te 1,2 bara za zrak. Nakon redukcijskih ventila, cijevi su spojene na nevezani manometar na kojem je bilo moguće preciznije podesiti tlak. Prolaskom kroz drugi manometar, cijev dušika je spojena na proporcionalni ventil (PVQ31, SMC, USA). Cijev koja je provodila zrak iz kompresora spojena je na 2 ventila, veći ventil s principom rada „da-ne“ (D885, M&M International, SAD) i manji proporcionalni ventil (PVQ13, SMC, SAD). Nakon prolaska kroz ventile, cijevi za plinove su spojene međusobno te se tlak nadzirao postavljanjem manometra u ovom čvoru sustava. Prolaskom kroz manometar, cijevi se dijele provodeći mješavinu plinova, te je jedan krak usmjeren u malu pretkomoru od bakra u kojoj je postavljen senzor za kisik (O2-A2, Alphasense, Velika Britanija). Drugi krak odvodio je pola mješavine kroz posudu s vodom kako bi se vlažnost mješavine plinova u komori održavala na otprilike 50%. Krakovi cijevi se dalje spajaju te je mješavina plinova bila usmjerena u komoru. Opisani raspored komponenti vizualno je prikazan blok-dijagramom na (Slika 5.1.).



Slika 5.1**. Blok-dijagram rasporeda komponenti automatiziranog sustava za induciranje intermitentne hipoksije**. *Dijagram prikazuje izvore plinova i pridružene sastavne dijelove sustava spojene crnim linijama koje označavaju sustav cijevi. Crvene linije označavaju strujne krugove dok zelena isprekidana linija označava područje unutar komore.*

Prilikom konstrukcije hipoksijske komore korišten je individualni ventilirani kavez tvrtke Tecniplast. U originalnoj izvedbi proizvođača kave je sastavljen od plastičnog korita širine 391 mm, dubine 199 mm te visine 160 mm te je na njega postavljena metalna rešetka za životinjsku hranu koja seže do pola širine kaveza. Na plastični kavez i rešetku postavljen je poklopac obrubljen silikonom kako bi se sustav izolirao od zraka u prostoriji. Poklopac ima jedan ulaz i jedan izlaz, koji služe individualnim ventiliranim kavezima za upuh i ispuh zraka.

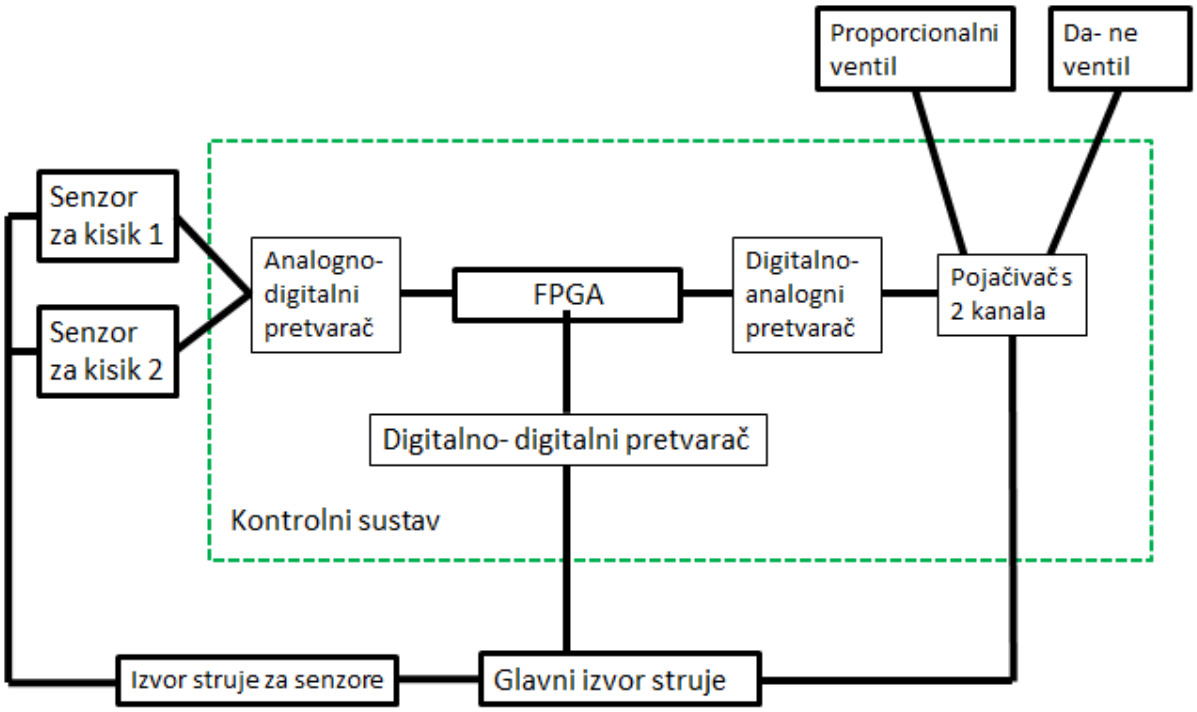
U našoj adaptaciji, na metalnu rešetku postavljen je sustav prigušivača napravljenih od metalne mreže koji je povećavao ulaznu površinu plinova za 4 puta te smanjivao buku i brzinu ulazeće mješavine plinova te ograničavao utjecaj prebrzog protoka plinova i isušivanja koji bi mogli smetati životinjama. Na donju stranu poklopca kaveza montiran je drugi senzor za kisik (O2-A2, Alphasense, Velika Britanija). Na gornju stranu poklopca postavljen je glavni kontrolni sustav za regulaciju mješavine plinova putem podešavanja promjera proporcionalnih ventila na ulazu u sustav. Opisane modifikacije prikazane su na Slici 5.2.



Slika 5.2. **Automatizirani sustav za induciranje intermitentne hipoksije**. *Sustav je izveden modifikacijom originalnog Tecniplastovog kaveza (A) dodavanjem kontrolnog sustava na vrh poklopca, uvođenjem prigušivača za plin te modifikacijom ulaza i izlaza iz zatvorenog kaveza (B). Slika nemodificiranog kaveza preuzeta sa http://www.tecniplast.it/en/product/dgm-digital-ready-ivc.html.*

Kontrolni sustav se sastojao od kartice programirljivih polja logičkih blokova (FPGA, *engl. Field programmable gate array*) (Basys2, Digilent, SAD) s LED-zaslonom i korisničkim sučeljem. Sučelje je sačinjeno od 4 tipke koje omogućavaju određivanje postotka kisika i vrijeme trajanja postavljene razine kisika za dva različita perioda. Tipke su također omogućavali promjenu parametra prikazanog na LED-zaslonu, spremanje postavki te započinjanje protokola.

Kartica programirljivih polja logičkih blokova bila je programirana u jeziku za opis integriranih sklopova vrlo visokih brzina (VHDL, *engl. VHSIC Hardware Description Language*), koristila je odvojene ulazne informacije obaju senzora te ih uspoređivala sa signalom postavljenih parametara čiji rezultat je bio izračun struje potrebne za kontrolu promjera otvora 2 proporcionalna ventila i trećeg ventila s principom rada „da- ne“ koji su kontrolirali dovod plinova u komoru. Program je simulirao proporcionalno- integracijski- derivacijski regulator. FPGA-kartica bila je spojena s analogno- digitalnim i digitalno- analognim pretvaračem kako bi mogla procesirati signale iz senzora te slati signale prema ventilima (Slika 5.3). Program je primarno koristio ulaznu informaciju senzora iz pretkomore kako bi se mješavina mogla brže modificirati, dok je ulazna informacija senzora iz glavne komore signalizirala kada su parametri postignuti te kada se sustav može ugasiti. Ova programska naredba je također smanjila potrošnju plinova u sustavu.



Slika 5.3. **Komponente kontrolnog sustava komore za induciranje intermitentne hipoksije.** *Dijelovi kontrolnog sustava povezani su crnim linijama koje označavaju strujne krugove. Isprekidana linija označava unutrašnjost kućišta kontrolnog sustava. Deblji rubovi označavaju glavne, a tanji rubovi pomoćne komponente sustava.*

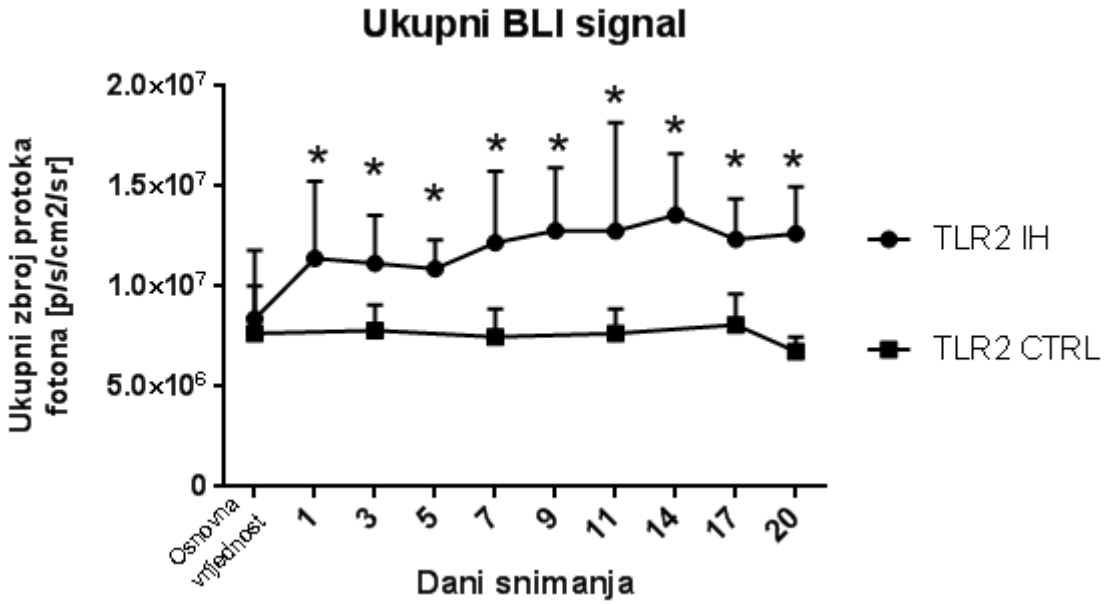
Kompresor koji je dopremao zrak u sustav bio je spojen s dvama različitima, odvojeno kontroliranim ventilima kako bi se smanjio rizik od podbačaja *(engl. undershoot)* sustava. U eksperimentalnim protokolima koji koriste duboku hipoksiju, prije nego što sustav dosegne ciljni postotak kisika, postoji opasnost prolaznog pada razine kisika ispod zadane vrijednosti. Ovaj rizik od prolaznog podbačaja može imati značajne posljedice na eksperimentalne životinje koje se pritom mogu ugušiti ili teško povrijediti te također i značajno utjecati na ishode eksperimenta. Iz ovog razloga dodan je mali proporcionalni ventil koji je trajno ostao otvoren, tako minimalizirajući trajanje podbačaja te postavljajući najnižu moguću razinu kisika u komori na 2,2 %. Veliki ventil postavljen je za brzo i precizno podizanje razine kisika u komori u periodu u kojem je to potrebno.

Dizajn hipoksične komore prijavljen je kao patent koji je trenutno u postupku odobravanja (GB 16602071.1).

5.2 TLR2 je pojačano eksprimiran u mozgu nakon intermitentne hipoksije

Kako bi se odredilo dolazi li do upale u mozgu nakon intermitentne hipoksije, ekspresija TLR2 praćena je longitudinalno kroz akutnu i kroničnu fazu izlaganja životinja IH.

Pokazano je da je ekspresija TLR2 povišena već nakon samo 8h dugog izlaganja IH (osnovna vrijednost = $7,68 \times 10^6 \pm 1,81 \times 10^6$ p/s/cm^2/sr vs. IH 1 dan = $1,16 \times 10^7 \pm 3,43 \times 10^6$ p/s/cm^2/sr) te ostaje statistički značajno povišena tijekom cijelog kroničnog tijeka izlaganja ($P < 0,0001$ prilagođen za višestruke usporedbe) (Slika 5.4, Tablica 5.2).

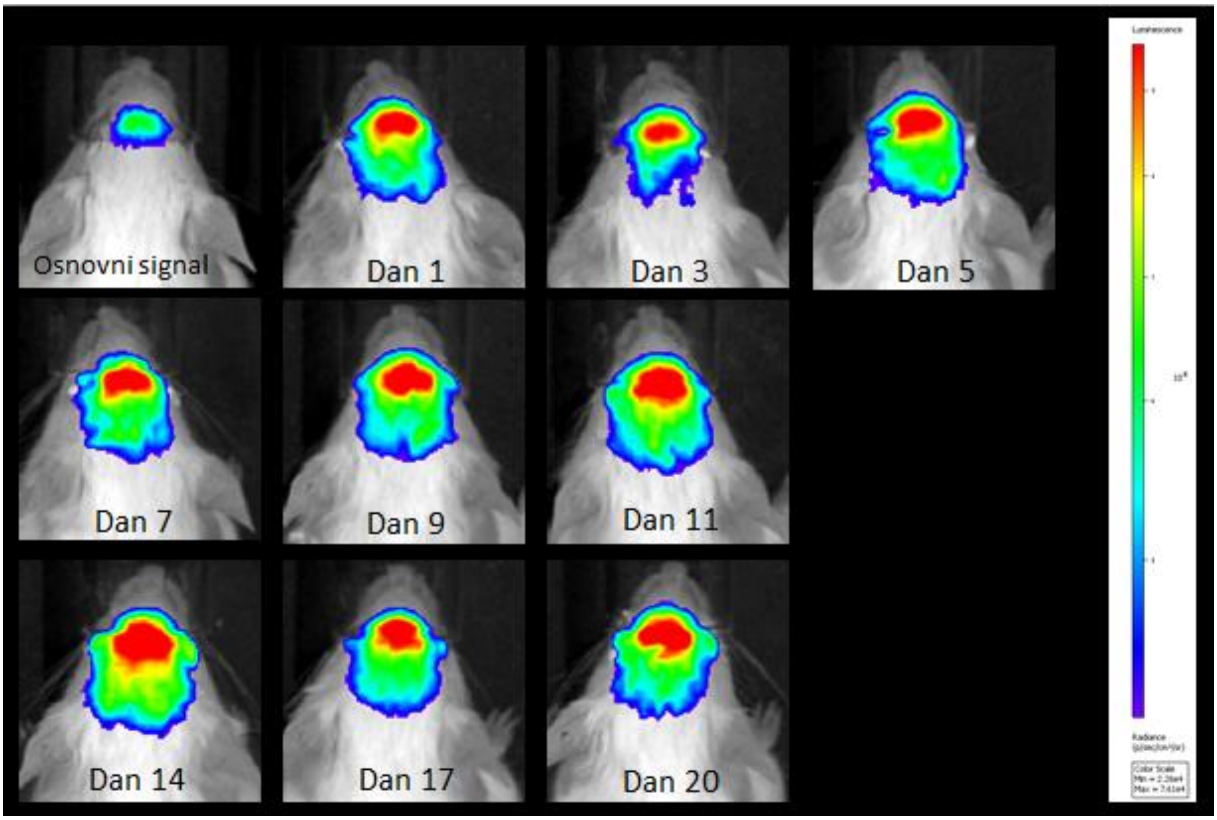


Slika 5.4. **Ukupni bioluminiscentni signal TLR2 ekspresije nakon izlaganja intermitentnoj hipoksiji.** *Graf prikazuje razliku TLR2 ekspresije između grupe izložene IH (N=20) te kontrola (N=6) putem in vivo longitudinalnog snimanja bioluminiscentnog signala. X-os označava dane protokola izlaganja IH, Y-os prikazuje signal u obliku ukupnog zbroja protoka fotona svjetlosti po sekundi, cm^2 tkiva i steradijanu ($p/s/cm^2/sr$).Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti ± SD, zvjezdice označavaju statističku značajnost određenu Kruskal-Wallisovim testom u usporedbi s osnovnom vrijednosti TLR2 IH skupine. Regija interesa definirana je preko cijele površine glave.*

Vremenska točka	Srednja vrijednost [$p/s/cm^2/sr$]	±SD
Osnovni signal	7.68×10^6	1.81×10^6
1. dan IH	1.16×10^7	3.43×10^6
3. dan IH	1.12×10^7	2.40×10^6
5. dan IH	1.09×10^7	1.42×10^6
7. dan IH	1.22×10^7	3.58×10^6
9. dan IH	1.28×10^7	3.15×10^6
11. dan IH	1.42×10^7	4.35×10^6
15. dan IH	1.36×10^7	3.07×10^6
17. dan IH	1.24×10^7	2.04×10^6
20. dan IH	1.26×10^7	2.32×10^6

Tablica 5.2. **Vrijednosti bioluminiscentnog signala kroz vremenske točke snimanja.**

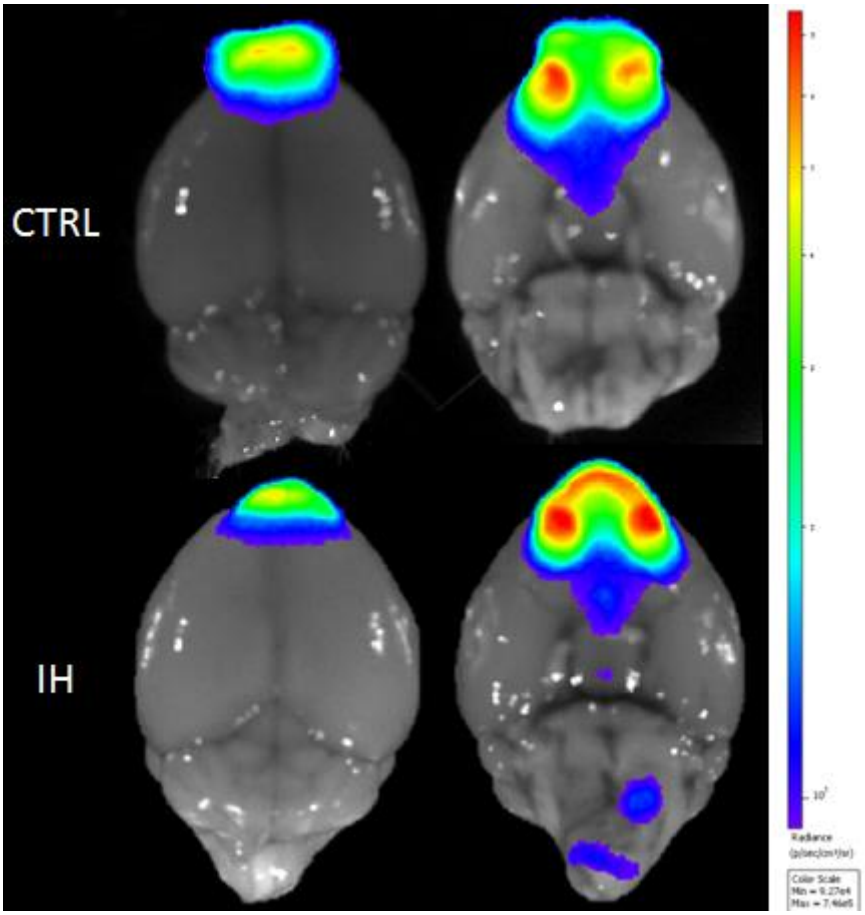
Kontrolna skupina pokazala je konzistentne rezultate uzastopnih mjerenja, koji su također bili statistički značajno različiti od intenziteta signala grupe izložene intermitentnoj hipoksiji (srednja vrijednost svih mjerenja kontrolne skupine = 7,89 x 10^6 ± 0,16 x 10^6 p/s/cm^2/sr vs. srednja vrijednost svih mjerenja tijekom IH 1,2 x 10^7 ± 0,31 x 10^7 p/s/cm^2/sr; P < 0,0001 prilagođen za višestruke usporedbe). Osnovni signal TLR2 IH skupine nije se statistički značajno razlikovao od uzastopnih mjerenja TLR2 CTRL skupine (srednja vrijednost svih mjerenja kontrolne skupine = 7,89 x 10^6 ± 0,16 x 10^6 p/s/cm^2/sr vs. srednja vrijednost osnovnog signala IH skupine = 7,68 x 10^6 ± 1,81 x 10^6 p/s/cm^2/sr, P > 0,9999, prilagođen za višestruke usporedbe). Reprezentativni primjer 2D signala za jednog miša tijekom 20 dana praćenja prikazan je na Slici 5.5.



Slika 5.5 **Reprezentativni prikaz TLR2 bioluminiscentnog signala istog miša tijekom kroničnog izlaganja intermitentnoj hipoksiji.** *Slika prikazuje bioluminiscentni signal u pseudo-boji superponirani na crno-bijelu fotografiju. Mjerilo označava ukupni zbroj protoka fotona (p/s/cm^2/sr)pridružen skali pseudo-boje. (min = 2,26 x 10^4 p/s/cm^2/sr; max = 7,61x 10^4 p/s/cm^2/sr).*

5.3 Lokalizacija ekspresije signala TLR2

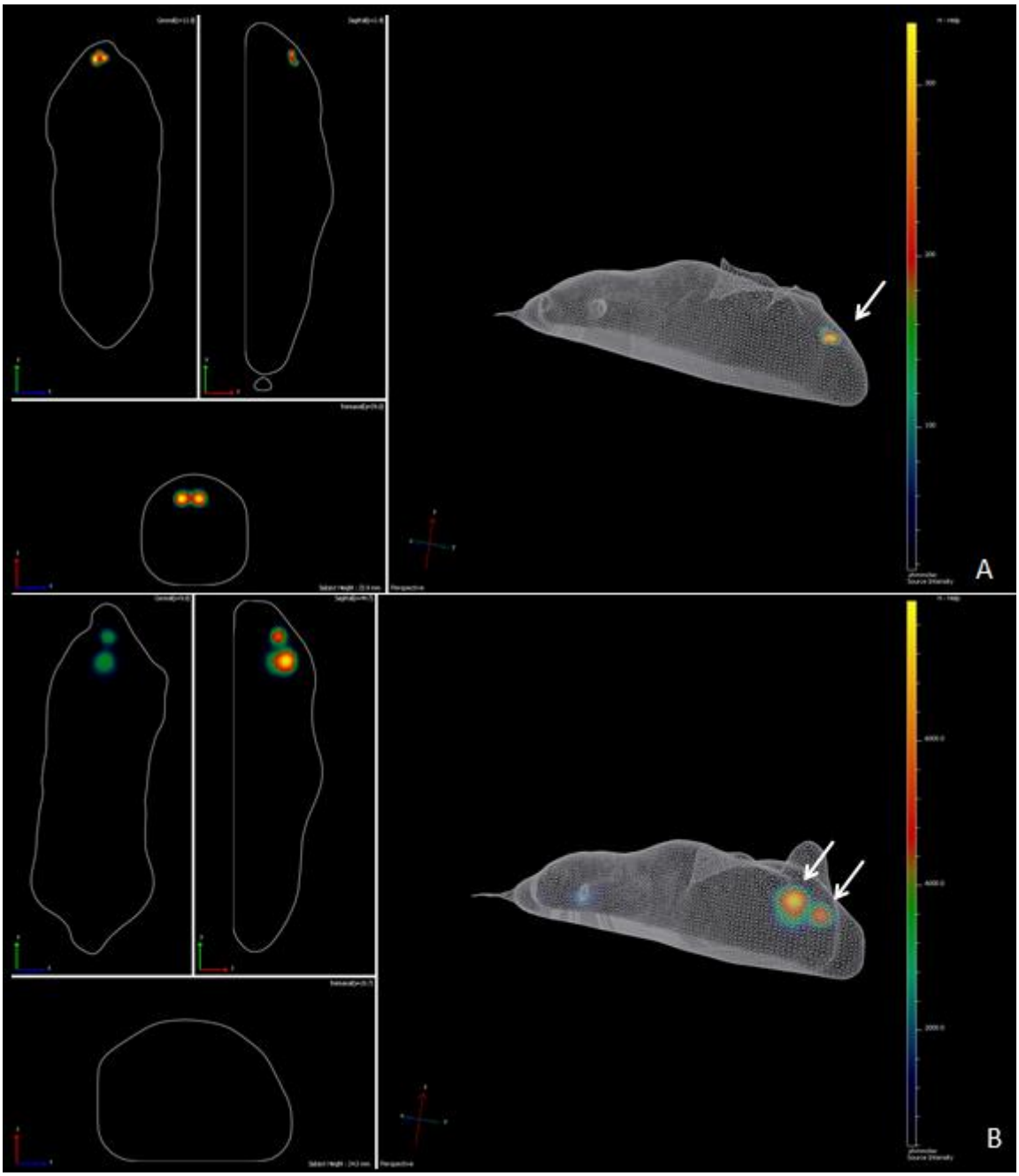
Temeljni signal TLR2 u svim miševima prije izlaganja intermitentnoj hipoksiji bio je smješten na frontalnom polu mozga što je u prijašnjoj literaturi interpretirano kao olfaktorni bulbus (147). U našem pokusu, *ex vivo* snimanja mozga *in toto* s dorzalne i ventralne strane pokazala su da temeljni signal dolazi iz prednjeg lateralnog olfaktornog trakta i prednje olfaktorne jezgre, kao i olfaktornog bulbusa kod nekih životinja (Slika 5.6.). Ovo je potvrđeno i 3D rekonstrukcijom signala DLIT-om (Slika 5.7.) te *ex vivo* snimanjima na rezovima mozga (Slika 5.8. i 5.9.)



Slika 5.6 **Ex vivo oslikavanje TLR2 BLI signala na cijelom mozgu.** *Nakon izlaganja 8h IH signal se intenzivirao u prednjoj olfaktornoj jezgri, olfaktornom traktu i olfaktornom bulbusu te su se također pojavili sekundarni lokusi ekspresije TLR2. Slika prikazuje bioluminiscentni signal u pseudo-boji superponiran na crno-bijelu fotografiju. Mjerilo označava ukupni zbroj*

protoka fotona (p/s/cm^2/sr) pridružen skali pseudo-boje (min = 9,27x 10^4 p/s/cm^2/sr; max = 7,46x 10^5 p/s/cm^2/sr).

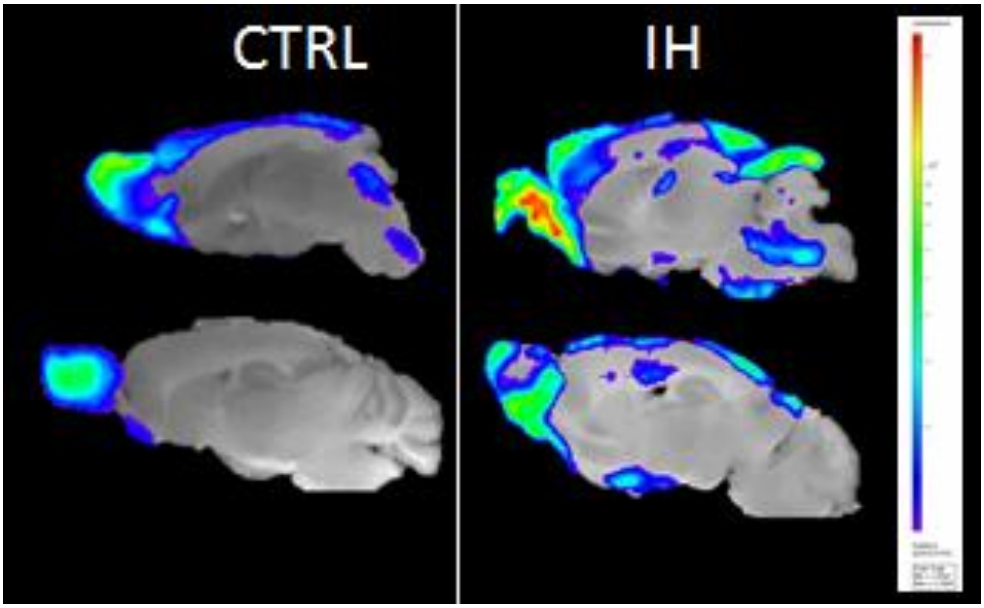
Nakon izlaganja IH, TLR2 signal se intenzivirao na frontalnom polu, što odgovara pojačanoj ekspresiji TLR2 iste lokalizacije (Slika 5.6). Signal se također proširio posteriorno, što govori u prilog drugom izvoru TLR2 signala koji se nakon izlaganja intermitentnoj hipoksiji pojavljuje u dovoljnoj mjeri da bude zabilježen na površini lubanje miša. Iz dobivenih 2D slika može se zaključiti da je drugi lokus medioponiran i manjeg intenziteta ekspresije od već spomenute olfaktorne regije. Ovaj nalaz pokazan je već nakon 8 h IH na *ex vivo* snimanju mozga *in toto* (Slika 5.6.) i na rezovima mozga (Slika 5.8. i 5.9.) te je zatim nakon 48 h IH potvrđen 3D rekonstrukcijom signala DLIT-om na kojoj se vidi drugi lokus ekspresije TLR2 koji postaje intenzivniji nakon izlaganja IH (Slika 5.7.).



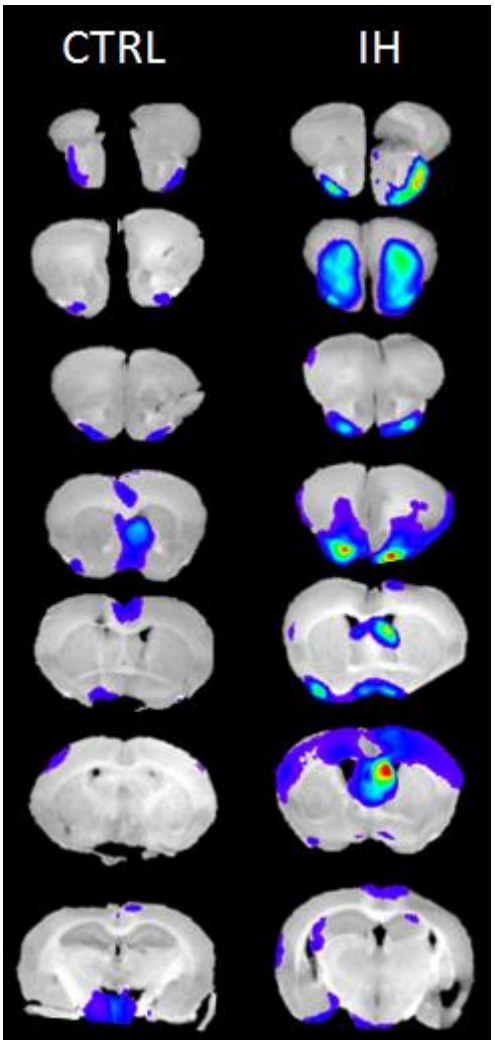
Slika 5.7. **3D rekonstrukcija bioluminiscentnog signala.** *(A)Ekspresija TLR2 prisutna je u olfaktornom bulbusu kontrolnog miša. (B) Ekspresija TLR2 nakon 48h izlaganja IH prisutna je u olfaktornom bulbusu i u drugom središtu ekspresije koji odgovara medijalnoj septalnoj jezgri. Lijevo su prikazani tranverzalni, sagitalni i koronalni presjeci kroz cijelo tijelo snimanog miša. Maska površine generirana je za svakog miša individualno.*

Kako bi se signal bolje lokalizirao, napravljeno je *ex vivo* BLI oslikavanje na koronalnim (Slika 5.8.) i sagitalnim (Slika 5.9.) rezovima mozga u umjetnom likvoru u kontrolnoj skupini te nakon 1 dana IH. Ovom metodom potvrđeni su nalazi 2D i 3D BLI *in vivo* oslikavanja.

Najjači signal dolazio je iz lateralnog olfaktornog trakta te je drugi intenzivni izvor bioluminiscentnog signala pokazan kao medijalna septalna jezgra. Pokazano je još nekoliko regija s BLI signalom koji nije bio dovoljno intenzivan da bude zabilježen *in vivo* oslikavanjem među kojima su najizraženiji piriformni i motorički korteks te regije unutar mezencefalona.



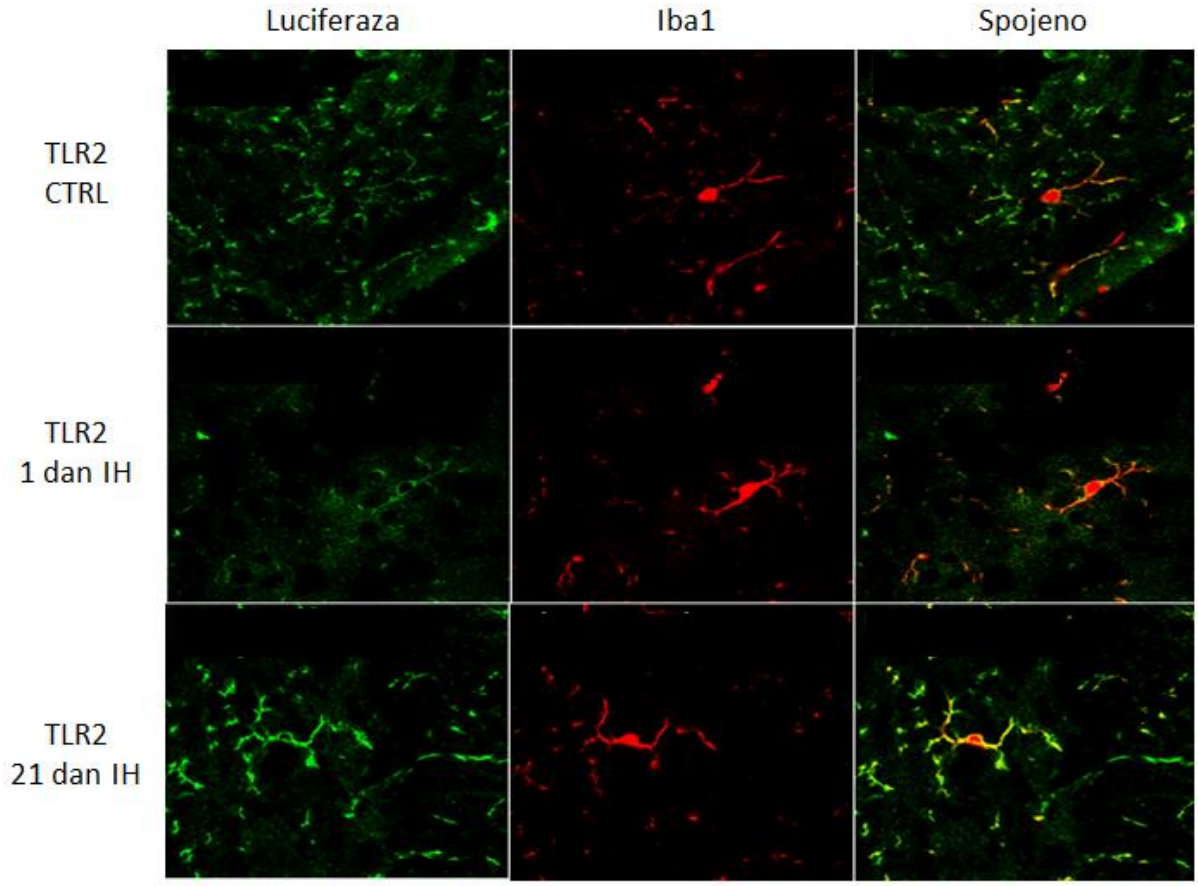
Slika 5.8. ***Ex vivo* oslikavanje TLR2 BLI signala na sagitalnim rezovima.** *Nakon izlaganja 8h IH signal se intenzivirao u prednjoj olfaktornoj jezgri, olfaktornom traktu i olfaktornom bulbusu te su se također pojavili sekundarni lokusi ekspresije TLR2 u piriformnom i motoričkom korteksu i mezencefalonu. Slika prikazuje bioluminiscentni signal u pseudo-boji superponiran na crno-bijelu fotografiju. Mjerilo označava ukupni zbroj protoka fotona (p/s/cm^2/sr) pridružen skali pseudo-boje. (min = 1,05x 10^4 p/s/cm^2/sr; max = 2,22x 10^5 p/s/cm^2/sr).*



Slika 5.9. ***Ex vivo*** **oslikavanje TLR2 BLI signala na koronalnim rezovima.** *Reprezentativne slike kontrolne skupine (CTRL) te skupine izložene intermitentnoj hipoksiji (IH). Nakon 8h izlaganja IH signal se intenzivirao u prednjoj olfaktornoj jezgri, olfaktornom traktu i olfaktornom bulbusu te su se također pojavili sekundarni lokusi ekspresije TLR2 najvidljiviji u septalnim jezgrama te u piriformnom i motoričkom korteksu. Slika prikazuje bioluminiscentni signal u pseudo-boji superponiran na crno-bjelu fotografiju.*

5.4 Bioluminiscentni signal primarno dolazi iz stanica mikroglije

Imunofluorescencijskim bojanjem protutijelima za luciferazu te Iba1-marker mikroglije pokazano je kako su oba signala prisutna u istim stanicama. Na slici 5.10. je prikazano kako kolokalizacija ostaje prisutna i u akutnoj i u kroničnoj vremenskoj točci izlaganja intermitentnoj hipoksiji.



Slika 5.10. **Kolokalizacija signala luciferaze i Iba1 pozitivnih stanica u trima vremenskim točkama.** *Slika prikazuje imunofluorescencijske snimke bojanja luciferaznim protutijelom (zeleni signal) te Iba1-protutijelom, markerom mikroglije (crveni signal). Vidljivo je kako signali kolokaliziraju u kontrolnoj skupini, te u miševa izloženih 1. danu i 21. danu intermitentne hipoksije (žuti signal).*

5.5 Intermitentna hipoksija uzrokuje značajni pad tjelesne težine

Prije izlaganja IH sve grupe su bile izvagane te je utvrđeno kako se skupine miševa statistički značajno razlikuju u početnim vrijednostima ($TT_{početna}$ (TLR2 IH)= 25,09 ± 2,65 g; $TT_{početna}$ ($TLR2^{-/-}$ IH) = 27,29 ± 1,95 g; $TT_{početna}$ (TLR2 CTRL) = 24,93 ± 3,33 g; $TT_{početna}$ ($TLR2^{-/-}$ CTRL)= 28,67 ±2,80 g). Iz ovog razloga za sve daljnje usporedbe sve težine su normirane za početnu težinu ($TT = TT_{početna}/ TT_{vremenske\ točke\ x}$).

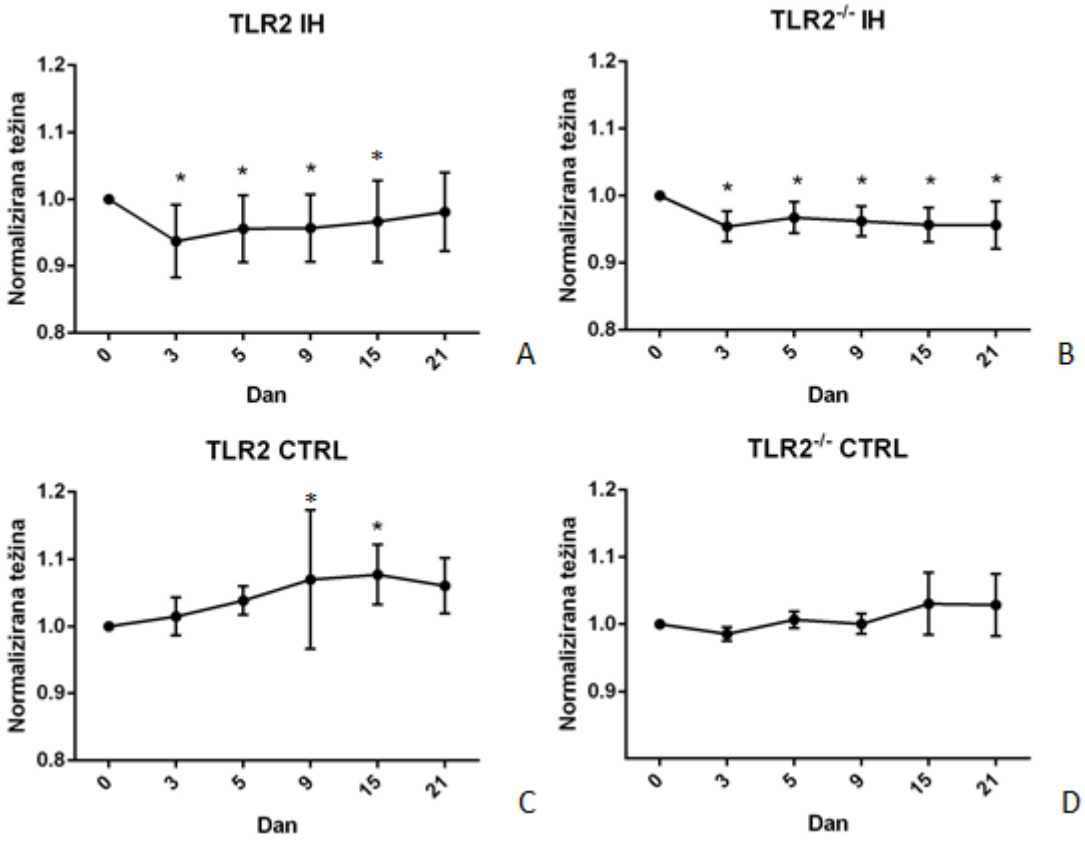
U skupini s funkcionalnim genom TLR2, tijekom izlaganja intermitentnoj hipoksiji tjelesna težina miševa statistički je značajno pala 3 dana nakon početka izlaganja u usporedbi s početnom težinom prije početka izlaganja IH (prilagođeni $P < 0,000$). Pad tjelesne težine

ostao je statistički značajan 5., 9. i 15. dana nakon izlaganja IH (prilagođeni P = 0,003 ; P = 0,003; P = 0,032) (TT_{5dana}(TLR2 IH) = 0,96 ±0,05; TT_{9dana}(TLR2 IH) = 0,96 ±0,05), a zatim je tjelesna težina počela blago rasti prema početnim vrijednostima (Slika 5.11. A).

U $TLR2^{-/-}$ IH skupini statistički značajan pad težine je usljedio također trećeg dana nakon početka izlaganja u usporedbi s početnom (prilagođeni P < 0,000), no za razliku od TLR2 IH skupine, težina je ostala značajno snižena tijekom cijelog protokola u usporedbi s početnom (prilagođeni P < 0,000 za sve vremenske točke) (Slika 5.11. B).

TLR2 CTRL skupina tijekom 20 dana trajanja protokola počela je dobivati na tjelesnoj težini u usporedbi s težinom prije početka pokusa što je doseglo statistički značajnu razliku 9. dana (prilagođeni P = 0,026) i ostalo povišeno 15. dana protokola (prilagođeni P = 0,005) (Slika 5.11. C).

$TLR2^{-/-}$ CTRL skupina je ostala stabilne tjelesne težine tijekom trajanja protokola intermitentne hipoksije (Slika 5.11. D).



Slika 5.11 **Kretanje tjelesne težine životinja tijekom izlaganja IH**. *Grafovi A, B, C i D prikazuju kretanje težine kroz dane eksperimenta za svaku skupinu zasebno. X-os označava dane trajanja protokola, Y-os označava normaliziranu težinu za faktor početne težine. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± SD. Zvjezdice označavaju statističku značajnost dobivenu ANOVA-testom usporedbom svake vremenske točke s početnom definiranom kao p< 0,05.*

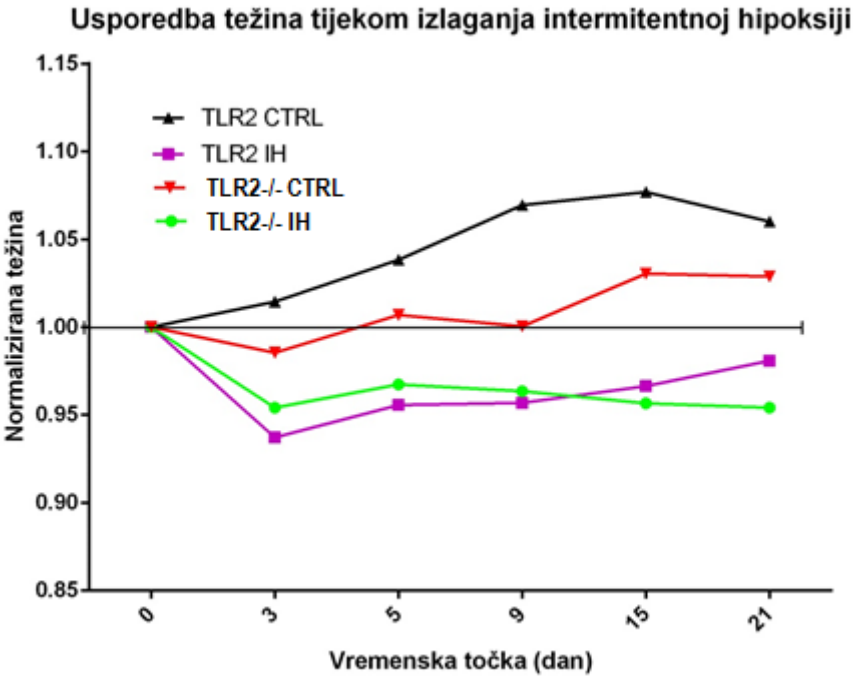
Uspoređena je dinamika fluktuacije tjelesne težine pojedinih grupa. Pokazano je kako su se težine TLR2 IH i TLR2 CTRL grupe statistički značajno razlikovale u svim točkama nakon početka intermitentne hipoksije (Tablica 5.3., Slika 5.12.).

Usporedbom $TLR2^{-/-}$ IH i $TLR2^{-/-}$ CTRL skupine također je pokazano kako je tjelesna težina miševa izloženih IH bila statistički značajno manja u svim vremenskim točkama u usporedbi s kontrolom (Tablica 5.3., Slika 5.12.).

Uspoređujući obje skupine izložene intermitetnoj hipoksiji, nije nađen efekt gena na promjene tjelesne težine tijekom eksperimenta (Tablica 5.3., Slika 5.12.). Također, međusobnom usporedbom TLR2 CTRL i $TLR2^{-/-}$ CTRL nije pronađena nikakva razlika u tjelesnim težinama skupina (Tablica 5.3., Slika 5.12.), osim 9. dana pokusa.

Dan protokola	0	3	5	9	15	20
TLR2 IH ($\bar{x}$ ± SD)	1,00	0,94 ±0,05	0,96±0,05	0,96±0,05	0,97±0,06	0,97±0,05
$TLR2^{-/-}$ IH ($\bar{x}$± SD)	1,00	0,95±0,02	0,97±0,02	0,96±0,02	0,96±0,03	0,95±0,04
TLR2 CTRL ($\bar{x}$ ± SD)	1,00	1,01±0,03	1,04±0,02	1,06±0,10	1,08±0,04	1,06±0,05
$TLR2^{-/-}$ CTRL ($\bar{x}$ ± SD)	1,00	0,99±0,01	1,01±0,01	1,00±0,01	1,03±0,05	1,00±0,01

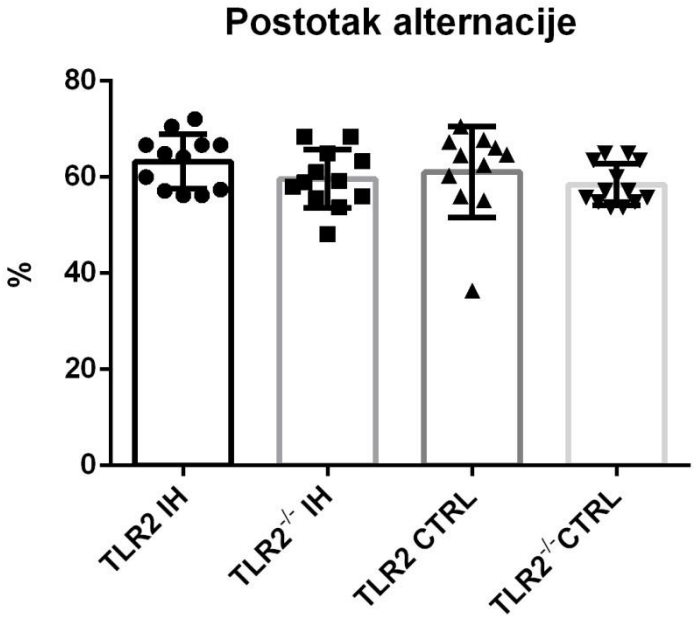
Tablica 5.3 **Srednje vrijednosti i standardne devijacije (SD) normalizirane težine tijekom dana izlaganja intermitentnoj hipoksiji za sve skupine.**



Slika 5.12 **Razlike težine među svim skupinama životinja tijekom izlaganja IH.** *IH je dovela do značajnog pada tjelesne težine tijekom svih vremenskih točaka izlaganja u usporedbi s kontrolnim skupinama. TLR2 IH i TLR2$^{-/-}$ IH skupine se nisu značajno međusobno razlikovale (zelena i ljubičasta linija). Kontrolne skupine su se međusobno razlikovale samo 9. dana protokola (crna i crvena linija). Y-os označava normaliziranu težinu za faktor početne težine. Vrijednosti su izražene kao srednje vrijednosti, statistička značajnost nije prikazana na grafu zbog preglednosti.*

5.6 IH ne remeti sposobnost prostornog pamćenja

Životinje su testirane u Y-labirintu te je njihova sposobnost za prostorno učenje procijenjena je varijablom „postotak spontane alternacije“. Ova varijabla se nije razlikovala ni u jednoj skupini miševa (Slika 5.13.)



Slika 5.13. **Postotak spontane alternacije nakon izlaganja IH.** *Dijagram rasipanja prikazuje srednje vrijednosti postotka spontane alternacije ± SD te svaku pojedinu vrijednost kako bi se prenijela informacija o varijabilnosti među životinjama. Zvjezdice označavaju statističku značajnost definiranu kao P < 0,05 prema ANOV-testu sa Sidakovim testom za višestruke usporedbe.*

Unatoč negativnoj razlici u primarnom kriteriju, nađene su razlike među skupinama u drugim varijablama Y-labirinta.

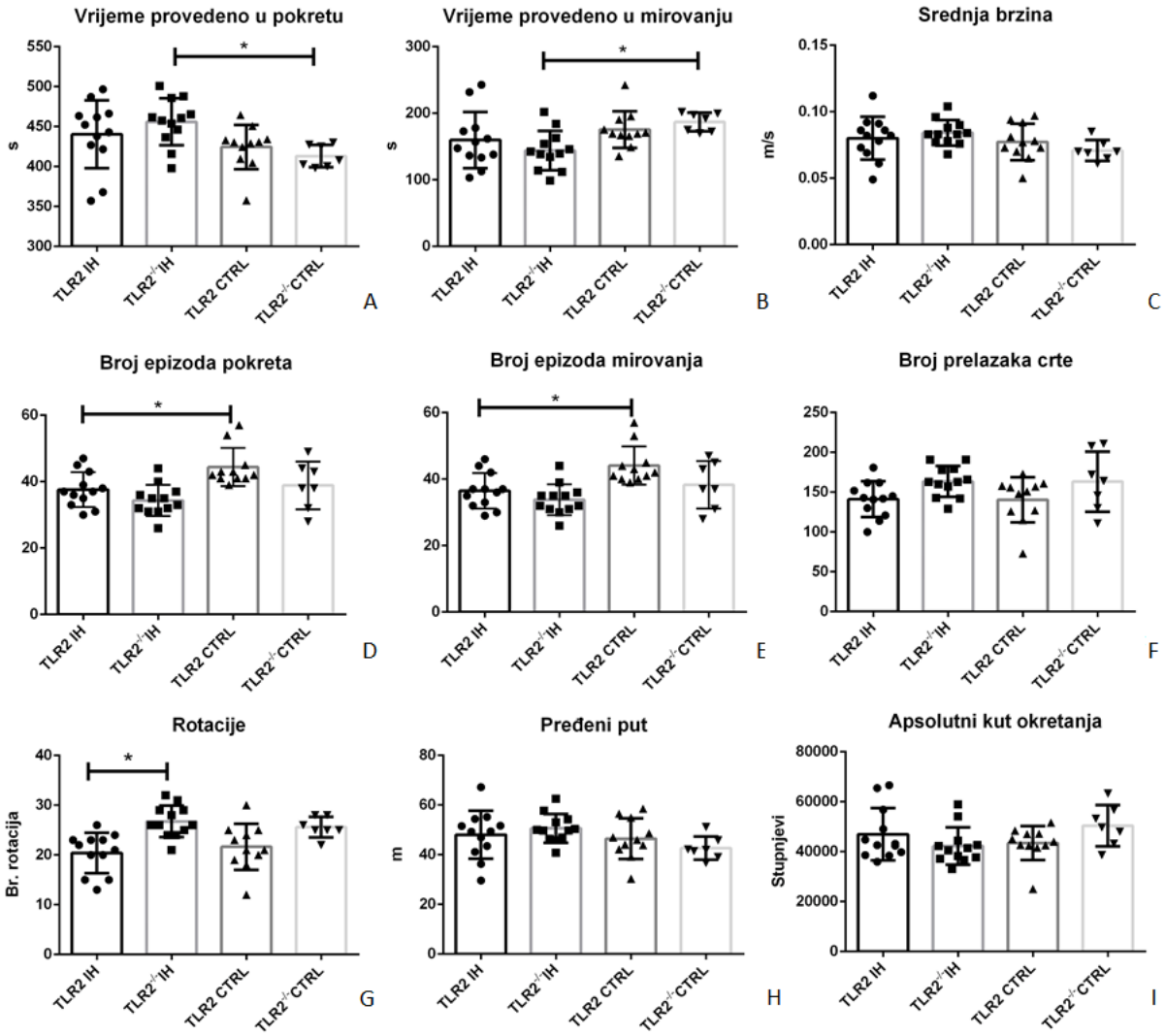
Miševi u $TLR2^{-/-}$ IH skupini više su vremena proveli u kretanju i manje u mirovanju u usporedbi s $TLR2^{-/-}$ CTRL skupinom ($t_{kretanje}$ ($TLR2^{-/-}$ IH) = 455,93 ±29,42 s vs. $t_{kretanje}$($TLR2^{-/-}$ CTRL) = 413,09 ± 13,93 s; prilagođeni P = 0,028 te $t_{mirovanje}$($TLR2^{-/-}$ IH)= 144,08 ± 29,42 s vs. $t_{mirovanje}$($TLR2^{-/-}$ CTRL) = 186,91 ± 13,03 s P = 0,028) (Slika 5.14.A, B). Pokazano je kako su TLR2 IH miševi imali statistički značajno manje pokretnih i nepokretnih epizoda (Slika 5.14. D, E), u smislu manjeg broja zastajkivanja i ponovnog kretanja u usporedbi s TLR2 CTRL skupinom ($N_{pokreta}$ (TLR2 IH) = 37,58 ± 5,28 vs. $N_{pokreta}$ (TLR2 CTRL) = 44,36 ± 5,75; prilagođeni P = 0,024 te $N_{mirovanja}$ (TLR2 IH) = 36,50 ± 5,32 vs. $N_{mirovanja}$ (TLR2 CTRL) = 44,09 ± 5,75; prilagođeni P = 0,010). S obzirom na učinak genotipa, $TLR2^{-/-}$ IH miševi bili su skloni većem broju rotacija ($N_{rotacija}$(TLR2 IH) = 20,42 ± 4,06 vs. $N_{rotacija}$ ($TLR2^{-/-}$ IH) = 26,75 ± 3,17; prilagođeni P = 0,001) (Slika 5.14 G). Slični trend pokazan je i u $TLR2^{-/-}$ IH skupini u

usporedbi s TLR2$^{-/-}$ CTRL, no nije dosegao statističku značajnost ($N_{rotacija}$(TLR2 CTRL) = 21,64 ± 4,65 vs. $N_{rotacija}$ (TLR2$^{-/-}$ CTRL) = 25,57 ± 2,07; prilagođeni P = 0,1).

Rrazlike nisu nađene u parametrima opće pokretnosti: srednjoj brzini, pređenome putu i broju prelazaka crta (Slika 5.14. C, F, H), kao ni u apsolutnom kutu okretanja (Slika 5.14. I).

	Srednja brzina [m/s]		Pređeni put [m]		Br. prelazaka crta		Apsolutni kut okretanja [^{o}]	
	$\bar{x}$	± SD	$\bar{x}$	± SD	$\bar{x}$	± SD	$\bar{x}$	± SD
TLR2 IH	0,08	0,02	48,05	9,71	141,08	22,47	46991,00	10471,86
TLR2$^{-/-}$ IH	0,08	0,01	50,62	5,75	163,50	19,30	42262,33	7423,61
TLR2 CTRL	0,08	0,01	46,45	8,18	140,45	28,39	43429,45	6819,24
TLR2$^{-/-}$ CTRL	0,07	0,01	42,64	4,69	163,14	37,62	50424,00	8257,70

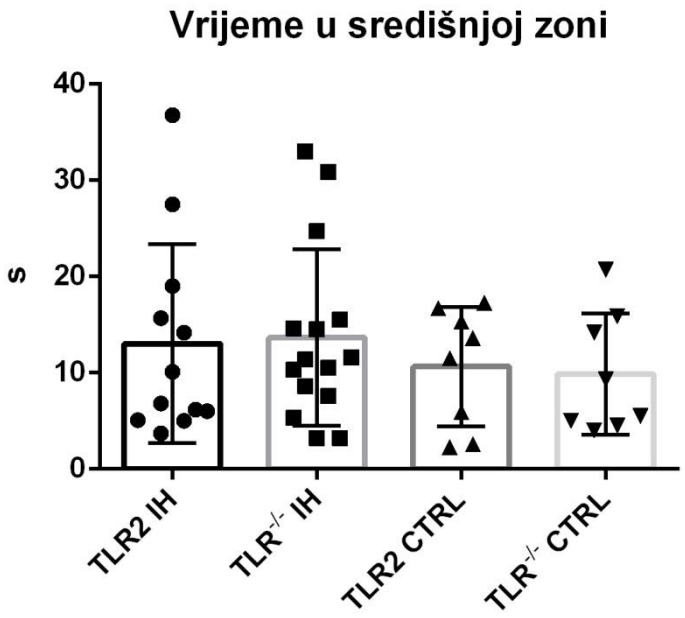
Tablica 5.4 **Srednje vrijednosti i standardne devijacije srednje brzine, pređenog puta broja prelazaka crte te apsolutnog kuta okretanja u testu Y-labirinta.** Nisu nađene razlike među skupinama u ovim parametrima.



Slika 5.14. **Rezultati sekundarnih varijabli ponašanja u Y-labirintu.** *Snimanje ponašanja životinja praćeno je softwareom AnyMaze za analizu pokreta. Pronađene su razlike u vremenu provedenom u pokretu (s) (A) te mirovanju (s) (B) u TLR2$^{-/-}$ IH skupini u usporedbi s TLR2$^{-/-}$ CTRL. Srednja brzina (m/s) (C) se nije značajno razlikovala među skupinama. Broj epizoda mirovanja (D) te epizoda pokreta (E) pokazan je kao manji u TLR2 IH miševa s obzirom na TLR2 CTRL. Broj prelazaka crta među zonama nije se značajno razlikovao među skupinama (F). TLR2$^{-/-}$ IH skupina pokazala je sklonost većem broju rotacija u usporedbi s TLR2 IH skupinom (G). Prijeđeni put (m) (H) i apsolutni kut okretanja (stupnjevi) (I) nisu se razlikovali među skupinama. Dijagram rasipanja prikazuje srednje vrijednosti ± SD i svaku pojedinu vrijednost kako bi se prenijela informacija o varijabilnosti među životinjama. Zvjezdice označavaju statističku značajnost definiranu kao P < 0,05 prema ANOVA-testu sa Sidakovim testom za višestruke usporedbe.*

5.7 IH ne mijenja ponašanje životinja u otvorenom polju

Anksioznost miševa testirana je vremenom provedenim u središnjoj zoni otvorenog polja, koju miševi uobičajeno izbjegavaju zbog njene izloženosti. Nije pokazana značajna razlika između TLR2 IH i TLR2$^{-/-}$ IH skupine i njihovih kontrolnih skupina (Slika 5.15.).



Slika 5.15. **Vrijeme provedeno u središnjoj zoni otvorenog polja nakon izlaganja IH**. *Nisu pronađene statistički značajne razlike u vremenu provedenom u središtu otvorenog polja. Dijagram rasipanja prikazuje srednje vrijednosti vremena provedenog u središnjoj zoni ± SD i svaku pojedinu vrijednost kako bi se prenijela informacija o varijabilnosti među životinjama. Varijabilnost među životinjama izloženima IH je veća u usporedbi s kontrolnim skupinama. Statistička značajnost definiranu je kao P < 0,05 prema ANOVA-testu sa Sidakovim testom za višestruke usporedbe.*

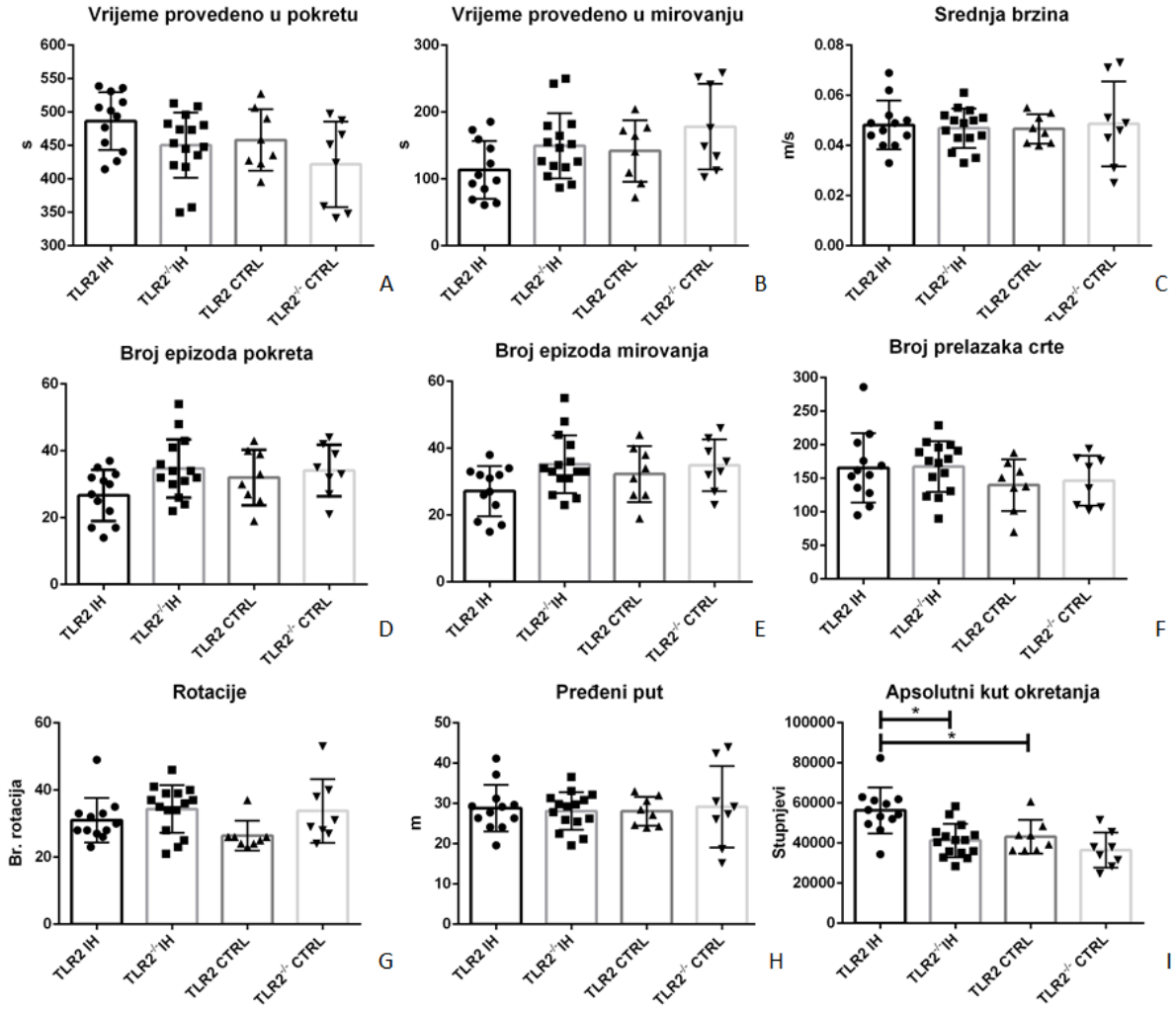
Nije nađena razlika između skupina u općim parametarima pokretljivosti kao što je pređeni put, prosječna brzina kretanja i broj prelazaka crta između pojedinih zona (Tablica 5.5, Slika 5.16. C, F, H).

	Srednja brzina [m/s]		Pređeni put [m]		Br. prelazaka crta	
	$\bar{x}$	±SD	$\bar{x}$	±SD	$\bar{x}$	±SD
TLR2 IH	0,05	0,01	28,85	5,81	165,58	51,73
$TLR2^{-/-}$ IH	0,05	0,01	24,93	9,93	139,75	38,32
TLR2 CTRL	0,05	0,01	28,11	4,67	167,47	37,84
$TLR2^{-/-}$ CTRL	0,05	0,02	29,18	10,12	146,38	37,18

Tablica 5.5 **Srednje vrijednosti i standardne devijacije srednje brzine, pređenog puta i broja prelazaka crte u testu otvorenog polja.**

Vrijeme provedeno u pokretu i u mirovanju pokazalo je tendenciju povećanju nakon izlaganja intermitentnoj hipoksiji što je donekle u skladu sa statistički značajnim razlikama istog parametra u Y-labirintu (Slika 5.16 A, B). Također, slično kao u Y-labirintu, broj epizoda mirovanja i pokreta bio je manji u TLR2 IH skupini nego u $TLR2^{-/-}$ IH skupini ($N_{mirovanja}$ (TLR2 IH) = 26,67 ± 7,67 vs. $N_{mirovanja}$ ($TLR2^{-/-}$ IH) = 34,73 ± 8,71; prilagođeni P = 0,058 te $N_{pokreta}$ (TLR2 IH) = 27,17 ± 7,47 vs. $N_{pokreta}$ ($TLR2^{-/-}$ IH) = 35,20 ± 8,69; prilagođeni P= 0,058) (Slika 5.16. D, E).

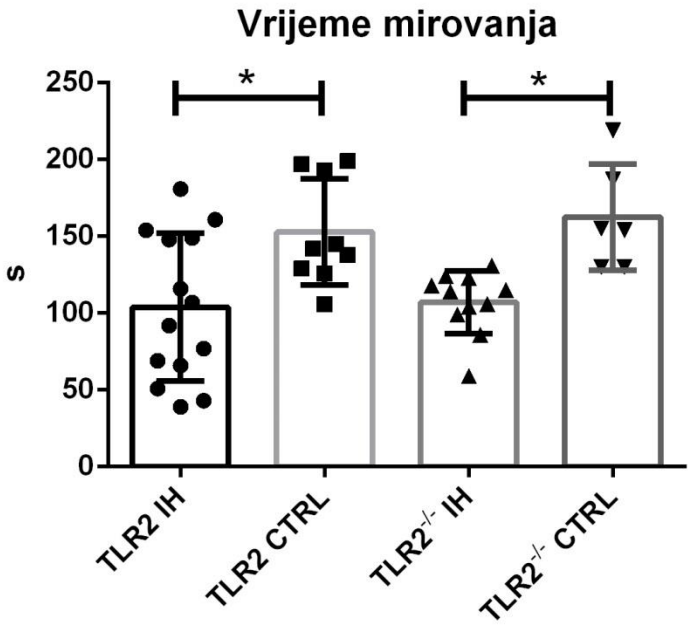
Nađen je statistički značajno povišen apsolutni kut okretanja u TLR2 IH skupini u usporedbi s TLR2 CTRL, u usporedbi s $TLR2^{-/-}$ skupinom (Kut(TLR2 IH)= 56252,16 ± 11455,53 stupnjeva u usporedbi s Kut(TLR2 CTRL)= 43144,37 ± 8385,89, prilagođeni P = 0,016; te s Kut($TLR2^{-/-}$ IH) = 41261,33 ±8279,64; P = 0,001) (Slika 5.16. I).



Slika 5.16. **Rezultati sekundarnih varijabli ponašanja u otvorenom polju.** *Rezultati su izračunati računalnom obradom video-snimke testiranja svakog miša individualno. Nisu pronađene statistički značajne razlike u vremenu provedenom u pokretu (s)(A) i mirovanju (s)(B), iako su trendovi bili slični nađenim rezultatima u Y-labirintu. Srednja brzina (m/s) (C,) broj epizoda mirovanja (D), epizoda pokreta (E i, broj prelazaka crta između zona (F) nisu se značajno razlikovali među skupinama. Skupine se nisu razlikovale prema broju rotacija (G) ni pređenom putu (m) (H). Apsolutni kut okretanja (stupnjevi) (I) bio je značajno veći u TLR2 IH skupini u usporedbi s TLR2 CTRL i TLR2 $^{-/-}$ skupinom. Dijagram rasipanja prikazuje srednje vrijednosti ± SD i svaku pojedinu vrijednost kako bi se prenijela informacija o varijabilnosti među životinjama. Zvjezdice označavaju statističku značajnost definiranu kao P < 0,05 prema ANOV- testu sa Sidakovim testom za višestruke usporedbe.*

5.8 IH skraćuje vrijeme mirovanja u testu visenja na repu u životinja s funkcionalnim genom TLR2

Mjerenjem vremena mirovanja na testu visenja na repu utvrđeno je kako intermitentna hipoksija uzrokuje povećanu ekscitaciju životinja u usporedbi s kontrolama. Ova razlika dosegla je statističku značajnost u usporedbi TLR2 IH skupine s TLR2 CTRL skupinom ($t_{mirovanja}$(TLR2 IH) = 103,08 ± 48,11s vs. $t_{mirovanja}$(TLR2 CTRL) = 152,8 ± 34,6 s; prilagođeni P= 0,016), i u usporedbi $TLR2^{-/-}$ IH i $TLR2^{-/-}$ CTRL skupine ($t_{mirovanja}$($TLR2^{-/-}$ IH) = 107,2 ± 20,43s vs. $t_{mirovanja}$($TLR2^{-/-}$ CTRL) = 162,5 ± 34,74 s; prilagođeni P = 0,023 (Slika 5.17.).



Slika 5.17. **Utjecaj IH na vrijeme mirovanja u testu visenja na repu.** *Individualno mjerenje vremena mirovanja na video-snimci testa visenja na repu pokazalo je kako se životinje izložene IH više otimaju i trude osloboditi neželjenog položaja. Razlika je dosegla statističku značajnost između TLR2 IH i TLR2 CTRL skupine te između $TLR2^{-/-}$ IH i $TLR2^{-/-}$ CTRL. Dijagram rasipanja prikazuje srednje vrijednosti ± SD i svaku pojedinu vrijednost kako bi se prenijela informacija o varijabilnosti među životinjama. Zvjezdica označava statističku značajnost definiranu kao P < 0,05 prema ANOV- testu sa Sidakovim testom za višestruke usporedbe.*

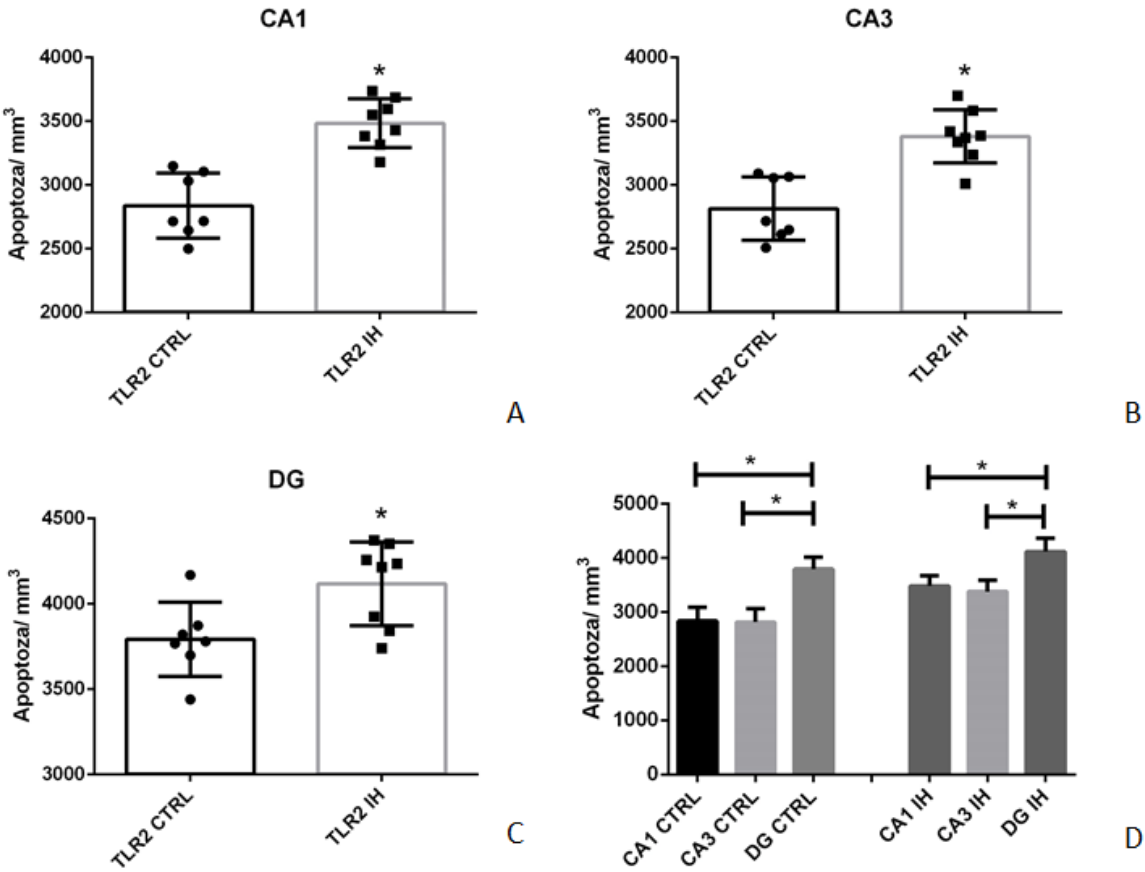
5.9 Broj apoptoza neurona u podregijama hipokampusa je veći u miševa izloženih IH

Kvantifikacijom apoptoza u dentatnom girusu i u podregiji hipokampusa CA1 i CA3 u TLR2 IH i TLR2 CTRL skupini utvrđen je povećan broj apoptoza u svim navedenim regijama interesa u skupini izloženoj intermitentnoj hipoksiji (P(CA1) < 0,000; P(CA3) < 0,000; P(DG)= 0,018) (Tablica, Slika 5.18. A, B, C). Broj apoptoza izračunat je s obzirom na analiziranu površinu koja je bila jednaka u pojedinim regijama interesa u objema ispitivanim skupinama.

	CA1		CA3		DG	
	$\bar{x}$	± SD	$\bar{x}$	± SD	$\bar{x}$	± SD
TLR2 CTRL	2836	253.9	2813	247.6	3792	217
TLR2 IH	3483	191.4	3379	208.4	4116	244.8

Tablica 5.6 **Srednje vrijednosti i standardne devijacije stereološkog brojanja apoptotičnih stanica u regijama hipokampusa CA1, CA3 i DG, vrijednosti iskazuju stanice/mm^3.**

Broj apoptoza po mm^3 bio je značajno veći u dentatnom girusu u usporedbi s brojem apoptoza u regiji hipokampusa CA1 i CA3 ($N_{apoptoza}$ (CA1 CTRL) = 2836 ± 253,9; $N_{apoptoza}$ (CA3 CTRL) = 2813 ±247,6; $N_{apoptoza}$ (DG CTRL) = 3792 ± 217,0; P< 0,000 te $N_{apoptoza}$ (CA1 IH) = 3483 ± 191,4; $N_{apoptoza}$ (CA3 IH) = 3379 ± 208,4; $N_{apoptoza}$ (DG IH) = 4116 ±244.8; P< 0,000) (Slika 5.18 D).



Slika 5.18 **Broj apoptotičkih neurona u regiji hipokampusa CA1, CA3 i DG nakon izlaganja IH.** *Broj apoptotičnih neurona bio je veći u skupini miševa izloženih IH u CA1 (A), CA3 (B) i girusu dentatusu (C). Vrijednosti na Y-osi su dane kao broj apoptoza u mm^3 tkiva. Slika (D) prikazuje usporedbu brojeva apoptotičnih neurona u mm^3 između pojedinih regija u CTRL i IH skupini. U obje skupine broj apoptoza je značajno veći u girusu dentatusu.*
Dijagram rasipanja prikazuje srednje vrijednosti ± SD i svaku pojedinu vrijednost kako bi se prenijela informacija o varijabilnosti među životinjama. Zvjezdice označuju statističku značajnost definiranu kao P <0,05 dobivenu t-testom.

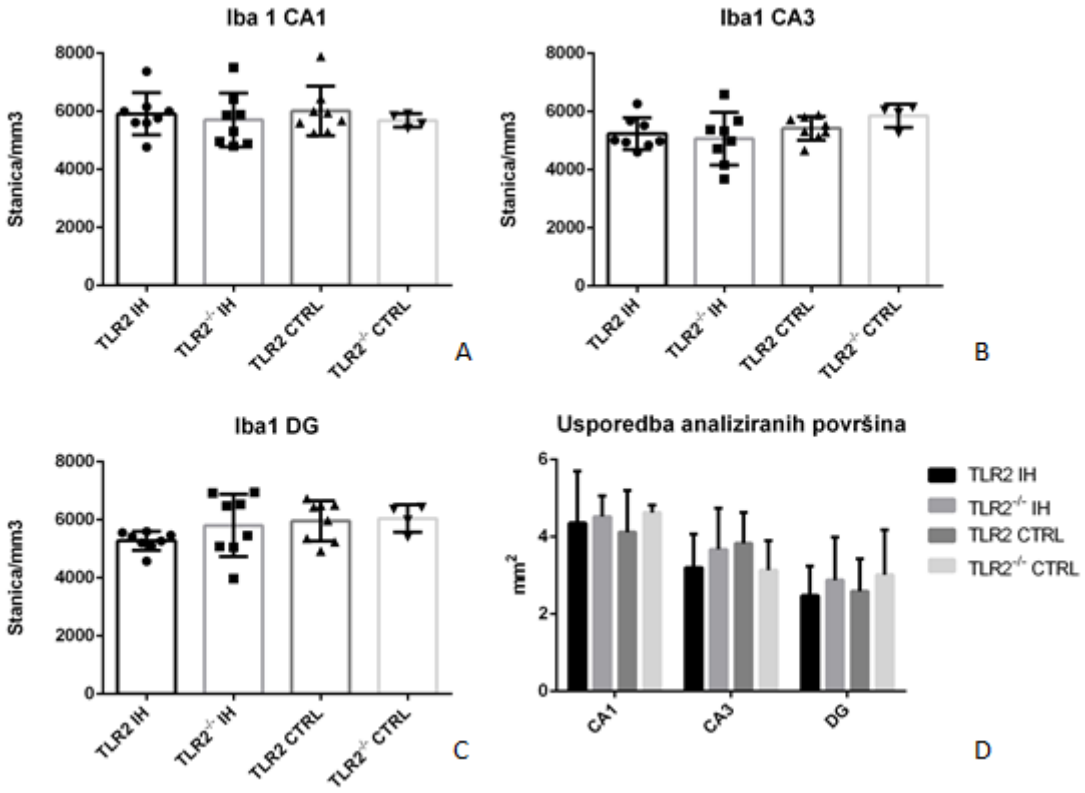
5.10 Broj stanica mikroglije ne mijenja se tijekom intermitentne hipoksije niti ne ovisi o genu TLR2

Broj stanica mikroglije stereološki je analiziran na histološkim rezovima obilježenim Iba1-protutijelom. Analizirani su girus dentatus, polje hipokampusa CA1 i CA3 te također talamus

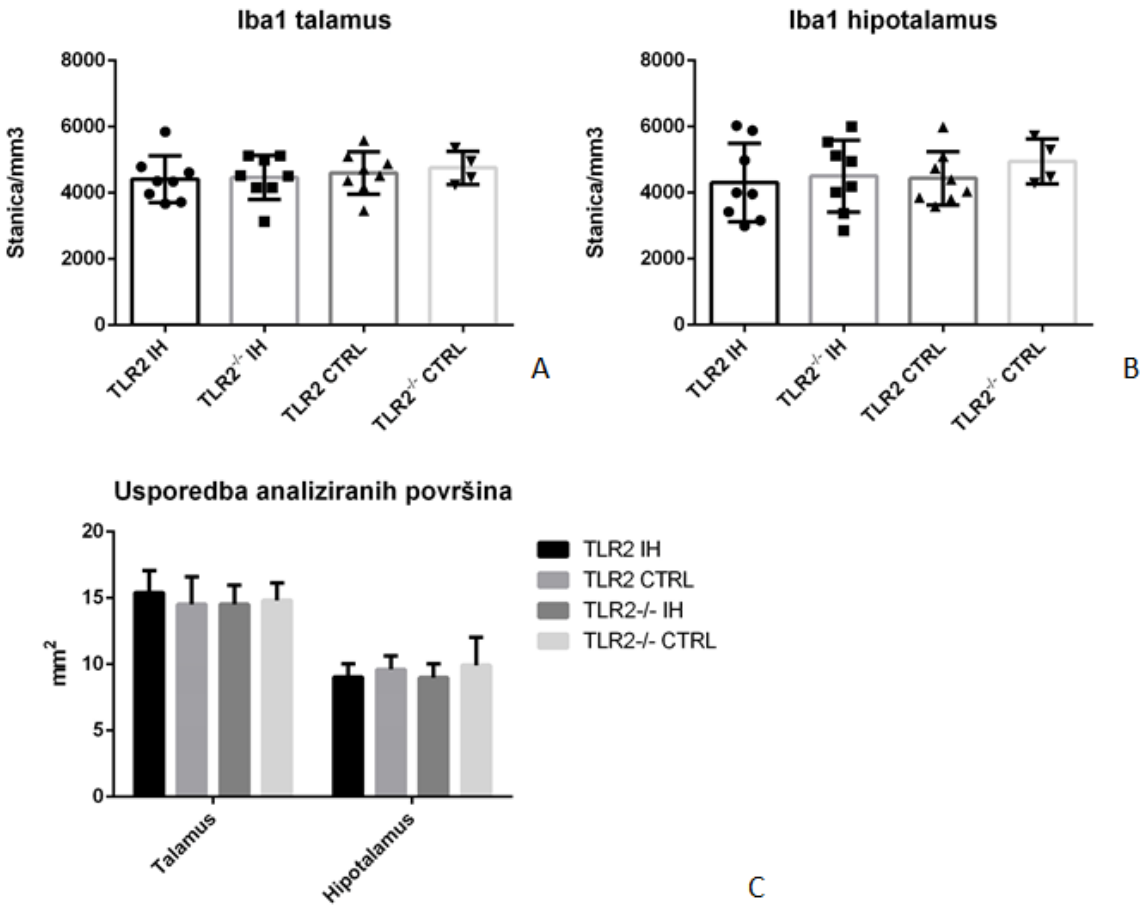
i hipotalamus u svim četirima skupinama životinja. Na kraju su posebno analizirani dorzalni i ventralni dio hipokampusa. Kvantifikacija nije utvrdila statistički značajne razlike u brojevima Iba1-pozitivnih stanica po mm^3 tkiva ni u jednoj regiji interesa (Tablica 5.7, Slika 5.19, 5.20, 5.21.).

		TLR2 IH	$TLR2^{-/-}$ IH	TLR2 CTRL	$TLR2^{-/-}$ CTRL
Iba1 talamus	$\bar{x}$	4416	4464	4601	4755
	± SD	704	663	638	499
Iba1 hipotalamus	$\bar{x}$	4306	4503	4436	4945
	± SD	1191	1084	809	678
Iba1 CA1	$\bar{x}$	5911	5702	6011	5684
	± SD	729	928	854	232
Iba1 CA3	$\bar{x}$	5235	5068	5420	5855
	± SD	547	906	403	401
Iba1 DG	$\bar{x}$	5277	5805	5959	6046
	± SD	330	1073	695	472
Iba1 dorzalni hipokampus	$\bar{x}$	5782	5592	5864	5887
	± SD	527	697	471	511
Iba1 ventralni hipokampus	$\bar{x}$	5059	4987	5390	5086
	± SD	512	651	538	310

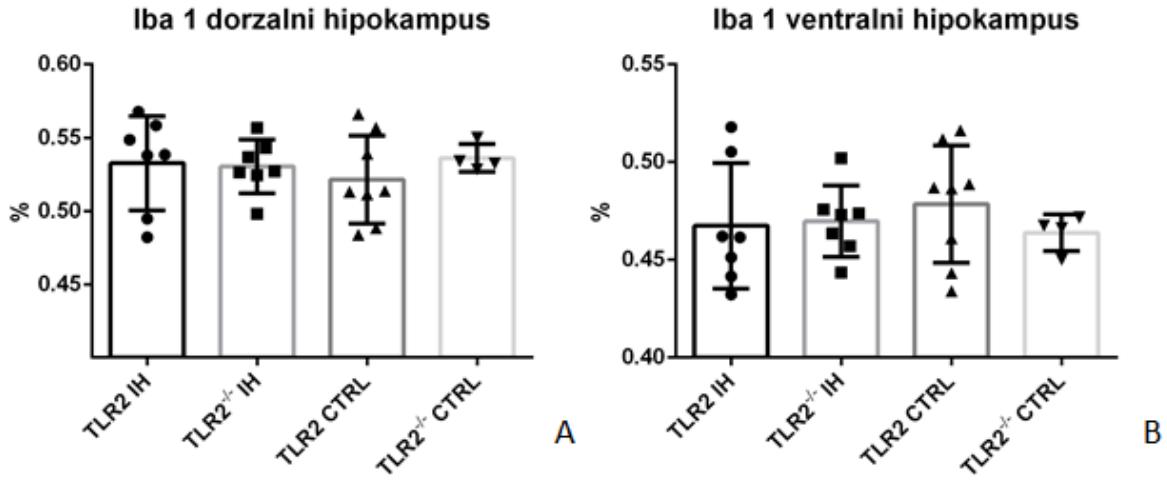
Tablica 5.7. **Srednje vrijednosti i standardne devijacije stereološkog brojanja Iba1 pozitivnih stanica u talamusu, hipotalamusu, regijama hipokampusa CA1, CA3 i DG, dorzalnom te ventralnom hipokampusu.** *Vrijednosti iskazuju stanice/mm^3.*



Slika 5.19. **Broj Iba1 pozitivnih stanica nije promijenjen nakon izlaganja IH u CA1, CA3 i DG.** *Slika prikazuje stereološke izračune brojeva Iba1 pozitivnih stanica u mm^3 tkiva u CA1 (A), CA3 (B) i DG (C). Dijagram rasipanja prikazuje srednje vrijednosti ± SD i svaku pojedinu vrijednost kako bi se prenijela informacija o varijabilnosti među životinjama. Nisu pronađene statistički značajne razlike među skupinama uz $P < 0,05$. Usporedba analiziranih površina prikazuje površine u mm^2 po skupinama i regijama interesa (D). Nije bilo značajnih razlika u analiziranim površinama. Graf prikazuje srednje vrijednosti ± SD.*

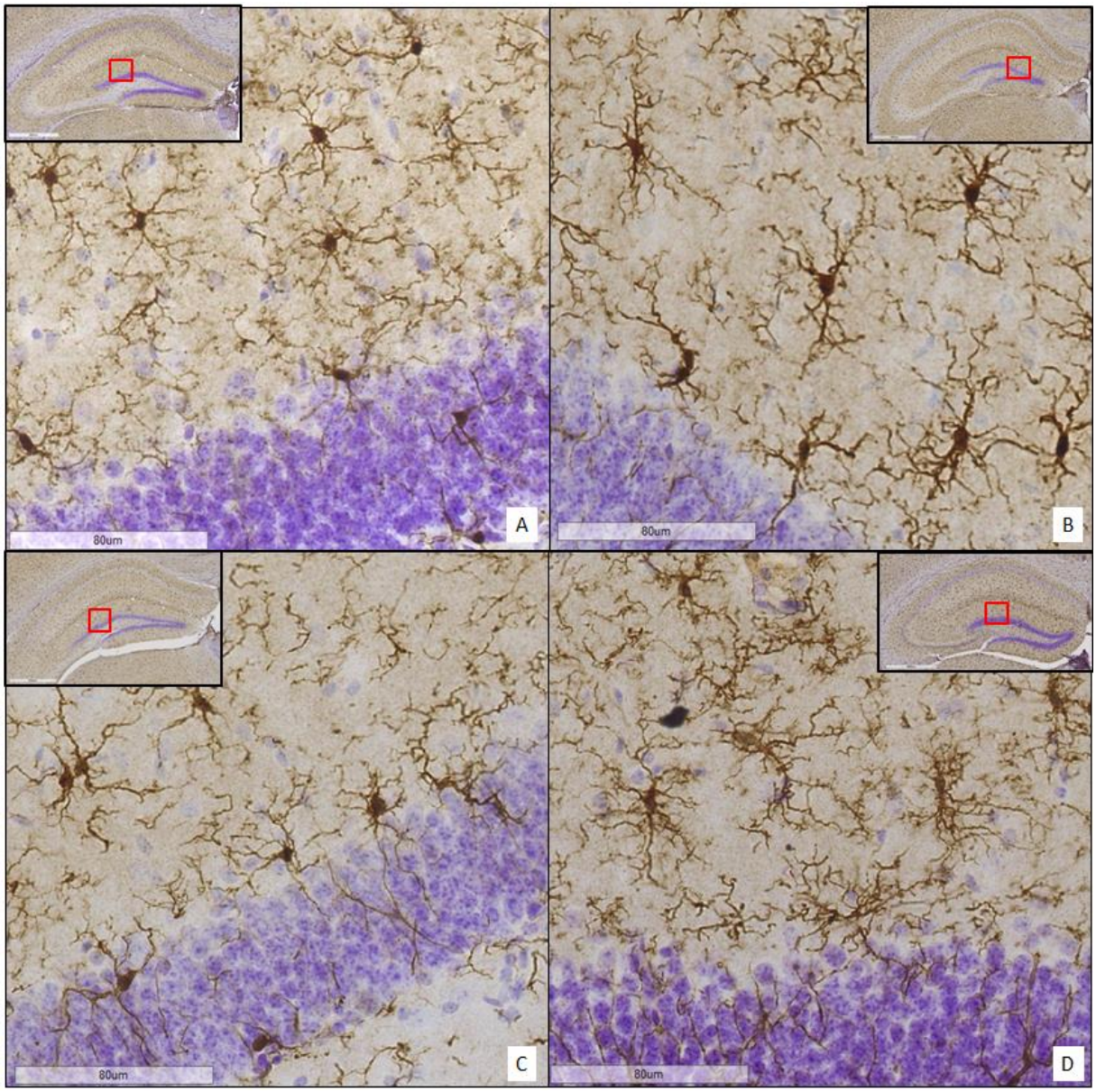


Slika 5.20. **Broj Iba1-pozitivnih stanica nije promijenjen nakon izlaganja IH u talamusu i hipotalamusu.** *Slika prikazuje stereološke izračune brojeva Iba1 pozitivnih stanica u* mm^3 *tkiva u talamusu (A) i hipotalamusu (B). Dijagram rasipanja prikazuje srednje vrijednosti ± SD te svaku pojedinu vrijednost kako bi se prenijela informacija o varijabilnosti među životinjama. Nisu pronađene statistički značajne razlike među skupinama uz* $P < 0,05$. *Usporedba analiziranih površina prikazuje površine u* mm^2 *po skupinama i regijama interesa (C). Nije bilo značajnih razlika u analiziranim površinama. Graf prikazuje srednje vrijednosti ± SD.*



Slika 5.21. **Broj Iba1-pozitivnih stanica nije promijenjen nakon izlaganja IH u dorzalnom i ventralnom hipokampusu.** *Slika prikazuje stereološke izračune brojeva Iba1 pozitivnih stanica u* mm^3 *tkiva u dorzalnom (A) i ventralnom (B) hipokampusu. Dijagram rasipanja prikazuje srednje vrijednosti ± SD i svaku pojedinu vrijednost kako bi se prenijela informacija o varijabilnosti među životinjama. Nisu pronađene statistički značajne razlike među skupinama uz* $P < 0,05$.

Morfološka analiza nije pokazala velike razlike u razgranatosti mikroglijalnih stanica kontrolnih skupina i skupina izloženih IH (Slika 5.22).



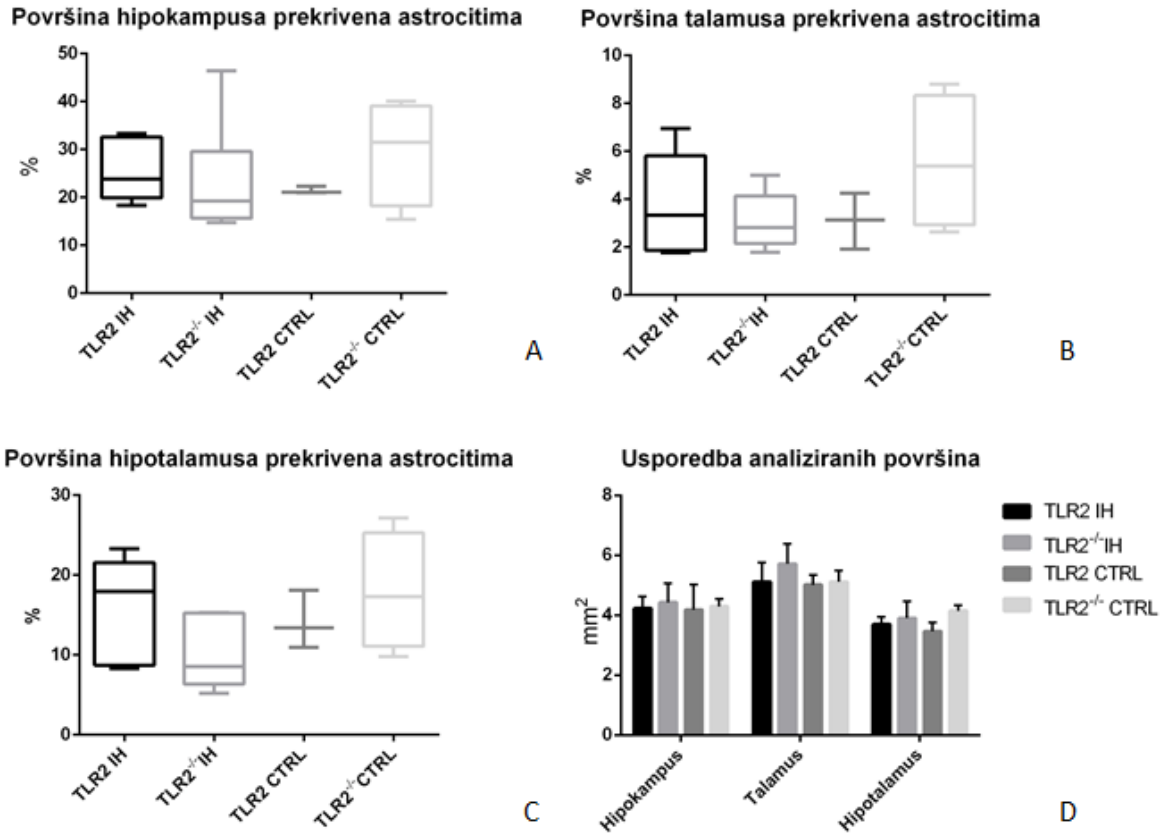
Slika 5.22 **Morfologija Iba1-pozitivne mikroglije nakon izlaganja IH.** *Slika prikazuje reprezentativne primjere histološkog bojanja markerom Iba1 za mikrogliju u dentatnom girusu TLR2 IH (A), TLR2 CTRL (B), TLR2$^{-/-}$ IH (C) i TLR2$^{-/-}$ CTRL (D) skupine.*

5.11 Površina prekrivena astrocitima ne mijenja se izlaganjem intermitentnoj hipoksiji niti ovisi o genu TLR2

Nisu nađene statistički značajne razlike u postotku površine prekrivene GFAP-pozitivnim stanicama u svim četirima analiziranim skupinama pri analizi hipokampusa, talamusa i hipotalamusa (Slika 5.23.). Analizirane površine se nisu značajno razlikovale.

		TLR2 IH	TLR2$^{-/-}$ IH	TLR2 CTRL	TLR2$^{-/-}$ CTRL
GFAP hipokampus	$\bar{x}$	25.79	23.26	21.5	29.61
	± SD	6.538	11.82	0.7609	11.01
GFAP talamus	$\bar{x}$	3.738	3.088	3.1	5.545
	± SD	2.145	1.193	1.165	2.82
GFAP hipotalamus	$\bar{x}$	15.7	10.36	14.15	17.89
	± SD	6.668	4.628	3.641	7.371

Tablica 5.8. **Srednje vrijednosti i standardne devijacije stereološkog brojanja GFAP-pozitivnih stanica u hipokampusu, talamusu i hipotalamusu, vrijednosti iskazuju % ukupne analizirane površine.**



Slika 5.23. **Broj GFAP-pozitivnih stanica nije promijenjen nakon izlaganja IH u hipokampusu, talamusu i hipotalamusu.** *Slika prikazuje postotak ukupne površine*

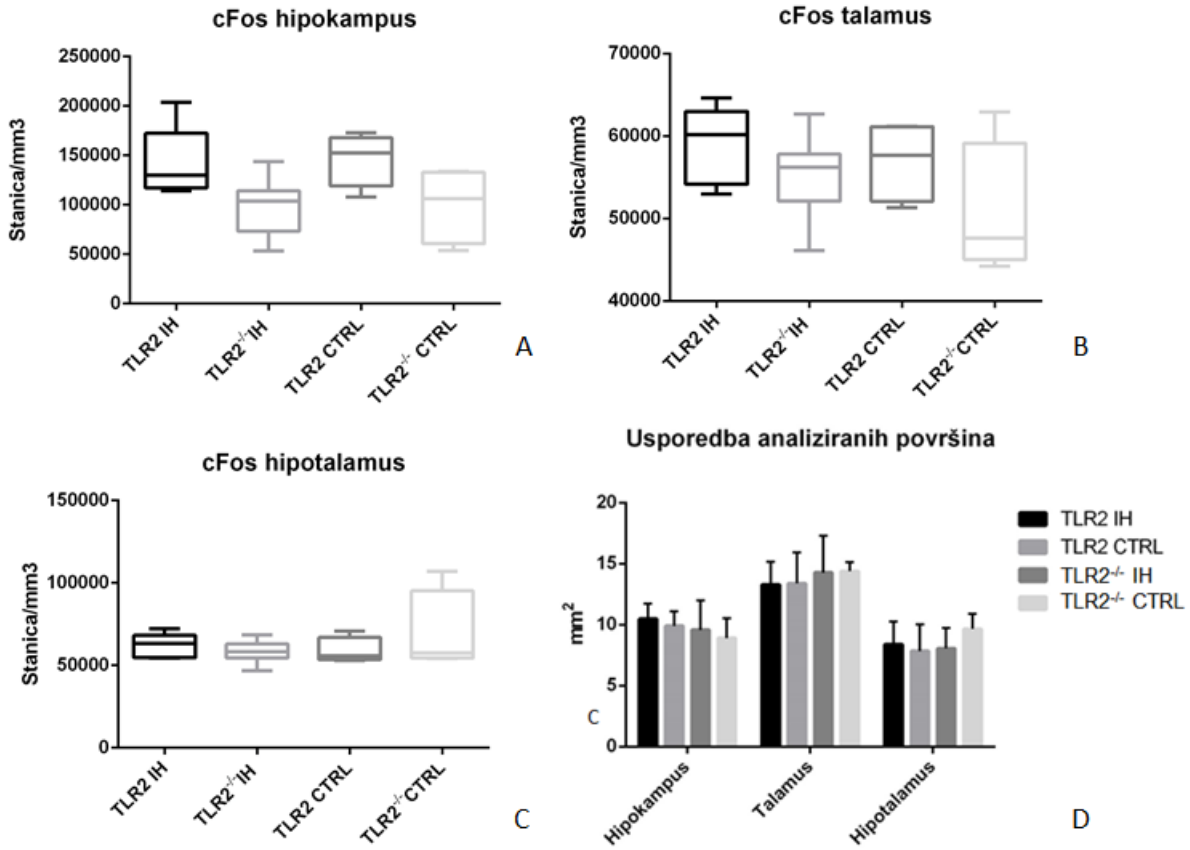
prekrivene GFAP-pozitivnim stanicama nakon analize histoloških slika u programu ImageJ u hipokampusu (A), talamusu (B) i hipotalamusu (C). Vrijednosti su prikazane kao box- plot s obzirom na male brojeve analiziranih uzoraka pri P < 0,05. Nisu pronađene statistički značajne razlike među skupinama. Usporedba analiziranih površina prikazuje površine u mm^2 po skupinama i regijama interesa (D). Nije bilo značajnih razlika u analiziranim površinama. Graf prikazuje srednje vrijednosti ± SD analiziranih površina.

5.12 Broj cFos-pozitivnih stanica ne mijenja se izlaganjem intermitentnoj hipoksiji niti ne ovisi o genu TLR2

Kvantifikacija aktiviranih neurona ovisnih o priljevu kalcija nije utvrdila statistički značajne razlike u brojevima cFos-pozitivnih stanica unutar mm^3 tkiva u hipokampusu, hipotalamusu i talamusu (Tablica 5.9, Slika 5.24.). Unatoč tome primijećen je trend povećanja broja aktiviranih neurona u hipokampusu u TLR2 skupinama u usporedbi sa TLR2$^{-/-}$ skupinama upućujući na potencijalni efekt gena na izražavanje cFos-markera (za TLR2 IH vs. TLR2$^{-/-}$ IH je P = 0,259; za TLR2 CTRL vs. TLR2$^{-/-}$ CTRL je P = 0,377) .

		TLR2 IH	TLR2$^{-/-}$ IH	TLR2 CTRL	TLR2$^{-/-}$ CTRL
cFos hipokampus	$\bar{x}$	141848	98876	146464	99912
	± SD	36116	29381	27392	38871
cFos hipotalamus	$\bar{x}$	61836	58813	58741	69055
	± SD	7404	7004	8033	25471
cFos talamus	$\bar{x}$	58890	54842	56962	50595
	± SD	4700	5284	4936	8371

Tablica 5.9. **Srednje vrijednosti i standardne devijacije stereološkog brojanja cFos-pozitivnih stanica u hipokampusu, hipotalamusu i talamusu, vrijednosti iskazuju stanice/mm^3.**



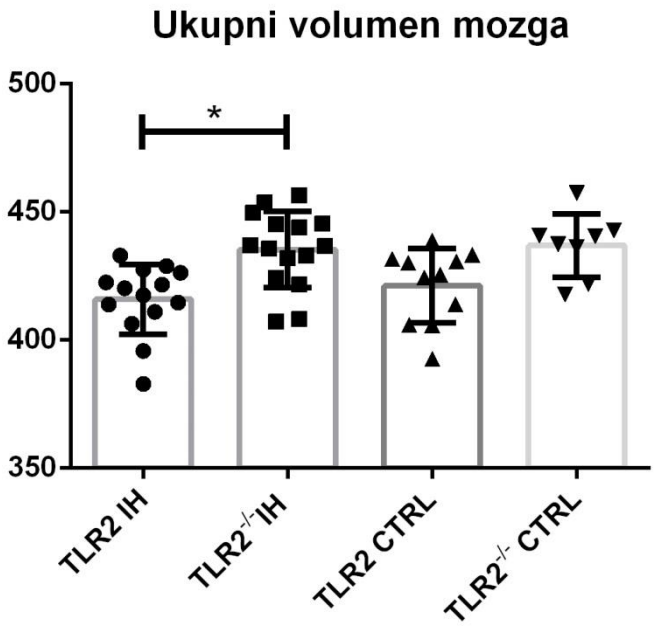
Slika 5.24 **Broj cFos pozitivnih stanica nije promijenjen nakon izlaganja IH u hipokampusu, talamusu i hipotalamusu.** *Slika prikazuje stereološke izračune brojeva pozitivnih cFos-stanica u mm^3 tkiva u hipokampusu (A), talamusu (B) i hipotalamusu (C). Vrijednosti su prikazane kao box-plot s obzirom na male brojeve analiziranih uzoraka. Nisu pronađene statistički značajne razlike među skupinama pri P < 0,05. Usporedba analiziranih površina prikazuje površine u mm^2 po skupinama i regijama interesa (D). Nije bilo značajnih razlika u analiziranim površinama. Graf prikazuje srednje vrijednosti ± SD analiziranih površina.*

5.13 IH uzrokuje strukturne promjene mozga vidljive MRI-jem

MRI rezultati dali su uvid o utjecaju intermitentne hipoksije na strukture mišjeg mozga usporedbom TLR2 CTRL i TLR2 IH skupine. Nadalje, dobivene su informacije o utjecaju manjka gena TLR2 na strukture mozga u miša bez intervencije usporedbom TLR2 CTRL i $TLR2^{-/-}$ CTRL skupine te informacije o ulozi gena TLR2 u promjenama struktura mišjeg mozga usporedbom rezultata iz svih četiriju skupina.

5.13.1 Manjak TLR2 gena utječe na veći ukupni volumen mozga

Nađene su statističke značajne razlike u veličini ukupnog volumena mozga između TLR2 IH skupine i $TLR2^{-/-}$ IH skupine (V_{uk}(TLR2 IH) = 415,9 ±13,64 vs. V_{uk}($TLR2^{-/-}$ IH) = 435,3 ± 14,95; P= 0,002). Zabilježena je tendencija većem volumenu mozga i između TLR2 CTRL i $TLR2^{-/-}$ CTRL skupine (V_{uk}(TLR2 CTRL) = 421,14 ±14,48 vs. V_{uk}($TLR2^{-/-}$ CTRL) = 436,9 ± 12,39; P = 0,079 (Slika 5.25.)



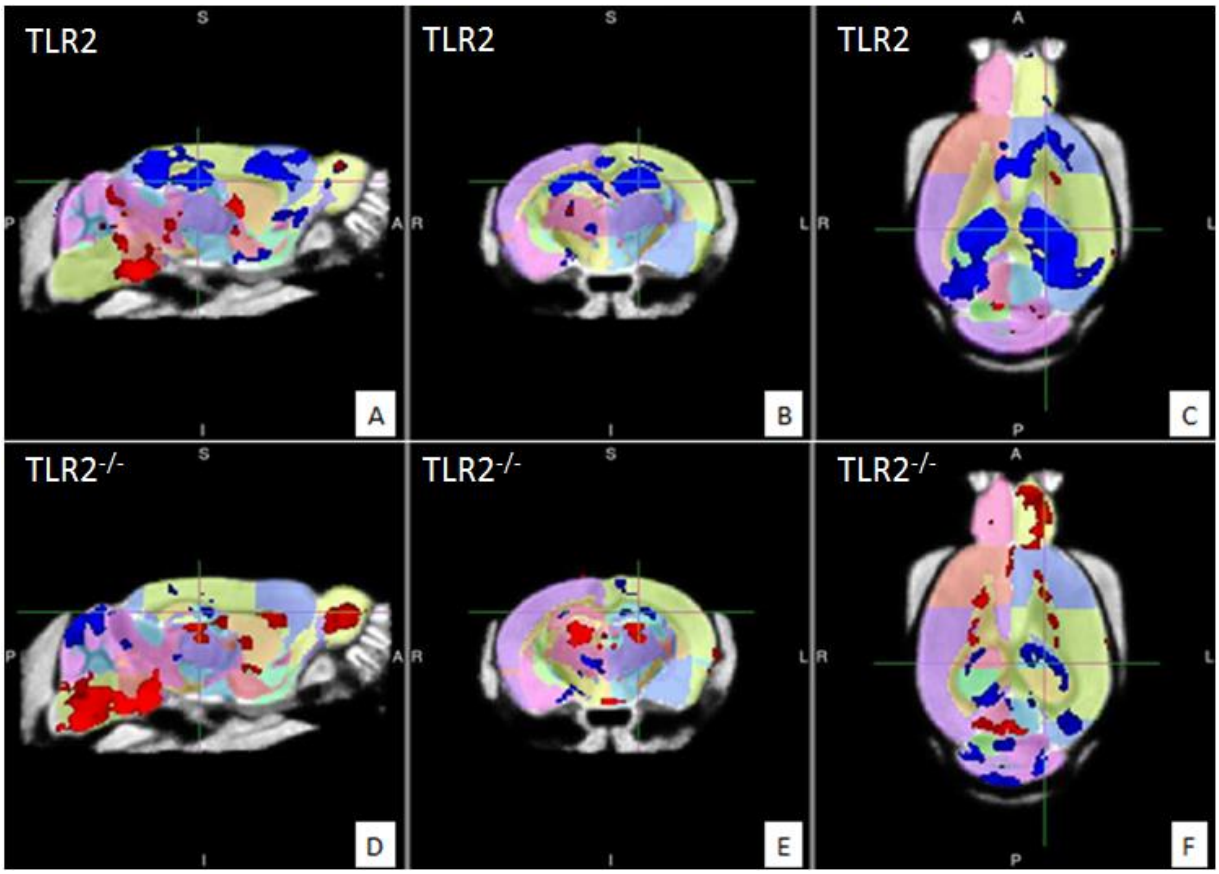
Slika 5.25. **Razlike u ukupnom volumenu mozga u miševa izloženih IH.** *Zabilježen je značajno veći ukupni volumen mozga u skupini miševa bez gena TLR2 izloženih IH, dok se vidi tendencija većem ukupnom volumenu mozga i u miševa $TLR2^{-/-}$ CTRL skupine u usporedbi s TLR2 CTRL skupinom. Dijagram rasipanja prikazuje srednje vrijednosti ± SD i*

svaku pojedinu vrijednost kako bi se prenijela informacija o varijabilnosti među životinjama. Zvjezdica označava statističku značajnost definiranu kao P < 0,05 prema ANOVA-testu sa Sidakovim testom za višestruke usporedbe.

5.13.2 Promjene u volumenu struktura mozga nakon intermitentne hipoksije izraženije su u miševa s genom TLR2

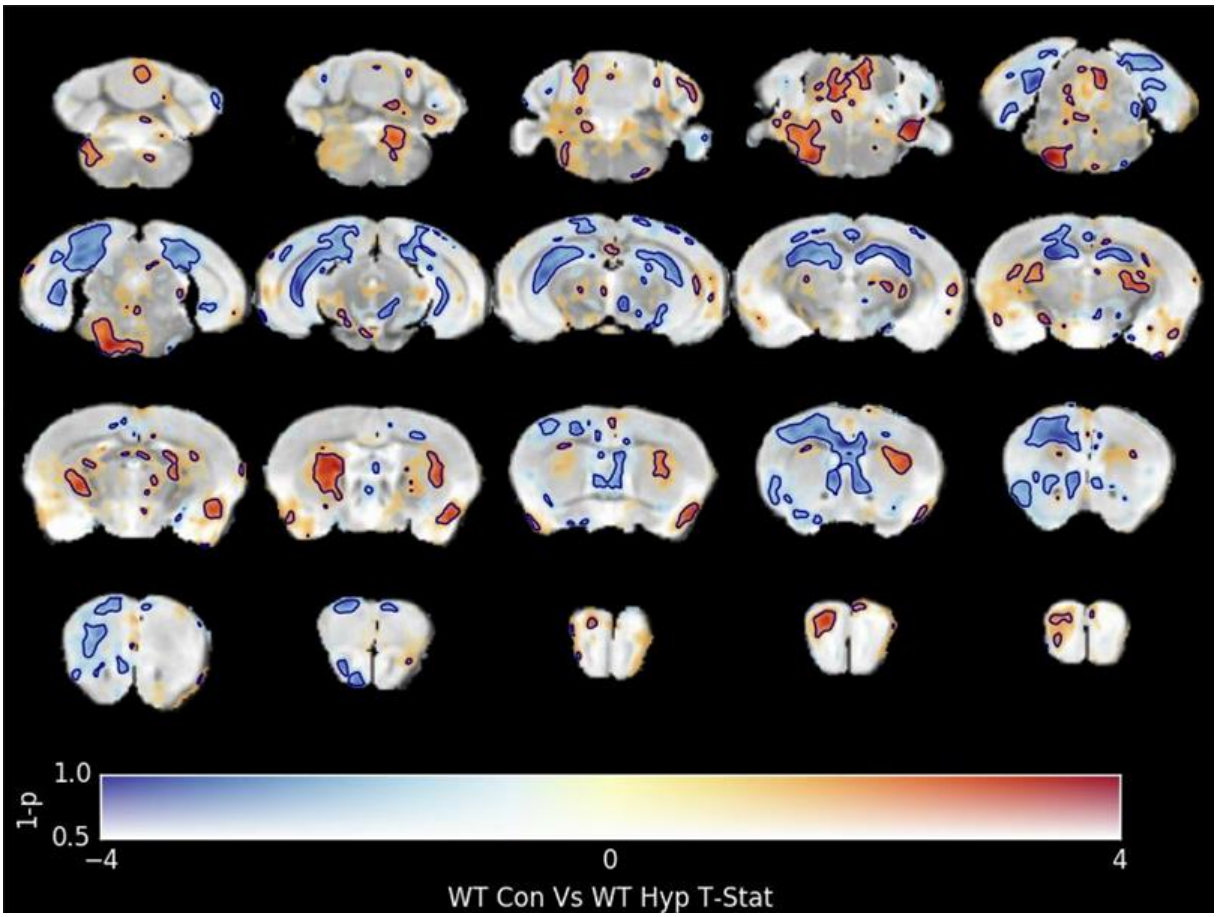
Rezultati su s obzirom na registraciju u standardni prostor dali informacije o promjeni svakog pojedinog voksela što je onda interpretirano kao povećanje ili smanjenje volumena određene strukture s obzirom na koregistraciju s atlasom Brain Allen.

TLR2 IH skupina je imala veće razlike u volumenima struktura velikog mozga u usporedbi sa svojom kontrolom od $TLR2^{-/-}$ IH skupine u usporedbi sa svojom. Za razliku od toga, veće promjene primijećene su u malom mozgu i u strukturama moždanog debla u skupini $TLR2^{-/-}$ IH u usporedbi s $TLR2^{-/-}$ CTRL (Slika 5.26.).

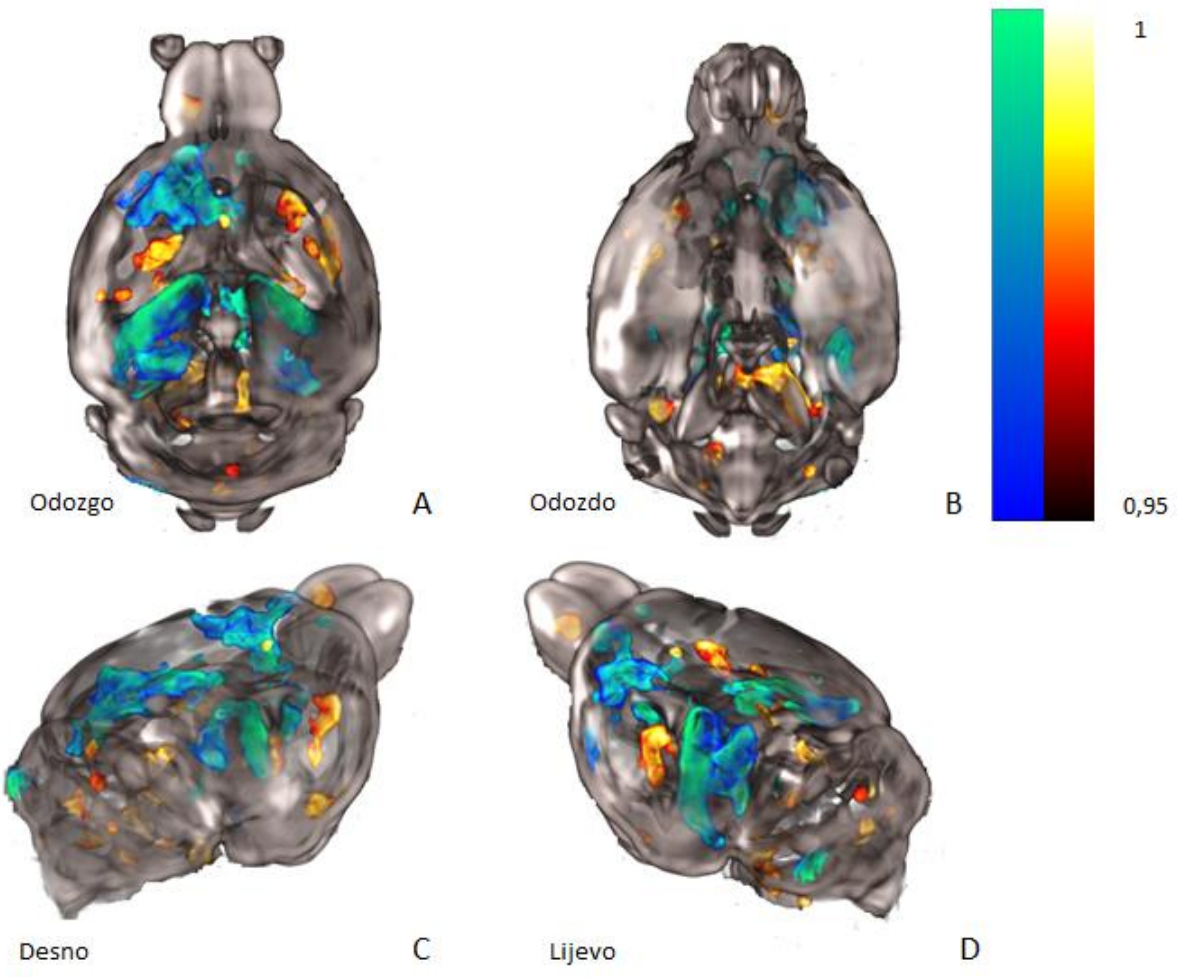


Slika 5.26. **Promjene volumena struktura mozga nakon IH dobivene MR oslikavanjem**. *Slika prikazuje statistički značajne razlike volumena mozga između TLR2 IH i TLR2 CTRL u sagitalnom (A), koronalnom (B) i aksijalnom (C) presjeku te između TLR $^{-/-}$ IH i TLR2$^{-/-}$ CTRL također u sagitalnom (D), koronalnom (E) i aksijalnom (F) presjeku na istim koordinatama. Plava boja označava značajno povećanje, dok crvena označava značajno smanjenje volumena u skupini izloženoj IH dobiveno usporedbom skupina voksel po voksel t-tatistikom. Šareno su označene koregistrirane anatomske regije preuzete iz atlasa Brain Allen. Statistička značajnost definirana je kao P < 0,05.*

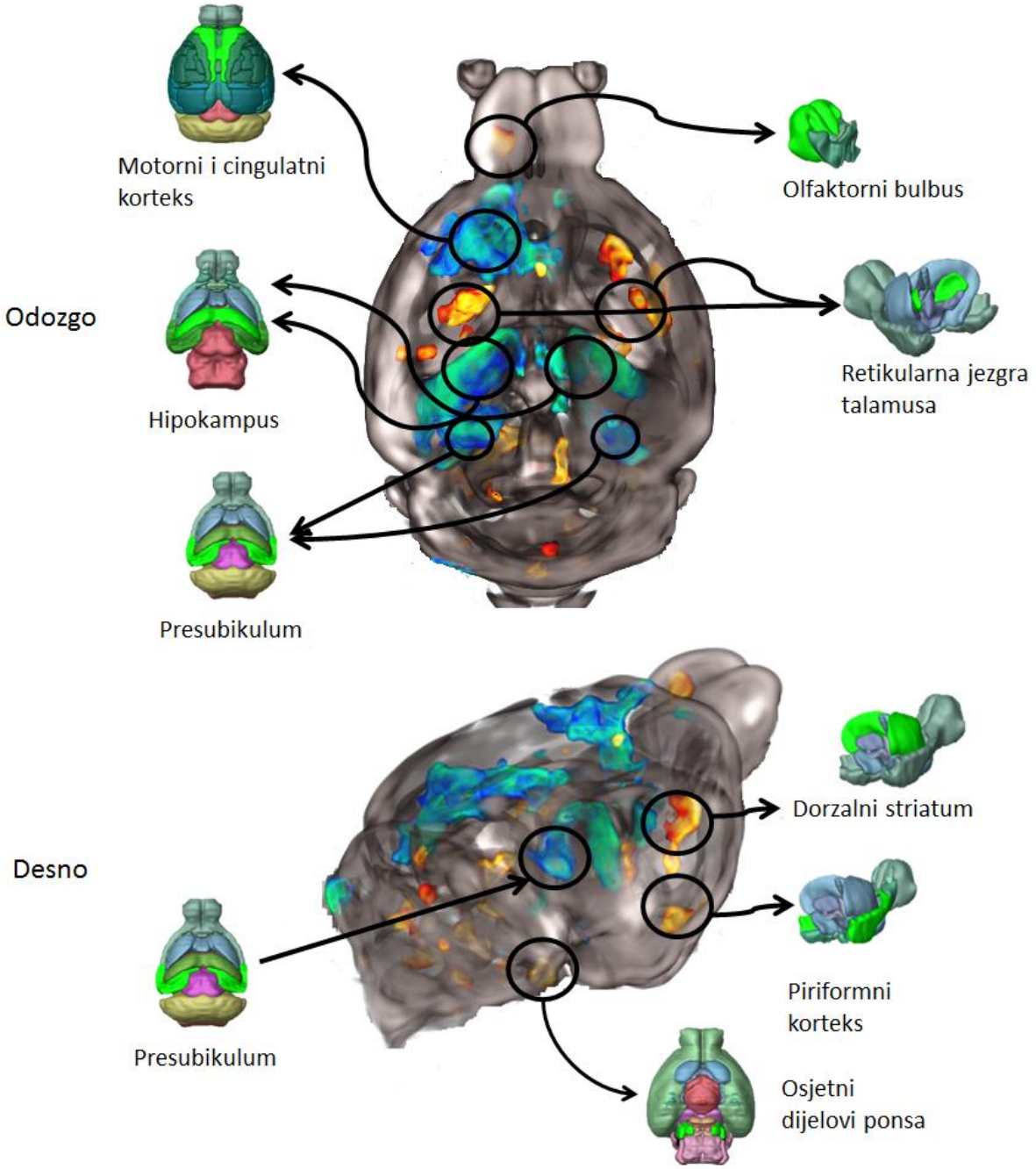
Najznačajnija razlika usporedbe volumena voksel po voksel između TLR2 IH i TLR2 CTRL skupine zamijećena je u bilateralnom povećanju hipokampusa u skupini TLR2 IH (Slika 5.27, 5.28, 5.29.). Povećanje se može zamijetiti i u lijevom cingulatnom i motoričkom korteksu, te u strijatumu i presubikulumu (Slika 5.27, 5.28, 5.29.). Smanjenje volumena izraženo je obostrano u retikularnoj jezgri talamusa, u lijevom olfaktornom bulbusu, desnom dorzalnom strijatumu i piriformnom korteksu (Slika 5.27, 5.28, 5.29.)



Slika 5.27 **Volumne promjene mozga nakon izlaganja IH.** *Slika prikazuje razlike usporedbe volumena mozga snimljenih ex vivo MRI-jem između TLR2 CTRL skupine te TLR2 IH skupine u pseudoboji superponirane na masku mozga generiranu iz snimanja svih uzoraka. Plave nijanse označavaju povećanje dok crvene nijanse označavaju smanjenje volumena. Prikazani su rezultati dvostruke statističke analize; razlika boje označava veličinu učinka dok intenzitet boje označava rezultate t-statistike u vrijednosti 1-p od 0,5 do 1. Statistički značajne razlike zaokružene su tamnim rubom. Statistička značajnost definirana je kao P < 0,05.*

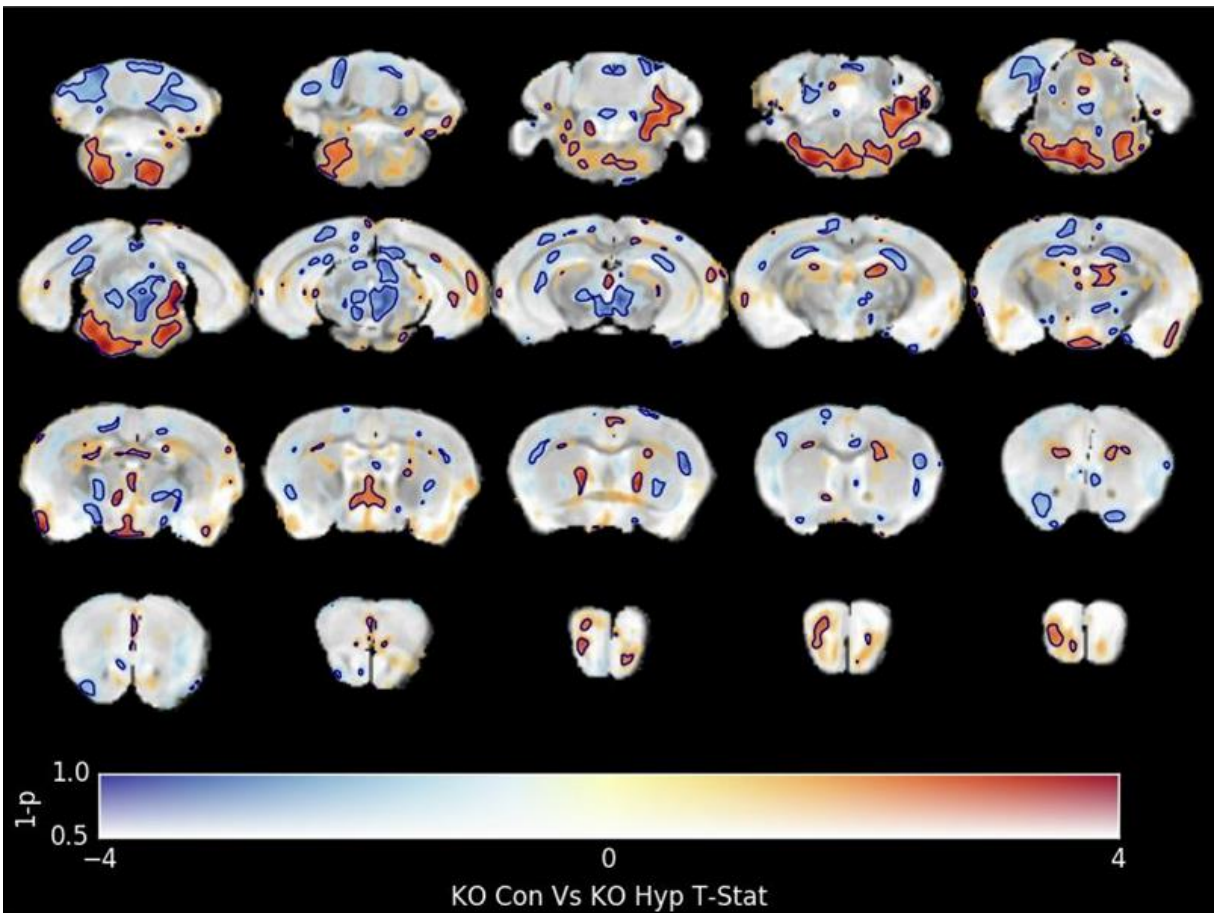


Slika 5.28. **Volumne promjene mozga nakon izlaganja IH.** *Slike prikazuju statistički značajne razlike usporedbe volumena mozga snimljenih ex vivo MRI-jem TLR2 CTRL skupine i TLR2 IH skupine u pseudoboji superponirane na masku mozga generiranu iz snimanja svih uzoraka. Plave nijanse označavaju povećanje dok žute nijanse označavaju smanjenje volumena. Prikazane su 3D rekonstrukcije rezultata iz 4 perspektive: odozgo (A), odozdo (B) te s desne (C) i s lijeve strane (D). Mjerilo boje označava vrijednosti 1-p od 0,95 do 1.*



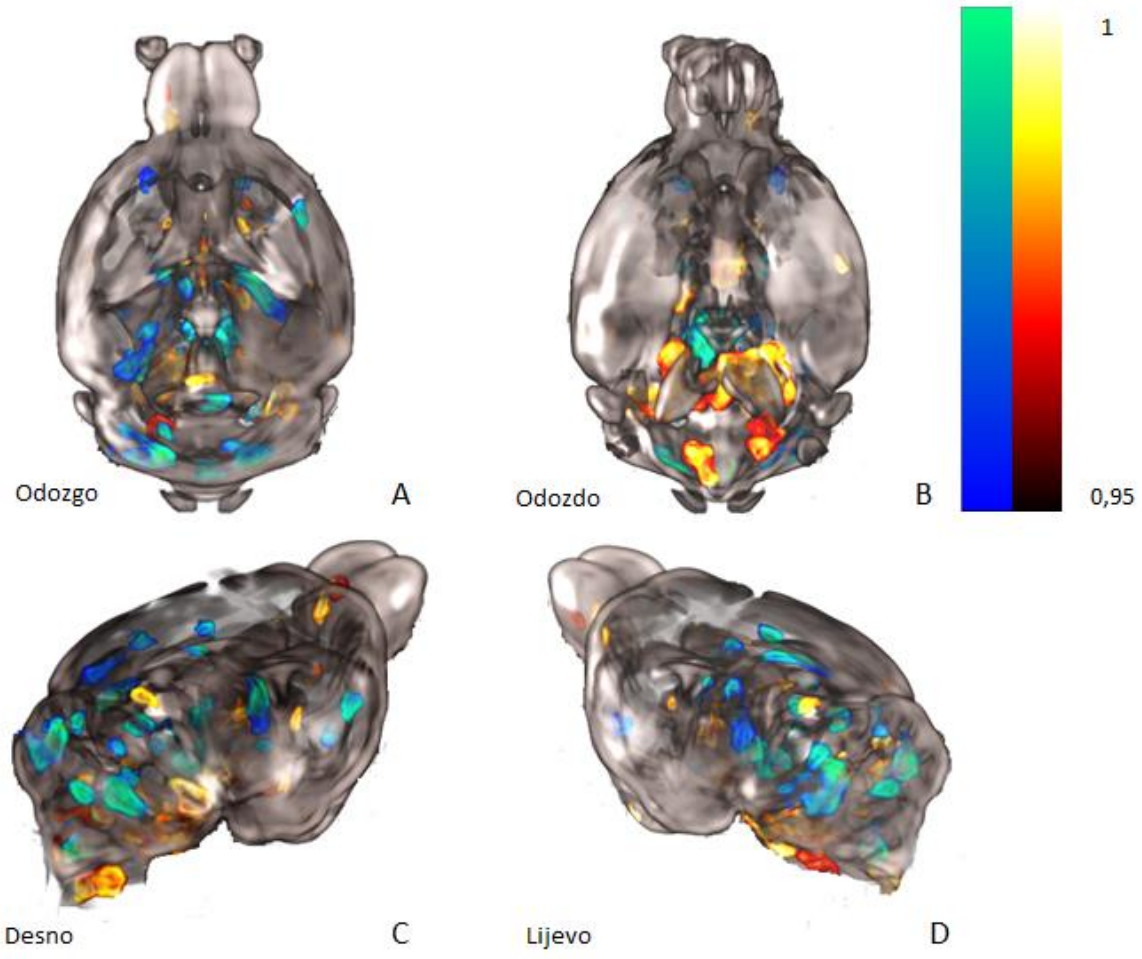
Slika 5.29. **Detalji strukturnih promjena nakon IH u skupina s funkcionalnim genom TLR2.** *Slika prikazuje najznačajnije razlike između TLR2 CTRL te TLR2 IH s anatomskim maketama regija interesa preuzetim iz Allen Mouse Brain Explorer. Najznačajnija povećanja vidljiva su obostrano u hipokampusu i presubikulumu te lijevo u motornom i cingulatnom korteksu, dok su najveća smanjenja vidljiva u retikularnim jezgrama talamusa, desnom dorzalnom strijatumu, desnom piriformnom korteksu i osjetnim dijelovima ponsa.*

Strukturne razlike TLR2$^{-/-}$ CTRL i TLR2$^{-/-}$ IH skupine pokazuju sličnosti s TLR2 CTRL i TLR2 IH skupinom, no difuznije su i općenito manje opsežne (Slika 5.26.). Hipokampus je i ovdje povećan nakon izlaganja IH, no izraženije s desne strane i u puno manjoj mjeri od razlike među skupinama s funkcionalnim genom TLR2 (Slika 5.30, 5.31, 5.32). Primjećuje se slično smanjenje u lijevom olfaktornom bulbusu, kao i povećanja u strijatumu i presubikulumu. Najdramatičnije su razlike u mezencefalonu, ponsu i malom mozgu koje su puno izraženije nego u razlici TLR2 skupina (Slika 5.31.B). Smanjenje struktura produljene moždine i ponsa u kontrastu je s povećanjima u malom mozgu (Slika 5.30, 5.31, 5.32).

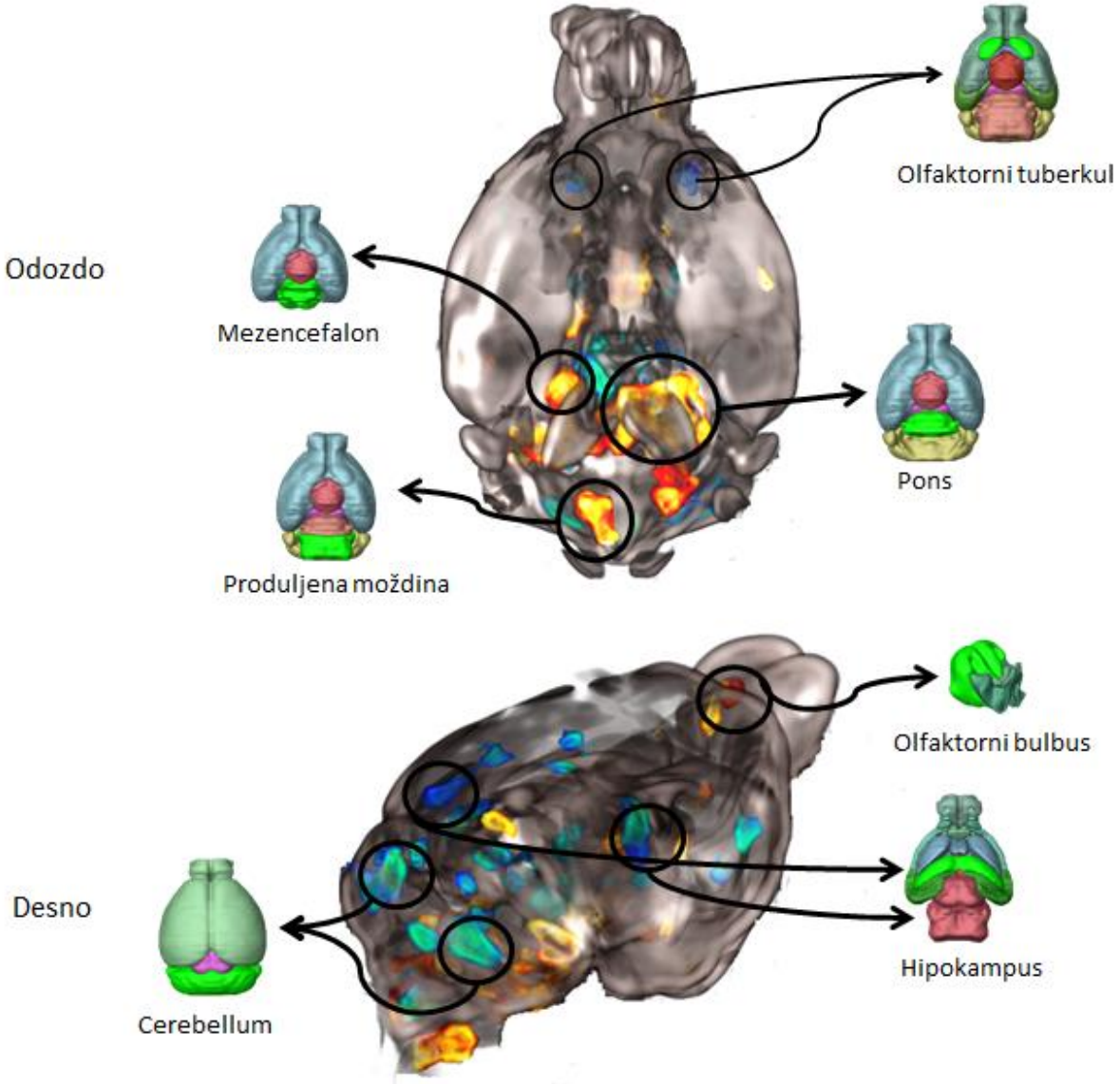


Slika 5.30. **Volumne promjene mozga nakon izlaganja IH.** *Slika prikazuje razlike usporedbe volumena mozga snimljenih ex vivo MRI-jem između TLR2$^{-/-}$ CTRL skupine i TLR2$^{-/-}$ IH skupine u pseudoboji superponirane na masku mozga generiranu iz snimanja svih uzoraka. Plave nijanse označavaju povećanje dok crvene nijanse označavaju smanjenje volumena. Prikazani su rezultati dvostruke statističke analize; razlika boje označava veličinu učinka dok intenzitet boje označava rezultate t-statistike u vrijednosti 1-p od 0,5 do 1.*

Statistički značajne razlike zaokružene su tamnim rubom. Statistička značajnost definirana je kao P < 0,05.



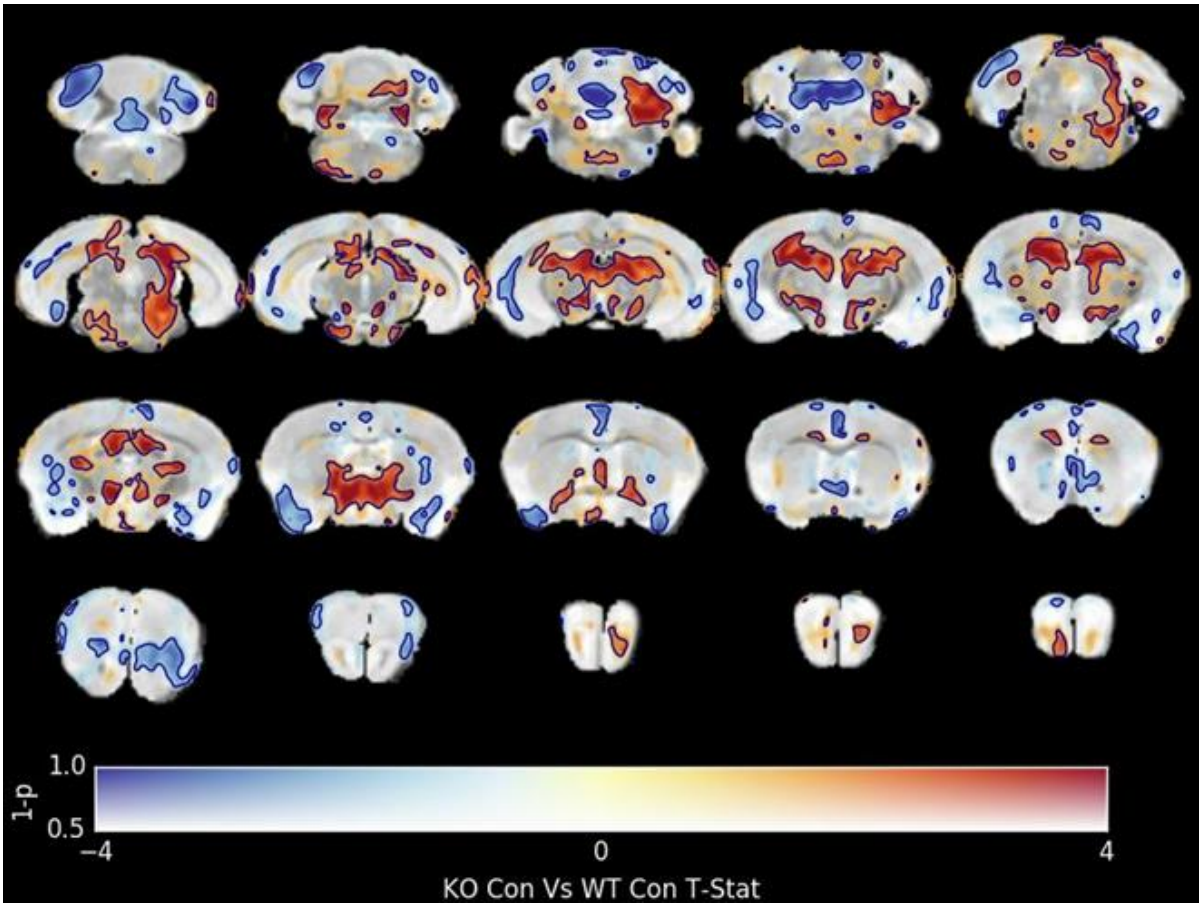
Slika 5.31. **Volumne promjene mozga nakon izlaganja IH u skupina bez gena TLR2.** *Slike prikazuju statistički značajne razlike usporedbe volumena mozga snimljenih ex vivo MRI-jem TLR2$^{-/-}$ CTRL skupine te TLR2$^{-/-}$ IH skupine u pseudoboji superponirane na masku mozga generiranu iz snimanja svih uzoraka. Plave nijanse označavaju povećanje dok žute nijanse označavaju smanjenje volumena. Prikazane su 3D rekonstrukcije rezultata iz četiri perspektive: odozgo (A), odozdo (B) te s desne (C) i s lijeve strane (D). Mjerilo boje označava vrijednosti 1-p od 0,95 do 1.*



Slika 5.32. **Detalji strukturnih promjena nakon IH u skupina bez gena TLR2.** *Slika prikazuje najznačajnije razlike između TLR2 CTRL te TLR2 IH s anatomskim maketama regija interesa preuzetim iz Allen Mouse Brain Explorer. Najznačajnija povećanja vidljiva su u ponsu, malom mozgu i produljenoj moždini. S desne strane vidljivo je blago povećanje hipokampusa.*

5.13.3 Mozgovi TLR2 CTRL i TLR2$^{-/-}$ CTRL skupine strukturno se razlikuju

Kako bi se utvrdio utjecaj gena TLR2 na strukture odraslog mozga miša bez intervencije uspoređene su TLR2 CTRL i TLR2$^{-/-}$ CTRL skupine. Statističkom obradom utvrđeno je značajno obostrano manji volumen hipokampusa i talamusa u miševa s funkcionalnim genom TLR2 te manji lijevi olfaktorni bulbus (Slika 5.33). Vidljive su i promjene u ponsu te malom mozgu.



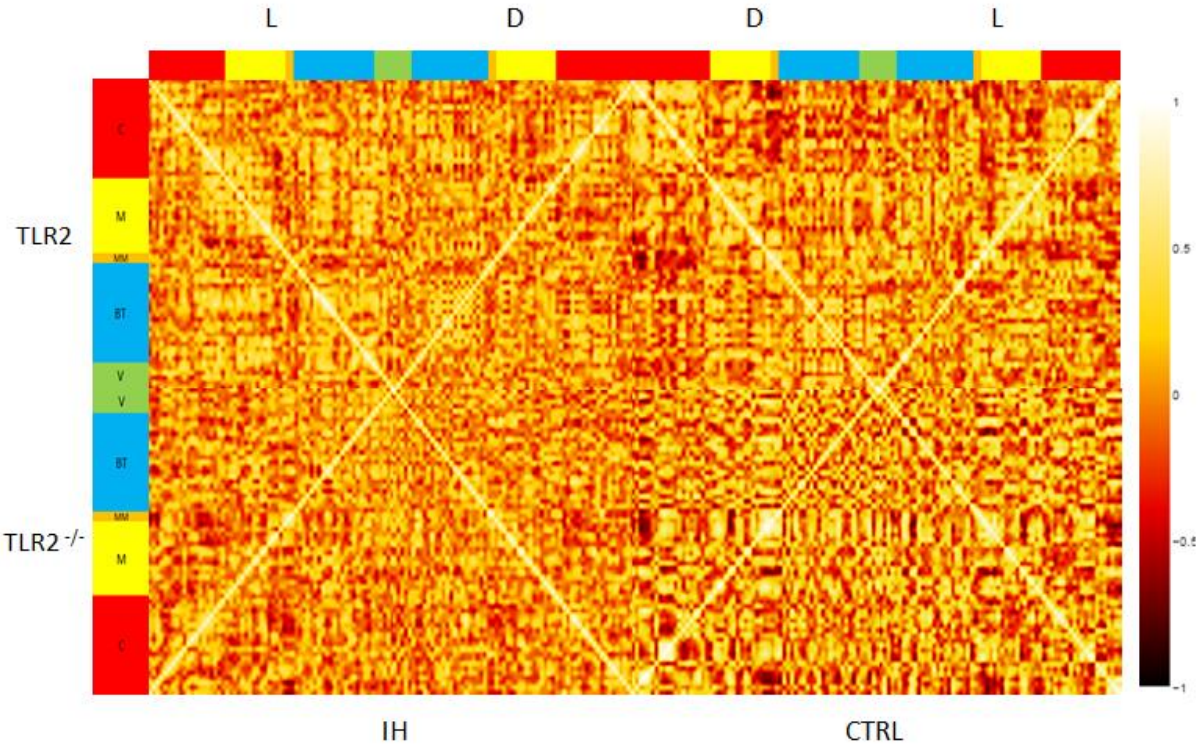
Slika 5.33. **Volumne promjene mozga među kontrolnim skupinama s genom i bez gena TLR2.** *Slika prikazuje razlike usporedbe volumena mozga snimljenih ex vivo MRI-jem TLR2$^{-/-}$ CTRL skupine te TLR2 CTRL skupine u pseudoboji superponirane na masku mozga generiranu iz snimanja svih uzoraka. Plave nijanse označavaju povećanje dok crvene nijanse označavaju smanjenje volumena. Prikazani su rezultati dvostruke statističke analize; razlika boje označava veličinu učinka dok intenzitet boje označava rezultate t-statistike u vrijednosti*

1-p od 0,5 do 1. Statistički značajne razlike zaokružene su tamnim rubom. Statistička značajnost definirana je kao P < 0,05.

5.14 Korelacijski odnosi MRI regija interesa

Za prikaz međusobnog odnosa volumena 114 struktura dobivenih koregistracijom MR oslikavanja s atlasom, za svaku skupinu napravljena je matrica Pearsonovih korelacijskih koeficijenata (Slika 5.34). Popis struktura naveden je u tablici 5.10.

Pri analizi korelacijske matrice može se primijetiti kako je simetričnost lijeve i desne polutke izraženija u kontrolnim skupinama miševa u usporedbi sa skupinama izloženima IH, a najviše izražena u TLR2$^{-/-}$ CTRL skupini (Slika 5.34, donji desni kvadrant). U kontrolnim skupinama vide se „jezgre“ visokih korelacija među strukturama velikog mozga, te u TLR2$^{-/-}$ CTRL skupini visoke korelacije malog mozga i produljene moždine s ostalim strukturama. Izražen je gubitak ovih korelacija u TLR2$^{-/-}$ IH skupini (Slika 5.34, donji lijevi kvadrant). TLR2 IH skupina lijevo pokazuje visoke korelacije struktura bijele tvari međusobno i struktura produljene moždine međusobno i sa strukturama bijele tvari. Ove su „jezgre“ korelacija manje izražene u desnoj polutci (Slika 5.34. gornji lijevi kvadrant). Opisane korelacije TLR2 IH skupine su naglašenije u usporedbi s TLR2 CTRL skupinom. U TLR2 IH skupini nedostaju jake negativne korelacije struktura malog mozga sa strukturama velikog mozga izražene u TLR2 CTRL skupini.



Slika 5.34 **Korelacijske mape volumena svih obrađenih regija.** *Uz lijevi i gornji rub slike boje označavaju regije mozga. Sve strukture su grupirane u: veliki mozak (C, crveno), produljenu moždinu (M, žuto), mali mozak (MM, narančasto), bijelu tvar (BT, plavo) te ventrikularni sustav (V, zeleno). L označava strukture na lijevoj strani mozga dok D označava desne strukture. Gornja polovica slike označava TLR2 skupine, donja TLR2$^{-/-}$ skupine. Rezultati skupina IH smještene su na lijevoj polovici slike dok su CTRL skupine smještene desno. Mjerilo na desnoj strani slike označava pripadajući boju Pearsonovog korelacijskog koeficijenta, gdje bijela boja označava korelacijski koeficijent 1 a tamno crvena korelacijski koeficijent -1.*

Frontalni korteks	C
Entorinalni korteks	
Parijeto-temporalni korteks	
Okcipitalni korteks	
Lateralni olfaktorni tuberkul	
Olfaktorni bulbus	
Olfaktorni tuberkul	
Dentatni girus	
Hipokampus	

Glava hipokampusa	
Stratum granulosum hipokampusa	
Pre-para-subikulum	
Amigdala	
Striatum	
Fundus striatuma	
N. accumbens	
Bazalni telencefalon	
Lateralni septum	
Medijalni septum	
Globus pallidus	
Jezgre terminalne strije	M
Talamus	
Talamus uži	
Hipotalamus	
Mamilarno tijelo	
Mezencefalon	
Ventralna tegmentalna dekusacija	
Periakvaduktalna grisea	
Interpedunkularna jezgra	
Colliculus superior	
Colliculus inferior	
Pons	
Jezgre ponsa	
Gornja oliva	
Donja oliva	
Produljena moždina	
Kuneatna jezgra	
Arbor vitae malog mozga	MM
Korteks malog mozga	
Prednji dio prednje komisure	BT
Stražnji dio prednje komisure	
Medijalni lemnisk	
Optički trakt	
Jezgra n. facialisa	
Stražnja komisura	
Fimbrija	
Forniks	
Stria terminalis	

Fasciculus retroflexus	
Habenula	
Mamilarni put	
Striaa medularis	
Corpus callosum	
Kortiko-spinalni put	
Capsula interna	
Gornji moždani pedunkul	
Srednji moždani pedunkul	
Donji moždani pedunkul	
Pedunkuli malog mozga	
Lateralni ventrikul	
Subependimalna zona	
Treći ventrikul	V
Četvrti ventrikul	
Moždani akvedukt	

Tablica 5.10 **Popis svih analiziranih struktura te njihova grupacija u veće regije interesa.** *Sve strukture grupirane su u veliki mozak, produljenu moždinu, mali mozak, bijelu tvar te ventrikularni sustav. Grupiranje je provedeno prema atlasu Allen Brain (http://www.brain-map.org).*

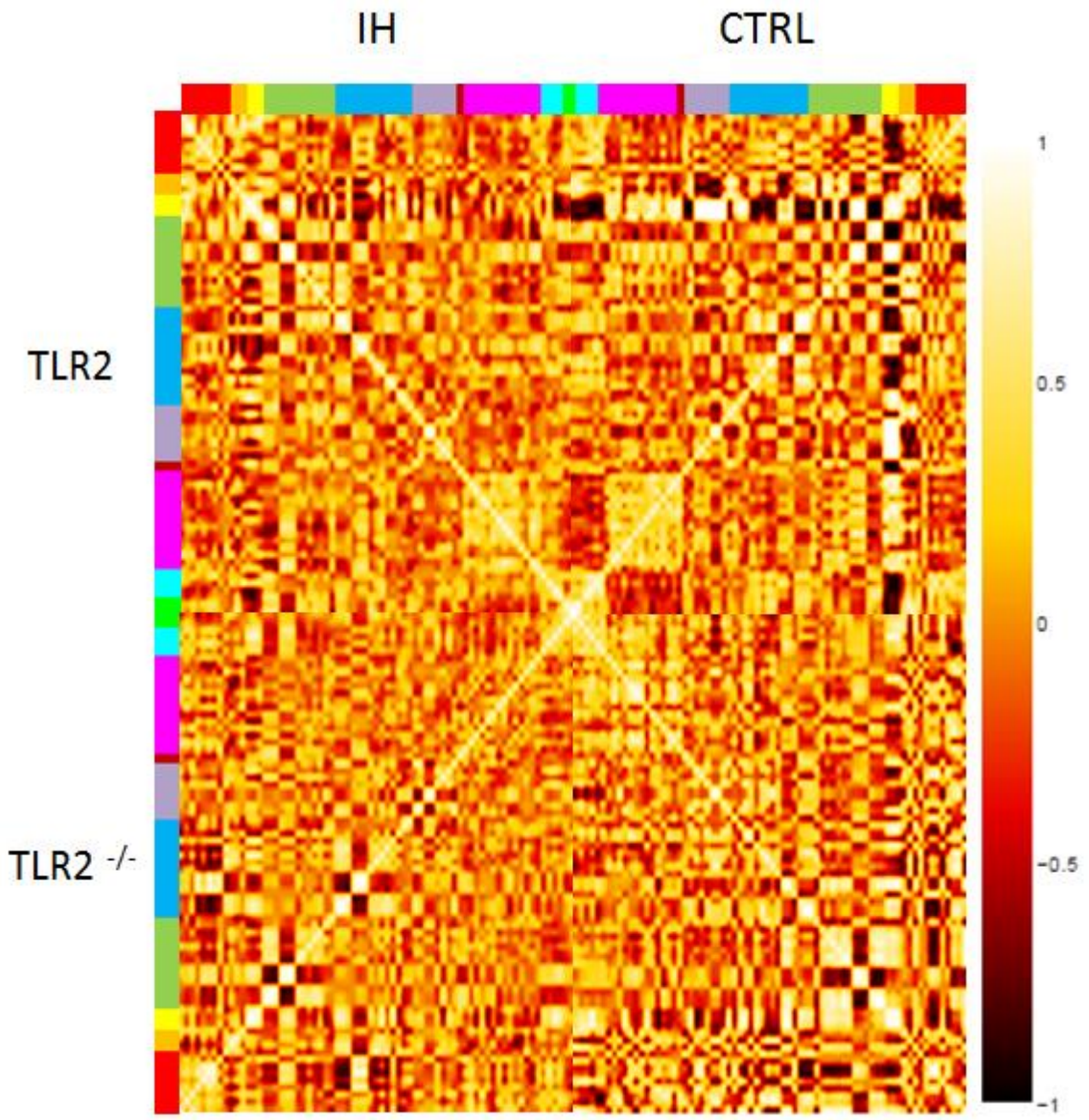
5.15 Korelacijski odnosi histoloških nalaza, ponašanja i MRI regija analiziranih histologijom

S obzirom na to da su iste životinje bile uključene u sve pokuse, bilo je moguće izračunati Pearsonov korelacijski koeficijent između rezultata bojenja Iba1, GFAP i cFos te rezultata ponašajnih testova i MRI regija analiziranih histologijom tj. hipokampusa, hipotalamusa i talamusa.

Korelacijske mape pokazale su simetriju korelacija u dvije kontrolne skupine (Slika 5.35, desna polovica slike) i gubitak tih korelacija u skupinama izloženim IH. Gubitak sličnosti s kontrolnim skupinama bio je izraženiji u TLR2$^{-/-}$ IH skupini (Slika 5.35., donji lijevi kvadrant slike 5.35.), slično kao i kod korelacijskih mapa za volumene svih struktura mozga. Sve četiri skupine imaju jasan korelacijski fokus vezan za različite varijable ponašanja u otvorenom polju, koje su, prema očekivanjima, pokazale značajnu međuovisnost. Neočekivani nalaz iz ovog prikaza bio je velik broj varijabli koje su korelirale s rezultatima histološkog bojenja

GFAP (Slika 5.35., žuta oznaka na rubovima). Ove korelacije bile su manje značajne u TLR2$^{-/-}$ IH skupini (Slika 5.35., donji lijevi kvadrant).

Možda najzanimljiviji nalaz bile su međusobne korelacije MRI parametara hipokampusa (girus dentatus, cijeli hipokampus, glava hipokampusa, stratum granulosum te pre-para subikulum). Volumeni ovih regija interesa su u međusobnoj jasnoj pozitivnoj korelaciji u kontrolnim skupinama (Slika 5.35., varijable hipokampusa u boji ciklame), koje su očuvane i nakon izlaganja IH u skupini TLR2 IH, no u skupini TLR2$^{-/-}$ IH gotovo potpuno izostaju.



Slika 5.35. **Korelacijska mapa rezultata histoloških i bihevioralnih rezultata te izabranih volumena MRI regija interesa.** *S lijeve i gornje strane slike boje označavaju grupirane varijable: Iba1 (crveno), cFos (narančasto), GFAP (žuto), otvoreno polje (zeleno), Y-labirint*

(plavo), test visenja na repu (ljubičasto), ukupni volumen mozga (tamno crveno), hipokampus (ciklama), talamus (svjetlo plavo), hipotalamus (svjetlo zeleno). Gornja polovica slike označava TLR2 skupine, donja TLR2 $^{-/-}$ skupine. Rezultati skupina IH smještene su na lijevoj polovici slike dok su CTRL skupine smještene desno. Mjerilo na desnoj strani slike označava pripadajuću boju Pearsonovog korelacijskog koeficijenta, gdje bijela boja označava korelacijski koeficijent 1 a tamno crvena korelacijski koeficijent -1.

6 RASPRAVA

6.1 Novi sustav za induciranje intermitentne hipoksije ima značajne prednosti nad postojećim sustavima

U sklopu ove disertacije osmišljen je, razvijen i verificiran novi sustav za induciranje IH. Potreba za razvojem ovog sustava razvila se iz potrebe za protokolom IH koji je brz, precizan i jednostavan za korištenje. Korištenjem dvaju senzora za kisik, jednog u pretkomori za miješanje plinova i jednog u životinjskoj komori većeg volumena postignuta je potrebna preciznost regulacije razine kisika. Senzor u pretkomori nadzire odstupanje mješavine plinova od zadane vrijednosti kisika te u skladu s time prilagođuje otvorenost ventila. Senzor smješten u komori za životinje daje informaciju kada je postignuta zadana vrijednost kisika te gasi sustav upuha plinova.

Ova modifikacija sustava, uz povećanje preciznosti, smanjila je kašnjenje regulacije na razini senzor- kontroler-ventil u odnosu na realno stanje plinova u komori te ubrzala finu regulaciju postotka kisika u komori.

Kako bi se postigla jednostavnost korištenja, osmislili smo sustav koji je kompatibilan s već postojećom linijom kaveza za životinje. Na taj način moguće je životinje smještene u standardnom kavezu izložiti IH bez potrebe za premještanjema u nepoznati eksperimentalni okoliš, jednostavnom promjenom adaptiranog poklopca s kontrolerom.

Većina nekomercijalnih sustava za induciranje IH koristi kutiju od plexiglasa s ograničenom kontrolom miješanja plinova i slabo verificiranim mehanizmom brtvljenja. Otvaranje i zatvaranje ventila za plinove obično je zadato unaprijed i slijedi zadane vremenske obrasce, bez povratne informacije o stanju plinova u komori (161-164). Većina takvih sustava je velikog volumena kako bi mogli primiti veći broj eksperimentalnih životinja. U velikom volumenu brzina izmjene plinova postaje upitna, prije svega ako uzmemo primjer protokola IH korištenog u ovoj disertaciji koji se oslanja na periode hipoksije u duljini od 90 s. Drugi primjeri sustava su mali prostori koji mogu primiti samo jednu životinju po komori (165) što komplicira protokol te otvara mogućnosti nepredviđenih utjecaja (*engl. confounding factors*) jer ne izlaže sve životinje istim uvjetima u isto vrijeme.

Druga mogućnost u korištenju modela IH su komercijalni sustavi za kontroliranje postotka kisika koji se mogu spojiti na vlastiti zatvoreni prostor, poput inkubatora ili zabrtvljenih ormara u koje se mogu postaviti jedan ili više kaveza životinja (134). Ovi sustavi su vrlo praktični jer mogu biti potpuno automatizirani tijekom protokola od nekoliko tjedana. Unatoč tome, ovi sustavi imaju velike volumene te usprkos vrlo velikom protoku plinova mogu sporo dostizati zadane postotke kisika. Primjerice, u radu Xu i suradnika korištena je komora dimenzija 76 cm x 50 cm x 50 cm (V= 190000 cm^3 ; 190 litara) dok je naša komora veličine 39 cm x 20 cm x 16 cm (V= 12480 cm^3; 12,4 litre) (95). Protok plinova u komore bio je otprilike jednak, 60 l/min u eksperimentu Xu et al i 50 l/min u našem eksperimentu.

Osim ova 2 osnovna načina IH opisani su i drugi modeli, primjerice u radu Li i suradnika se životinjski kavez postavljao u veću komoru za hipoksiju te u periodu bez hipoksije mehanički iz nje pomicao van (166). Originalno rješenje predloženo od Tagaita i suradnika bila je komora u obliku zvona koja je plutala na vodi te omogućavala praćenje EEG i EMG signala slobodno kretajuće životinje koja je bila izložena IH (135). Prema našem mišljenju, ovi sustavi ne omogućavaju izlaganje većeg broja životinja istovremeno kontroliranim i reproducibilnom uvjetima hipoksije te ne osiguravaju dovoljnu jednostavnost primjene dostupnu prosječnom istraživaču.

6.2 Intermitentna hipoksija uzrokuje povećanu ekspresiju TLR2 vidljivu bioluminiscentnim oslikavanjem

U skladu s trećim specifičnim ciljem našeg istraživanja, u našim pokusima pokazali smo povećanje signala TLR2 tijekom akutne i kronične faze izlaganja IH. Longitudinalno *in vivo* snimanje signala TLR2 bilo je moguće praćenjem svjetlosnog signala koji je posljedica transgenične modifikacije eksperimentalnog modela gdje je promotor gena TLR2 povezan s genom za luciferazu. Razina ekspresije luciferaze, enzima koji modificira svoj supstrat luciferin oslobađajući fotone svjetlosti, tako nam je omogućila zaključke o ekspresiji TLR2.

Razvitak modela za bioluminiscentno *in vivo* longitudinalno praćenje ekspresije TLR2 prethodno je opisan i validiran (147). Pokazano je kako su miševi imali funkcionalni gen TLR2 uz transgeničnu modifikaciju te je opisan temeljni signal ekspresije TLR2 prisutan u olfaktornom bulbusu (OB), zamijećen i u našem istraživanju. Ekspresija TLR2 u OB-a

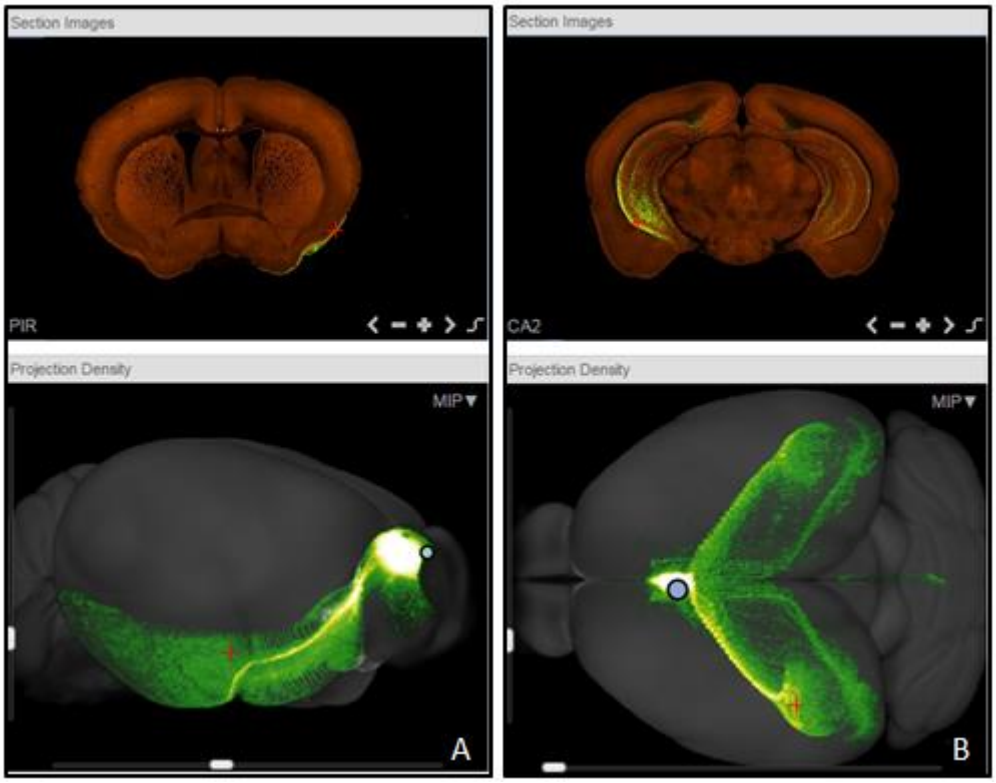
interpretirana je pretpostavkom da su to stanice mikroglije u „budnom“ ili potaknutom (*engl. primed*) stanju zbog bliskog anatomskog odnosa OB-a i nosne šupljine i s time povezanim vanjskim podražajima. U našem *ex vivo* snimanju mozga *in toto* pokazali smo da ovaj signal ne dolazi isključivo iz olfaktornih bulbusa, već čak u većoj mjeri iz prednjeg olfaktornog trakta i prednje olfaktorne jezgre. Time smo se udaljili od osnovnog objašnjenja „kontinuirane upale“ u OB te možemo samo spekulirati je li ekspresija TLR2 u ovim strukturama konstitutivna ili se radi o odgovoru na vanjske utjecaje.

U modelu moždanog udara korištenjem istog transgeničnog soja miševa C57BL/6-*Tyr*$^{c-2J}$(Cg)-*Tg(Tlr2-luc/gfp) 275S Kri* pokazano je značajno povišenje signala TLR2 s vrhuncem 48h nakon upale. Zanimljiv pronalazak bio je da pojačanje signala OB prethodi povišenju signala na mjestu ishemične lezije. Ovaj nalaz bitan je za interpretaciju naših rezultata gdje je također pokazano pojačanje signala TLR2 u OB nakon 1 dana IH pri *ex vivo* snimanju *in toto* i na rezovima mozga, te također u 3D rekonstrukciji signala nakon 2 dana IH protokola. Kvantifikacija *in vivo* longitudinalnih BLI snimanja uzela je u obzir OB signal zajedno sa signalom iz ostalih dijelova mozga.

Dok je nakon moždanog udara maksimum izražaja TLR2 zabilježen 48 sati nakon lezije te potom pada, ali ni nakon 3 mjeseca praćenja ne vraća se na razinu prije moždanog udara, naš signal povisio se već nakon 8 sati IH te je ostao trajno povišen tijekom sva 3 tjedna praćenja. Ovakva dinamika signala upućuje na izravni utjecaj IH na ekspresiju TLR2 koji ne povisuje intenzitet s kronicitetom poremećaja. U budućim istraživanjima trebalo bi razlučiti utjecaj akutne indukcije TLR2 te posljedice kronično povišenog TLR2 na njegove nizvodne efektore.

Ex vivo bioluminiscentnim snimanjem na rezovima mozga zabilježena je ekspresija TLR2 u OB, olfaktornom traktu, olfaktornom tuberkulu, medijalnim septalnim jezgrama i regijama korteksa i moždanog debla. Ovaj signal najintenzivniji je sprijeda i odaje dojam kao da se širi posteriorno. Prema izdanju Allen Mouse Brain Connectivity Atlas (atlasu mišjih moždanih puteva, http://connectivity.brain-map.org), iz OB se šire monosinaptički putovi sve do entorinalnog korteksa, dok se iz medijalnih septalnih jezgara šire monosinaptički putovi u sve dijelove hipokampusa (Slika 6.1.). S obzirom na ove nalaze, moguće je da aktivacija TLR2 u ovim regijama potiče promjene u korteksu i hipokampusu zabilježene MRI-jem nakon 21 dan IH.

Budući da je *ex vivo* snimanje napravljeno samo nakon 1 dana IH, moguće je da je kasniji signal promijenjene lokalizacije, iako su 2D BLI snimke vrlo konzistentne tijekom svih vremenskih točaka.



Slika 6.1 **Prikaz monosinaptičkih puteva iz regija koje izražavaju TLR2 1 dan nakon IH.** Slika prikazuje monosinaptičke putove iz OB (A) vizualizirane injekcijom markera rAAV (*engl. tracer*), gdje je vidljivo kako putovi sežu posteriorno do entorinalnog korteksa. Prikaz monosinaptičkih putova medijalne septalne jezgre (B), gdje je vidljivo kako anterogradni putovi sežu u sve dijelove hipokampusa bilateralno. Za svaku sliku gore je reprezentativni presjek a dolje 3D prikaz s pogledom zdesna (A) i odozgo (B). Slika je preuzeta od: Allen Institute @ 2016 Allen Institute for Brain Science. Allen mouse brain connectivity atlas. Experiment 146859480 – MOB Dostupno na: http://connectivity.brain-map.org/

6.3 Signal TLR2 zabilježen bioluminiscentnim oslikavanjem jest mjera aktivnosti mikroglije

Kako bismo validirali nalaze bioluminiscentnog oslikavanja, imunofluorescentnim bojanjem pokazali smo kolokalizaciju Iba1-markera mikroglije i luciferaze, te zaključili kako signal

vizualiziran BLI oslikavanjem primarno potječe iz stanica mikroglije. Ovaj nalaz opisan je i razrađen u prethodnoj literaturi gdje je pokazana lokalizacija markera aktivacije mikroglije (CD68, Mac- 2) s ekspresijom TLR2 na mikrogliji u istim regijama mozga (93), kao i nalaz da $TLR2^{-/-}$ životinje imaju slabiji kapacitet za proliferaciju mikroglije, smanjene razine monocitnog kemotaktičkog proteina i smanjene brojeve $CD45^{high}/CD11b^{+}$ pozitivnih stanica (93).

Ovaj nalaz pokazao je kako je povišena ekspresija TLR2 nakon izlaganja intermitentnoj hipoksiji nađena bioluminiscentnim oslikavanjem posljedica povišene ekspresije TLR2 pretežno u stanicama mikroglije što je poduprlo naše rezultate bioluminiscentnog oslikavanja koji govore u prilog početnoj hipotezi rada da IH uzrokuje upalni odgovor mozga kojeg je moguće pratiti *in vivo* metodama oslikavanja.

6.4 $TLR2^{-/-}$ miševi teže kompenziraju pad tjelesne težine nakon izlaganja IH

Praćenjem težina svih četiriju skupina miševa, pokazano je kako IH utječe na značajan pad tjelesne težine u obje skupine izložene IH. Ovaj pad u TLR2 IH skupini kompenzirao se 20. dana IH, dok miševi $TLR2^{-/-}$ IH skupine nisu uspjeli kompenzirati pad tjelesne težine tijekom cijelog protokola IH. $TLR2^{-/-}$ CTRL skupina također je sporije dobivala na težini u usporedbi s TLR2 CTRL skupinom.

U radu Aubrecht et al. opisano je kako IH uzrokuje pad tjelesne težine u WT miševa tijekom 4 tjedna izlaganja, no ne nalaze kompenzaciju težine (167). Također, u prethodnim pokusima opisano je da $TLR2^{-/-}$ miševi manje gube na tjelesnoj težini nakon moždanog udara od WT miševa, što je donekle u kontradikciji s našim nalazima (143). Unatoč tome, ova razlika u nalazima može biti posljedica različitog modela bolesti gdje je moždani udar invazivna i akutna intervencija, dok je naš model ishemije suptilniji ali kroničnog tijeka. Naši rezultati i druga literatura upućuju na mogućnost kako uz IH, utjecaj na regulaciju tjelesne težine životinje igra i sam gen TLR2.

6.5 IH uzrokuje apoptozu neurona hipokampusa

Naši rezultati pokazali su kako izlaganje IH uzrokuje povišeni broj apoptotičnih neurona u regiji CA1 i CA3 hipokampusa kao i u dentantnom girusu. Ovaj nalaz je u djelomičnom slaganju s literaturom. Više radova pokazalo je veću osjetljivost regije CA1 u usporedbi s regijom CA3 na hipoksiju pri kvantifikaciji apoptoza na rezovima nakon IH (134) te pri elektrofiziološkom snimanju hipokampalnih rezova (168). Gozal i suradnici kvantificirali su apoptotične neurone u regiji CA1 i CA3 štakorskog hipokampusa 0., 1., 2., 7., i 14. dan izlaganja IH i pokazali kako broj apoptoza raste do 15 puta u regiji CA1nakon prvog i drugog dana izlaganja te počinje padati s daljnjim vremenskim točkama, gdje 14. dana razlike prestaju biti značajne kvantifikacijom SS-DNA, dok je kvantifikacijom pri bojanju TUNEL-om još uvijek nađena blago značajna razlika (134). U našem pokusu vremenska točka za analizu apoptoza uzeta je nakon 21 dana izlaganja IH, kako bi, prema etičkom standardu maksimalne iskoristivosti pokusnih životinja, životinje korištene za praćenje bioluminiscentnog signala bile snimljene u svim vremenskim točkama prije žrtvovanja. Ovo može objasniti razlike u razmjerima zabilježenih apoptoza između opisane literature i našeg pokusa gdje je nađeno povećanje u broju apoptoza od 20-30%. S obzirom na to da su opisani rezultati dobiveni na štakorima moguće je i da je zapažena razlika dijelom posljedica različitih vrsta pokusnih životinja. Konačno, s obzirom na to da je za model IH u našem pokusu korištena nova komora sa svojim prednostima brzine i preciznosti dok je u opisanom pokusu korištena komora velikog volumena, postoji mogućnost da su opisane razlike između naših rezultata i literature posljedica preciznije regulacije hipoksije.

Geni koji sudjeluju u reakciji na hipoksiju pročavani su u regiji CA1 i CA3 hipokampusa, gdje je pokazano da nakon 6h IH dolazi do pojačane ekspresije 32 gena u regiji CA1 i samo 7 u regiji CA3. Pokazano je kako je ozljeda nakon hipoksije posljedica povećanog metabolizma, indukcije proteina potaknutih stresom, apoptoze te uništavanja strukturnih proteina i integriteta stanica (138).

Nedavno je pokazano kako IH uzrokuje apoptozu neurona u dentatnom girusu miševa (169) i štakora (170). Brojanjem Map2 i Nestin-pozitivnih neurona u DG izračunato je da je otprilike 20- 30% neurona podleglo apoptozi, što je u skladu s našim rezultatima.

S obzirom na veću količinu literature na temu osjetljivosti regije CA1 mozga naš nalaz kako je broj apoptoza veći u girusu dentatusu od regije CA1 i CA3 može se smatrati neočekivanim.

Moguće objašnjenje za ovaj nalaz je korištenje Niss-bojanja za procjenu hiperkromazije, kondenzacije i fragmentacije kromatina te smanjenja some neurona, kao i interpretacija ovih nalaza za kvantifikaciju apoptotičnih neurona. U starijoj literaturi opisuje se kako u stanicama CA3 i DG može doći do ovih promjena bez konačnog ulaska u apoptozu, tj. ove stanice su otpornije na hipoksiju upravo zbog toga što su ove promjene reverzibilne (171). S obzirom na ovaj nalaz, moguće je da je naša kvantifikacija precijenila broj apoptoza u regiji CA3 i DG. Ovakvo metodološko ograničenje upućuje na potrebu da se reakcije neurona nakon izlaganja IH korištenjem novog modela u budućnosti okarakteriziraju i drugim markerima apoptoze.

6.6 Sposobnost za prostorno pamćenje u Y-labirintu nije narušeno nakon izlaganja IH

U našem istraživanju našli smo da IH ne utječe na postotak spontane alternacije kao mjere prostornog pamćenja u Y-labirintu. Ovaj nalaz je u skladu s opisanom literaturom u miševa izloženima IH (167, 172) te u miševa bez gena TLR2 koji nisu bili izloženi IH (173). Unatoč našoj hipotezi da će nedostatak TLR2 pogoršati kognitivne rezultate testova, ovaj nalaz se nije potvrdio. Mogući razlozi za izostanak nalaza promijenjene sposobnosti za prostorno pamćenje unatoč izrazitim strukturnim promjenama hipokampusa u TLR2 IH skupini mogli bi biti nedovoljna osjetljivost testa, nedovoljno kontrolirani uvjeti izvedbe testa ili premalen broj korištenih životinja po grupi. Rezultati korelacijskih matrica impliciraju da postoji povezanost individualnih rezultata Y-labirinta i drugih histoloških i MRI rezultata te su potrebna daljnja funcionalna istraživanja kako bi se utvrdila posljedica strukturnih promjena nađenih na MRI-ju.

6.7 Ponašanje životinja u otvorenom polju nije promijenjeno nakon izlaganja IH

Ponašanjem u otvorenom polju prikupljen je niz parametara o općoj pokretnosti životinja i o obrascima kretanja kroz otvoreno polje koji daju informacije o stupnju anksioznosti i hiperekscitacije. Neki autori navode da se praćenjem obrazaca kretanja životinja kroz vrijeme može dobiti informacija o privikavanju životinja na dani prostor, te time zaključivati o brzini pamćenja. Najčešće istraživanje brzine privikavanja nalaže da se isti ponašajni pokus ponavlja više puta na istim životinjama. S obzirom na to da smo prema smjernicama o testiranju na

životinjama koristili iste životinje za više pokusa, u ovom slučaju za bihevioralne, MRI te histološke analize, nismo bili u mogućnosti testirati brzinu privikavanja u otvorenom polju.

Nedavno je izašao rad koji je opisao značajne promjene u ponašanju TLR2$^{-/-}$ životinja u usporedbi s WT kontrolama u vidu anksioznog ponašanja, hiperlokomocije te agresivnosti (173) pronađene u testu otvorenog polja i drugim ponašajnim testovima. U našim pokusima nismo primijetili ove značajne razlike između dviju kontrolnih skupina. Izostanak reprodukcije opisanih nalaza iz prethodne literature mogao bi biti posljedica rukovanja životinja tijekom protokola IH, drugačijih uvjeta za ponašajno testiranje u našoj nastambi, moguć premalen broj životinja po skupini ili manje osjetljivi sustav praćenja ponašanja u životinja. Vrijeme prilagodbe na prostor testiranja također je bilo kraće nego što je uobičajeno u literaturi, s obzirom na paralelno izlaganje životinja protokolu IH tijekom drugog dijela dana.

Izostanak razlike u duljini prijeđenog puta u usporedbi TLR2 CTRL i TLR2 IH je u skladu s drugom opisanom literaturom (172). Jedan drugi rad opisuje razlike TLR2/TLR4 *knock-out* miševa i WT miševa u broju prelazaka crte gdje nisu zabilježene značajne razlike (174).

Testom u otvorenom polju nađeno je izrazito povećanje u apsolutnom kutu okretanja u TLR2 IH skupini. Kako bi se dobila ova varijabla, računalnom obradom kretanja miša računa se promjena vektora kretanja miša. Ako miš češće mijenja smjer svoje putanje, tada je i apsolutni kut kretanja veći. Ova promjena u TLR2 IH skupini u usporedbi sa TLR2 IH skupinom te TLR2$^{-/-}$ skupinom mogla bi sugerirati smanjenu sigurnost u biranju željene putanje kretanja. Sama za sebe ova varijabla daje vrlo ograničene informacije o mogućim promjenama izazvanim IH te naznačuje potrebu za daljnjim specijaliziranim ponašajnim testovima kako bi se mogla interpretirati.

6.8 Test visenja na repu upućuje na hiperekscitaciju nakon izlaganja IH

S obzirom na činjenicu da se pacijenti s OSA-om često prezentiraju depresivnim simptomima, očekivali smo da će miševi izloženi IH biti manje aktivni od svojih kontrola u testu visenja na repu, koji služi kao model za testiranje depresivnog ponašanja u pokusnih životinja. Nasuprot tome, pronađeno je kako IH utječe na smanjenje vremena mirovanja u testu visenja na repu, te kako su miševi nakon IH motiviraniji za pokušaj izvlačenja iz nelagodnog položaja. Ova razlika dosegla je statističku značajnost u TLR2 IH skupini u usporedbi s TLR2 CTRL, dok se

vrlo jasno vidjela ista tendencija unutar $TLR2^{-/-}$ skupina, no ova razlika nije dosegla statističku značajnost.

Opisana razlika slaže se s našim ostalim nalazima blago povećane pokretljivosti u sekundarnim parametrima u testu Y-labirinta te otvorenom polju.

Kada se proučavao utjecaj IH na prostorno snalaženje, nađeno je da IH ne uzrokuje deficit u motivaciji pri testu označene platforme (*engl. cued platform task*) u kojem životinje plivaju do skrivene platforme koja je označena vanjskim znakom (81).

$TLR2^{-/-}$ životinje nisu pokazale razlike u mobilnosti u testu forsiranog plivanja koji se smatra analognim testu visenja na repu (173).

Rad koji je istraživao utjecaj visoke bazalne razine kortikosterona našao je da ona utječe na povišenu pokretnost u testu visenja na repu, iako je, sukladno našoj hipotezi, bilo očekivano da će duži period nalik stresu uzrokovati manje kretanja i simptome slične depresiji (175). Ovaj nalaz mogao bi ukazivati da je nađeni blagi utjecaj IH na pokretnost u testovima ponašanja u našim pokusima rezultat samog kroničnog stresnog događanja, a ne specifičnog utjecaja hipoksije na određeni aspekt kognicije.

Pokazano je kako $TLR7^{-/-}$ životinje kroz manjak stvaranja IFNα i IFNβ razvijaju depresivne simptome (176). Slični zaključak može se donijeti na temelju nalaza da životinje bez fraktalkinskog receptora ($CX^3CR1^{-/-}$), glavnog receptora koji posreduje aktivaciju mikroglije nakon injekcije LPS-a, razvijaju produljene depresivne simptome, očite u produljenju vremena mirovanja na testu visenja na repu (177).

Kompetentni imunosni sustav bitan je za regulaciju „zdravih“ kompenzatornih mehanizama nošenja s psihičkim stresom i nelagodom. Također, ovi radovi ilustriraju kompleksnost signalnih putova obitelji receptora nalik na Toll te način na koji utjecaj na upalne parametre može neposredno utjecati i na ponašanje. Prema opisanim istraživanjima bilo bi očekivano da $TLR2^{-/-}$ miševi budu skloniji depresiji nakon podražaja koji u normalnim uvjetima aktiviraju mikrogliju. Uzevši u obzir druge nalaze opisane u ovom poglavlju, postaje jasno da je odnos imunosti, stresa i depresije kompleksan.

Razlog zbog kojega rezultati naših pokusa nisu u skladu s očekivanjima može biti to što se 1) utjecaj IH na mozak manifestira ne samo upalnim putovima već i drugim još slabije poznatim

mehanizmima, čemu govori u prilog činjenica da se hiperekscitacija manifestirala u obje skupine izložene IH, nevezano za gen TLR2, 2) utjecaj nedostatka gena TLR2 utječe ne samo na inflamatorni aspekt funkcioniranja organizma već i na drugim razvojnim i fiziološkim razinama, ili 3) rezultati povećane pokretnosti na testu visenja na repu ne mogu interpretirati samo kao suprotnost onoga što bismo očekivali kao depresivno ponašanje u miševa već i kao simptom šireg funkcionalnog poremećaja koji nije bio dovoljno istražen ponašajnim testovima korištenim u ovom istraživanju. Dodatna funkcionalna istraživanja bila bi potrebna kako bi se odredio puni značaj rezultata nađenih na testu visenja na repu.

6.9 Broj stanica mikroglije nije promijenjen u regijama interesa nakon izlaganja IH

Nalaz da broj Iba1-pozitivnih stanica nije bio povećan u talamusu, hipotalamusu, regijama hipokampusa CA1, CA3 i DG te u ventralnom i dorzalnom hipokampusu u cijelosti, nije bio u skladu s očekivanim rezultatima, s obzirom na naše nalaze bioluminiscentnog i imunofluorescentnog oslikavanja.

Postoje značajni dokazi da IH uzrokuje povišenje količine slobodnih radikala u mozgu, povišenje ekspresije NADPH-oksidaze, ksantin-oksidaze te nizvodnog NF-κB i HIF α (137). Također, IH uzrokuje povišenu ekspresiju TLR2 kako smo pokazali u prethodno opisanim pokusima, i TLR4, što je pokazano qRT-PCR-om u imunomagnetički odvojenoj mikrogliji nekoliko regija mozga (128). Nadalje, imunofluorescentnim bojanjem potvrđeno je da većina signala TLR2 dolazi iz Iba1-pozitivnih stanica, nalaz koji je pokazan i u prethodnoj literaturi (93, 147). Naši i tuđi rezultati upućuju na povišene razine apoptoze inducirane u različitim regijama mozga tijekom izlaganja IH (134, 169). Posljedično, očekivano je otpuštanje molekularnih obrazaca vezanih za ozljedu koji potiču aktivaciju različitih receptora iz obitelji receptora nalik na Toll.

Postoji nekoliko mogućnosti za divergenciju naših rezultata kvantifikacije Iba1 i bioluminiscentnog oslikavanja. Prva mogućnost je da se ekspresija TLR2 povisila u stanicama mikroglije nakon izlaganja IH, a da nije utjecala na njihovu proliferaciju. Uzevši u obzir ovu interpretaciju, moguće je da je TLR2 utjecao na promjenu fenotipa mikroglije iz stanja „nadzora“ u stanje „budnosti“ ili dalje u stanje „aktivacije“ (103). S obzirom na to da je uobičajeno da aktivna mikroglija proliferira i migrira na mjesta najvećeg oštećenja, promjene

koje nisu stereološki ni morfološki zapažene na našim uzorcima, vjerojatnije je kako su Iba1-pozitivne stanice u našem pokusu počele eksprimirati više TLR2 a da nisu ušle u stanje pune aktivacije.

Nadalje, kako je opisano u uvodu, aktivacija mikroglije može rezultirati razvojem niza fenotipova koji na krajnostima spektra mogu biti potpuno inflamatorni ili antiinflamatorni (91). Korištenjem IH protokola sličnog našem pokazano je kako nema nikakvih znakova mikroglijalne aktivacije u ventralnom hipokampusu nakon 1 dana te 6 i 24 tjedna IH (178). U dorzalnom hipokampusu značajno je povećan broj mikroglije nakon 6 i 24 tjedna izlaganju IH. S obzirom na to da nije postojala ranija kronična vremenska točka teško je zaključiti je li izostanak povećanja gustoće mikroglije u našim uzorcima posljedica nedovoljno dugog trajanja IH protokola ili je uzrokovana nekim drugim faktorom. Isti rad zabilježio je akutni porast IL-1β čiji je receptor, baš kao i TLR2, povezan s MyD88 kao prvom unutarstaničnom komponentom signalnog puta (178). MyD88 je univerzalni adapterski protein koji nizvodno rezultira aktivacijom NFκB.

Naši nalazi i nalazi drugih autora upućuju na to kako su očekivane promjene mikroglije nakon izlaganja IH manje nego što se prethodno pretpostavljalo. Vjerojatno se radi o suptilnim izmjenama mikroglijalnih fenotipova koje će u budućim istraživanjima biti potrebno dokazati specifičnim bojenjem ili kvantifikacijom mikroglijalnih nastavaka Shollovom analizom.

U našem istraživanju pokazano je da broj Iba1-pozitivnih stanica ne ovisi o prisutnosti ili gubitku gena TLR2. U radu Bohaček i sur. pokazano je kako je gen TLR2 potreban za proliferativni potencijal te aktivaciju stanica mikroglije (93) a i naši podaci pokazuju kako je TLR2 pojačano izražen nakon IH na stanicama mikroglije. Moguće je kako se mikroglija u noksi puno slabijoj nego što je ishemijska lezija ne regrutira u tolikoj mjeri te utjecaj manjka gena TLR2 nije dovoljno vidljiv da bi dosegao statistički značajnu razliku nakon 21 dana IH.

6.10 Površina prekrivena astrocitima nije promijenjena nakon izlaganja IH

U našem pokusu nismo uočili promjene u površini prekrivenoj astrocitima. Reaktivna glioza dugo je smatrana detrimentalnim faktorom za preživljenje neurona zbog izlučivanja proinflamatornih citokina, kisikovih slobodnih radikala i NO te formiranja glijalnog ožiljka

koji sprječava ponovno povezivanje neurona (179). Naknadno je pokazano kako u nekim uvjetima astrociti mogu poticati oporavak funkcije CNS-a u vidu omogućavanja dodatne energije i trofičkih faktora za neurone i oligodendrocite, hvatanja slobodnih radikala te popravka krvno-moždane barijere, stimulacije novih krvnih žila, održavanja ionske homeostaze i poticanja neurogeneze (179).

S obzirom na pronađenu apoptozu u neuronima hipokampusa, te sukladno s našoj hipotezi, bile su očekivane konkomitantne promjene astrocita, no nisu pronađene razlike između kontrolnih skupina ni skupina s genom i bez gena TLR2.

Ovaj nalaz je djelomično u skladu s prethodnom literaturom. Gozal i sur. 2001. nisu našli promjene u imunoreaktivnosti astrocita nakon 14 dana IH u regiji CA1 hipokampusa, no zabilježili su ih u korteksu (134). Nadalje, drugo istraživanje pokazalo je značajne promjene astrocita nakon izlaganja 1, 3 i 10 dana IH. Opisana je povećana površina astrocita, veći broj astrocitnih grananja i veći apsolutni broj astrocita, koji, začudo, nije potekao od proliferacije već vjerojatno migracije, što je pokazano nepromijenjenom količinom vimentina i proliferirajućeg antigena stanične jezgre (PCNA, *engl. proliferating cell nuclear antigen*) u kolokalizaciji s GFAP-om. Nađena je povišena ekspresija vimentina i PCNA u neurogenim nišama, subventrikularnoj zoni i girusu dentatusu što je u skladu s prethodno opisanim povišenjem BrdU u istim regijama (179). U navedenom radu porast BrdU bio je interpretiran u vidu neurogeneze, iako nije testirana kolokalizacija BrdU i neuronalnih ili glijalnih markera (180).

Povišene razine glijalnog proteina S100B koji izlučuju reaktivni astrociti zabilježene su nakon 1, 3 te 10 dana IH. S100B se veže za RAGE i potiče aktivaciju NFκB, što je mehanizam također pokazan i u našim rezultatima indukcije TLR2, i u prije spomenutim rezultatima povišenja ekspresije IL1β. Zanimljivo je kako je sam RAGE bio povišen nakon 1 i 3 dana IH, no nakon 10 dana pokazan je jasan povratak na bazalnu razinu ekspresije.

Astrociti igraju ulogu u IH, no naši nalazi i dosadašnja literatura govore u prilog akutnoj promjeni fenotipa astrocita bez proliferacije koja je kompenzirana unutar 14 dana te je vraćena na početnu razinu 21. dana IH. Nedostatak našeg istraživanja astrocita bila je kvantifikacija samo astrocitima prekrivene površine, bez Shollove analize grananja i brojanja pojedinih astrocita.

6.11 Broj c-Fos-pozitivnih stanica nije promijenjen nakon izlaganja IH

U našim pokusima nismo pokazali značajnu promjenu broja c-Fos-pozitivnih stanica nakon izlaganja IH, niti ovisnost o genotipu TLR2. C-Fos je protein obično korišten kao marker aktivnih neurona, iako oko njegove konkretne funkcije još postoje sporovi. Većina literature govori u prilog toga da c-Fos inducira integracija neuronalne aktivnosti ovisne o kalcijskom ulasku u neuron tijekom sekundi do minuta te da samo snažna i konzistentna aktivnost kroz vrijeme može podići unutarstanični kalcij do razine da inducira c-Fos (181). Neki autori opisivali su c-Fos kao marker sinaptičke aktivnosti, a ne broja akcijskih potencijala, ali ova tvrdnja još mora biti potvrđena daljnjim istraživanjima (181). Rad autora Mukai i sur. istraživao je ekspresiju c-Fos-a u velikom broju regija mozga dijabetičnih, pretilih miševa izloženih IH (182). Na žalost nije bila korištena WT-kontrola, pa je nemoguće vući potpune paralele između njihovih i naših rezultata. Unatoč tome, nisu nađene promjene u hipokampusu, talamusu i hipotalamusu u ekspresiji c-Fos-a nakon 14 dana IH. Autori su zabilježili značajni pad c-Fos pozitivnih neurona u piriformnom korteksu, amigdali i ventralnoj tegmentalnoj areji (182).

Pronađen je porast c-Fos-pozitivnih neurona u regiji CA1 hipokampusa nakon 1, 3 i 14 dana IH, u ko-ekspresiji s NMDA-NR1-receptorom (134), dok porast nije bio zabilježen u regiji CA3. Ovi rezultati ne slažu se s našima, niti s rezultatima Mukai i suradnika. Autori vrlo oprezno interpretiraju ove nalaze te ostavljaju prostor za daljnja istraživanja koja će pokazati da li je uloga c-Fos-a u reakciji na IH korisna ili štetna za preživljenje neurona.

Ograničenje naše kvantifikacije c-Fos pozitivnih neurona je malen broj uzoraka, što ostavlja mogućnost kako su naši nalazi previdjeli suptilnije posljedice IH na promjene neuronalne aktivnosti. U budućim istraživanjima bilo bi zanimljivo istražiti razlike WT i $TLR2^{-/-}$ životinja u elektrofiziološkim karakteristikama neurona hipokampusa.

6.12 Magnetskom rezonancom zabilježene su promjene struktura mozga nakon izlaganja intermitentnoj hipoksiji

6.12.1 Statistička metodologija korištena u obradi MRI podataka

Za izračun i prikaz podataka MR oslikavanja korištena je analiza voksel po voksel. Ovo je podrazumijevalo registriranje svih uzoraka u standardni prostor te zatim njihovu usporedbu.

Općenito pri procesiranju MRI podataka postoji nekoliko dvojbi gdje se prva odnosi na razliku između uspoređivanja voksel po voksel ili usporedbe prema regijama interesa. Obrada signala prema regijama interesa sklona je izostaviti neočekivane nalaze što bi s obzirom na resurse uložene u istraživanje bio gubitak informacija. Prema našem mišljenju usporedba voksel po voksel rezultira dodatnim znanstvenim doprinosom u vidu rezultata koji nisu povezani s našom *a priori* hipotezom.

Druga dvojba odnosi se na korekciju podataka ili prikazivanje nekorigiranih podataka. Pri post-procesiranju podataka koriste se kompleksni izračuni koji ponekad zahtijevaju znanje o rezultatima koje imamo - količini buke, veličini razlika ili određivanje praga prikaza (*engl. threshold*) signala s obzirom na podatke što sve otvara mogućnosti greške pri izračunu (*engl. bias*). U našem slučaju odlučili smo se za usporedbu voksel po voksel koja koristi nekorigiranu statistiku koja ima nekoliko prednosti (Tom Hartley, https://thermaltoy.wordpress.com/2012/05/28/devils-advocate-uncorrected-stats-and-the-trouble-with-fmri/):

a) prag zaključivanja je neovisan o podacima
b) prag je isti za cijeli mozak
c) prag je isti za različite studije, tj. ne može se modificirati da bi sakrio „nepovoljne“ rezultate
d) izračun praga je transparentan.

Kako bismo intuitivno vizualno predočili nekorigirane podatke koji sadrže informaciju i o prelasku statističke značajnosti i o veličini razlike između skupina koristili smo višedimenzionalni vizualni prikaz prema prijedlogu Allen i sur. (159).

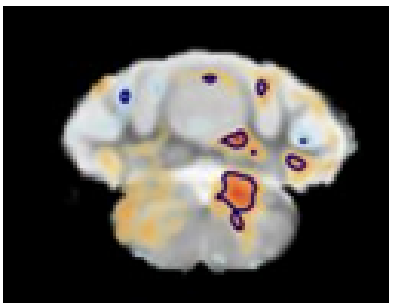
Postoji nekoliko vrsta razlika u rezultatima. Moguće je da razlike među grupama budu male, no prelaze (arbitrarnu) vrijednost od $P < 0,05$ zbog uske varijabilnosti među uzorcima. Nadalje, moguće je da su razlike u apsolutnom smislu velike, no zbog varijabilnosti među uzorcima nisu prešle graničnu vrijednost statističke značajnosti. Kako bi se uzela u obzir i prikazala oba parametra, autori Allen i sur. predlažu višedimenzionalni način kako izbjeći ograničenja prikaza kompleksnih usporedbi poput MRI snimanja (159). Ovi prikazi sadrže

informaciju o veličini učinka te o prelasku praga *p* utvrđenog t-statistikom. Na taj način mjerilo boje u našim rezultatima izgleda kao na slici, gdje x-os, tj. nijansa boje označava veličinu učinka dok y-os, tj. prozirnost boje označava 1- p vrijednost od 0,5 do 1 (Slika 6.2).



Slika 6.2 **Mjerilo boje označava dvije dimenzije statističkog izračuna podataka.** *Horizontalno mjerilo, x-os, označeno je nijansom boje te opisuje veličinu učinka od -4 do 4, dok je vertikalno mjerilo, y-os, označeno s prozirnošću boje te opisuje 1- p vrijednost od 0,5 do 1.*

U daljnjem primjeru usporedbe malog mozga između TLR2 IH te TLR2 CTRL skupine vidljivo je kako je jedan veliki lokus smanjenog volumena u produljenoj moždini dostigao prag od $p < 0,05$, te je on zaokružen tamnijim rubom (Slika 6.3). Nadalje, vidimo difuzne razlike koje dostižu i veličinu učinka oko 2, no zbog varijabilnosti ne dosežu statističku značajnost. Ovakav vizualni prikaz je informativniji od onog koji isključuje sve razlike za $p > 0,05$.



Slika 6.3. **Primjer višedimenzionalnog vizualnog prikaza korištenog za MRI rezultate u disertaciji.** *Uz statistički značajne, tamno obrubljene regije, prikazane su i regije koje nisu dosegle statističku značajnost te prema smjernicama sadrže informaciju o razini nesigurnosti podataka.*

U znanstvenoj sferi neurooslikavanja vode se zanimljive i oštre rasprave o tome kako naša očekivanja, ili samo vrijednosni stavovi mogu utjecati na statistiku koju odlučujemo koristiti u post-procesiranju MRI podataka.

„Tradicionalno, lokalističko ili holističko razmatranje funkcije mozga naglašava dokaze za funkcionalnu segregaciju ili funkcionalnu integraciju između komponenti živčanog sustava, ovisno o stavu. Ni jedno od ovih dvaju stajališta ne može adekvatno samo za sebe objasniti višestruke razine na kojima se odvijaju interakcije tijekom moždane aktivnosti.“ (183).

6.13 Hipertrofija hipokampusa nakon izlaganja IH u TLR2 IH skupini

Sukladno prvom specifičnom cilju našeg istraživanja, u našem istraživanju opisane su uočljive, bilateralne, statistički značajne razlike u volumenu lijevog i desnog hipokampusa u vidu povećanja u skupini izloženoj IH.

Koliko je nama poznato, ovo je prva MRI studija strukturnih promjena na odraslim miševima izloženima IH te nam za kontekst interpretacije naših rezultata služe klinička istraživanja na pacijentima s OSA-om.

Nekoliko studija je pokušalo naći organsku podlogu neurokognitivnih promjena u pacijenata s OSA-om te korelirati kognitivne deficite u domenama izvršne disfunkcije, kratkoročnog pamćenja, vizualne i verbalne dugoročne memorije i verbalnog izražavanja zabilježenih u pacijenata s OSA-om sa strukturnim i funkcionalnim promjenama mozga. Do sada još nije postignut konsenzus o poveznici kognitivnih ispada i strukturnih poremećaja, vjerojatno zbog višedimenzionalnosti noksa koje prethode razvoju OSA-e, među kojima poremećaj arhitekture spavanja i hipoksemija različitih intenziteta drugačije djeluju na mozak te međusobno interferiraju. Predloženo je kako fragmentacija sna pojačava osjetljivost nekih struktura mozga na hipoksiju, dok je također opisana mogućnost da hipoksija slabog intenziteta djeluje protektivno na poremećaje uzrokovane disrupcijom arhitekture spavanja (70).

Nalazi strukturnog oslikavanja pacijenata s OSA-om nekonzistentni su zbog različitih tehničkih ograničenja u istraživanju ovog područja. Studije se razlikuju s obzirom na raspodjelu pacijenata prema težini OSA-e, tj. broju apneičnih-hipopneičnih epizoda, starosti

pacijenata, prethodnom tretmanu s CPAP-om. Neke studije uspoređuju nalaze OSA-e s kontrolnim skupinama ili istu skupinu pacijenata prije i nakon CPAP-tretmana. Nadalje, različite studije koriste drugačije protokole snimanja te pre- i post-procesiranje za analizu dobivenih MRI podataka. Primjerice, u radu Canessa i sur. korištena su dva različita protokola, jedan procijenjen kao najbolji od strane autora te drugi za usporedbu s već publiciranim negativnim nalazima iz literature te su prikazane dvije serije različitih rezultata (62, 82). Rosenzweig i sur. prikazali su prednosti objektivne automatizirane analize pomoću programa FreeSurfer (70). Usto, pri analizi literature treba uzeti u obzir da razvoj tehnologije oslikavanja omogućava sve osjetljivije nalaze, primjerice u razlučivanju citoarhitektonski različitih polja hipokampusa te da je starost studije važan čimbenik pri kritičkoj analizi dosad objavljenih podataka.

Unatoč svim ograničenjima, hipokampalna regija se gotovo uvijek spominje kao regija interesa (184). Morrell i sur, su našli hipotrofiju hipokampusa kao jedini nalaz svoje VBM studije na 7 OSA pacijenata (79). Macey i sur. našli su obostrano smanjenje parahipokampalnog girusa i desnostrano smanjenje samog hipokampusa (77). Yaouhi et al. također opisuju smanjenje u desnom hipokampusu i parahipokampalnom girusu (80). Nakon što je nađeno smanjenje volumena lijevog parahipokampalnog girusa u pacijenata s OSA-om u usporedbi s kontrolnom skupinom, autori su istu skupinu OSA pacijenata snimili ponovno nakon 3 mjeseca tretmana CPAP-om te su primijetili specifično povećanje volumena sive tvari hipokampusa te lokusa u frontalnom korteksu (62). Istraživanje na 32 pacijenta s OSA-om pokazalo je bilateralno značajno povećanje hipokampusa i do 4% ukupnog volumena (70).

Iz navedenih podataka može se zaključiti kako je hipokampus, struktura poznata kao osjetljiva na hipoksiju, definitivno implicirana u patologiji OSA-e. Neovisan nalaz hipertrofije hipokampusa u našoj pretkliničkoj studiji i u dvijma kliničkim studijama iz 2011. i 2013. dovodi do zaključka kako je hipertrofija hipokampusa posljedica stvarnog etiopatološkog supstrata u razvoju OSA-e. S obzirom na to da se hipotrofija hipokampusa spominje u radovima još češće, ovaj nalaz dovodi nas do zaključka da hipokampus različito reagira na hipoksiju u različitim fazama razvoja bolesti (62, 70). Moguće je da u ranim fazama OSA-e, dok organizam još posjeduje kompenzacijske kapacitete, dolazi do reaktivnog povećanja hipokampusa, dok naknadno dolazi do sloma ovih mehanizama te razvoja hipotrofije (70).

Jedan od postuliranih mehanizama razvoja hipertrofije hipokampusa jest ishemijsko prekondicioniranje (IP). IP ili inducirana tolerancija svojstvo je organizma da reagira na određene razine i trajanja hipoksije tako da potiče kompenzatorne mehanizme koju mu omogućavaju da bolje podnosi noksu. Ishemijsko prekondicioniranje dobro je opisan fenomen najčešće istraživan u pretkliničkom kontekstu prekondicioniranja prije indukcije moždanog udara ili kardiovaskularnog inzulta. Zanimljiva studija koja je testirala ovu hipotezu izložila je dvije skupine miševa dubokoj IH (6%) te lakšoj IH (10%) tijekom 35 dana. Zatim je životinjama induciran moždani udar te je pokazano kako je skupina s lakšom hipoksijom imala manju veličinu lezije, manji neurološki deficit, manju mitohondrijsku proizvodnju slobodnih radikala te manju podložnost Ca^{2+} depolarizacijama (136) u usporedbi s dubokom IH skupinom. U usporedbi s kontrolnom skupinom, skupina izložena lakšoj IH tijekom 35 dana imala je manju leziju nakon indukcije moždanog udara.

Brojne osjetne, posredujuće i efektorske molekule identificirane su u posredovanju protektivnog učinka ishemičkog prekondicioniranja kroz mehanizme brzog i odgođenog djelovanja (185). Glavni mehanizmi djelovanja su neutraliziranje štetnih molekula, povećanje dostupnosti supstrata, smanjenje potrošnje energije te optimiziranje procesa cijeljenja (185). Trenutno se provodi nekoliko randomiziranih kliničkih pokusa koji rade na procjeni ishemičnog prekondicioniranja u ljudi koje bi se moglo primijeniti na pacijente visokog rizika za reinfarkt ili ponovljeni moždani udar. Većina kliničke primjene prekondicioniranja je periferno prekondicioniranje te farmakološko prekondicioniranje molekulama koje potiču signalne puteve slične onima u blagoj ishemiji, bez fizičkog stimulusa. Meta-analiza randomiziranih kliničkih pokusa o učinku ishemičnog prekondicioniranja nije pokazala utjecaj na mortalitet u kardiovaskularnih pacijenata, no zabilježen je značajno manji broj infarkta miokarda u prekondicioniranih pacijenata (186).

U ovom kontekstu, nalaz hipertrofije hipokampusa mogao bi označavati proces kompenzacije nakon izlaganja IH. Više radova pokazalo oslabljeno pamćenje životinja u Morrisovom vodenom labirintu, koje je bilo izraženije nakon 7 dana IH nego nakon 14 i 30 dana IH (81, 95, 187). Rad Gozala i sur. interpretirao je ovaj nalaz u kontekstu kompenzatorne hipokampalne neurogeneze, te pokazao povišenje Nestin-pozitivnih stanica u DG nakon 7 dana IH koji je porastao nakon 14 dana IH te ostao značajno povišen nakon 30 dana IH. Također, broj BrdU-pozitivnih stanica u DG akutno je pao nakon 1 i 3 dana IH, počeo se

vraćati početnim razinama pri duljim vremenima izlaganja IH te postao značajno višim od početne razine nakon 14 i 30 dana IH (81).

Kontinuirana adultna neurogeneza opisana je u girusu dentatusu, subventrikularnoj zoni i olfaktornom bulbusu miša te je nedavno direktno pokazana u hipokampusu, subventrikularnoj zoni i striatumu čovjeka putem datiranja C^{14} radionuklida u mozgu i drugih histoloških metoda (188, 189). Prije se izlaganje ishemiji smatralo inhibirajućim za proces neurogeneze te su se poremećaji u kratkoročnom pamćenju pacijenata s OSA-om interpretirali kroz oštećenje neurogenih niša. U posljednjih 15-ak godina ovaj zaključak je doveden u pitanje te je više studija pokazalo kako postoji mogućnost da neki hipoksijski protokoli ili neke faze razvoja OSA-e inducijraju neurogenezu (70, 81). Tsai i sur su pokazali da IH administrirana 7 dana nakon moždanog udara inducira neurogenezu putem signalnog puta BDNF/PI3K/AKT, povišenja ekspresije c-Fos-a, i HIF- 1α preko MAPK-fosforilacije te popravlja rezultate na testovima učenja i pamćenja (190, 191). Također je pokazano da je CREB signalni put kritičan za indukciju i preživljenje novo generiranih neurona, te je pokazana njegova korelacija s bifazičnom krivuljom neurogeneze tijekom produljenog izlaganja IH (192). Unatoč tome, stvarna uloga kompenzacije poremećaja generiranjem novih neurona još uvijek nije potpuno utvrđena. Iako je pokazana simultana pojava novih neurona, poboljšanje pamćenja na ponašajnim testovima i ko-ekspresija sinaptičkih markera sinaptofizina i PSD95 na novoformiranim neuronima, drugi sinaptički markeri poput SNAP25, VAMP i debrina nisu pokazali ekspresiju na „mladim“ neuronima (81, 191). Potrebna su daljnja istraživanja koja bi se fokusirala na ulogu novih neurona u restituciji oštećenja nastalih tijekom moždanog udara ili u pacijenata s OSA-om.

S obzirom na naše rezultate i rezultate opisane u literaturi, ostaje otvorena mogućnost da je u podlozi nađenog povećanja volumena hipokampusa u skupine TLR2 IH povećani broj novo-stvorenih neurona, no vrlo vjerojatno došlo je i do promjene volumena i mikrostrukture astrocita koju je potrebno evaluirati daljnjim, osjetljivijim metodama.

6.14 Interpretacija strukturnih razlika između TLR2 IH te TLR2$^{-/-}$ IH skupina

Zabilježen veći volumen mozga između TLR2 IH te TLR2 $^{-/-}$ IH skupine navodi na zaključak kako gen TLR2 doprinosi reakciji mozga na intermitentnu hipoksiju. S obzirom na to da je

zabilježen trend povećanja mozga i u skupini TLR2$^{-/-}$ CTRL u odnosu na TLR2 CTRL, moguće je kako TLR2 ima i razvojnu ulogu no pod uvjetima intermitentne hipoksije utjecaj gena postaje relativno značajniji.

Nakon izlaganja 21 danu IH nađeno je da miševi s funkcionalnim genom TLR2 reagiraju bilateralnim povećanjem hipokampusa, lijevog cingulatnog i motoričkog korteksa te strijatuma i presubikuluma. Smanjenje volumena bilo je izraženo obostrano u retikularnoj jezgri talamusa, u lijevom olfaktornom bulbusu, desnom dorzalnom strijatumu i piriformnom korteksu. Za razliku od toga, promjene u velikom mozgu miševa genotipa TLR2$^{-/-}$ bile su manje izražene te je pokazano ograničeno povećanje desnog hipokampusa, strijatuma i presubikuluma te smanjenje volumena u lijevom olfaktornom bulbusu u miševa TLR2$^{-/-}$ IH skupine u odnosu na skupinu TLR2$^{-/-}$ CTRL. Najveće razlike zabilježene su u mezencefalonu, ponsu i malom mozgu, gdje je bilo vidljivo smanjenje struktura produljene moždine i povećanje volumena malog mozga.

Zanimljivo je kako su strukture velikog mozga zahvaćene u obje skupine vrlo slične, ali su reakcije TLR2$^{-/-}$ IH skupine na hipoksiju manje izražene. Ovo je pogotovo točno u vidu hipertrofičnih promjena zabilježenih u TLR2 IH skupini. Nastavno na interpretaciju ishemijskog prekondicioniranja i hipokampalne neurogeneze, moguće je da je gen TLR2 involviran u posredovanje učinka IH pri kompenzatornim procesima nakon izlaganja intermitentnoj hipoksiji. Ovaj kompenzatorni učinak mogao bi biti stimulacija neurogeneze u hipokampusu ili modulacija nekog drugog signalnog puta.

Kako je gen TLR2 impliciran u regulaciji hipokampalne neurogeneze (193), moguće je da je nedostatak funkcionalnog gena TLR2 oslabio hipokampalnu neurogenezu, što bi bilo u skladu s našom interpretacijom hipertrofije hipokampusa u TLR2 IH skupini, te njezinog izostanka u TLR2$^{-/-}$ IH skupini. Nažalost, od 2007. ne postoje radovi koji su pronašli daljnje dokaze za potvrdu opisanih nalaza. Nedavni rad koji se fokusirao na TLR2$^{-/-}$ fenotip neizloženih životinja pokazao je kako u TLR2$^{-/-}$ miševa postoji značajno viša razina apoptotičnih neurona nego u WT skupini (173).

Nalaz hipotrofije struktura moždanog debla u TLR2$^{-/-}$ IH skupine u usporedbi s TLR2$^{-/-}$ CTRL skupinom zanimljiv je u kontekstu kliničkog istraživanja koje je opisalo strukturne i funkcionalne promjene u rostro-ventro-lateralnoj produljenoj moždini i dorzolateralnom

ponsu koja je bila povezana s povišenim mišićnim vazokonstriktornim tonusom pod regulacijom simpatikusa u pacijenata s OSA-om te posljedičnim povišenim tlakom. Autori su našli VBM promjene i promjene ovisne o oksigenaciji krvi (BOLD *engl. blood oxygen level dependent*) u opisanim regijama nakon liječenja CPAP-om koje su povezali s normalizacijom sistemskog tlaka nakon liječenja (194, 195). Daljnja istraživanja trebala bi proučiti da li izostanak gena TLR2 ima utjecaj na povišenje tlaka pri IH te dalje razjasniti etiološku podlogu za u nađene strukturne promjene na MRI-ju.

Rezultati korelacijskih mapa naznačili su mogućnost postojanja značajne disrupcije strukture hipokampusa u TKO IH miševa koja nije potpuno povezana s promjenom volumena cijelog hipokampusa, već se radi o promjeni udjela volumena nekih njegovih podregija. Ovi rezultati posredno implicirani rezultatima korelacijskih matrica zahtjevaju daljnja istraživanja koja će proučiti anatomski ustroj podregija hipokampusa u $TLR2^{-/-}$ životinja.

6.15 Utjecaj kronične intermitentne hipoksije na razvoj i značajke upalnog odgovora mozga

Kronično izlaganje IH uzrokuje umjeren upalni stimulus, primjerice u usporedbi s niskim dozama LPS-a (naši podaci, (178)). Naš nalaz aktivacije TLR2 bez konkomitantne robusne proliferacije mikroglije, nalaz akutnog povišenja IL1β te ograničene ekspresije upalnih citokina u kasnijim fazama IH (178), zajedno s već spomenutim nalazom kako je razina apoptoza nakon 14 dana IH višestruko manja od onih zabilježenih 1. i 2. dana IH (134), počinju formirati sliku o značajkama procesa upale nakon izlaganja IH koje su izrazito ovisne o trajanju hipoksije.

Očito je da organizam značajno i intenzivno razvija akutnu imunosnu signalizaciju nakon prvog izlaganja IH. Nadalje, aktiviraju se različiti mehanizmi upale, ali i kompenziraju kroz različito dug period. Već nakon 6 h povećava se u regiji CA1 hipokampusa ekspresija strukturnih proteina, proteina vezanih za apoptozu, šaperonskih proteina te regulatora staničnog metabolizma (138). Nakon 8 h povisuje se razina TLR2 na stanicama mikroglije, primarno u olfaktornom bulbusu te zatim u medijalnoj septalnoj jezgri i korteksu, te ona ostaje trajno povišena, barem do 3 tjedna trajanja IH (naši podaci). Također se izrazito povisuje razina IL1β i RANTES/CCL5 mRNA (178). Nakon 2 dana IH broj apoptoza

hipokampusa doseže svoj maksimum i nadalje se kompenzira iako ostaje značajno povišen i do 3 tjedna nakon IH ((134), naši podaci). Počevši s prvim danom inducira se ekspresija COX-2 i prostaglandina E2 koja ostaje trajno značajno povišena tijekom 14 dana IH (97); inducira se NADPH-oksidaza čija aktivnost i ekspresija rastu od prvog dana IH sve do 30. dana (96). Lipidna peroksidacija je također pojačana u miševa nakon 14 dana IH (96). Nakon 3 tjedna IH ne nalaze se promjene gustoće mikroglije no nakon 6 tjedana ove promjene su prisutne u dorzalnom hipokampusu bez povišenih razina mRNA IL-6, IL- 10, TNFα i IL1β, što je potvrđeno i nakon 24 tjedna IH (naši podaci, (178)). Bihevioralne promjene prate molekularne promjene, od kojih je najizraženija gubitak prostornog pamćenja u Morrisovom vodenom labirintu već nakon 1 dana izlaganja IH koji se polako vraća prema kontrolnim vrijednostima nakon 14 i 30 dana IH. Također nakon 1 dan IH prisutno je znatno skraćenje NREM- i REM-faze sna, koje se već drugi dan kompenzira produljenim trajanjem, a zatim se treći dan vraća u normalu (134). Astrociti povećavaju površinu i razgranatost svojih nastavaka već 1. dan nakon IH što ostaje povišeno nakon 3. i 10. dana izlaganja IH (179). U ovim vremenskim točkama također se nalaze povišene razine glijalnog proteina S100B ali RAGE, njegov receptor, nakon 10 dana IH više nije značajno povišen (179). Nakon 14 dana i 21 dan IH više nisu zabilježeni značajno veći brojevi i površine astrocita ((134), naši podaci). MRI podaci nakon 21 dana pokazuju višestruke promjene hipertrofije i hipotrofije struktura velikog mozga, među kojima je naizraženija hipertrofija hipokampusa, motornog i cingulatnog korteksa te hipotrofija olfaktornog bulbusa (naši podaci).

7 ZAKLJUČCI

7.1 Novo-razvijeni sustav za induciranje intermitentne hipoksije precizan je i učinkovit model opstruktivne apneje spavanja

U sklopu ovog istraživanja osmišljen je i razvijen sustav za izlaganje intermitentnoj hipoksiji, mišjeg modela opstruktivne apneje spavanja. Korištenjem predkomore za miješanje plinova i posebno dizajniranog kontrolera razvijen je brz i precizan mehanizam za induciranje IH. Sustav je bio lak za rukovanje i etički prihvatljiv za pokusne životinje. Razvijeni sustav je smanjio rizik za pojavu podbačaja kisika pri dubokoj hipoksiji i omogućio definiranje različitih protokola sa dva različita vremena izlaganja te dva perioda različitih postotaka kisika u komori.

7.2 Intermitentna hipoksija uzrokuje strukturne promjene mozga

Specifični cilj ovog istraživanja bio je utvrditi razvoj strukturnih promjena tijekom kronične intermitentne hipoksije u miša postupcima MRI oslikavanja. Utvrđeno je kako IH uzrokuje značajne strukturne promjene mozga u vidu hipertrofije hipokampusa, motoričkog i cingulatnog korteksa te hipotrofije retikularnih jezgara talamusa, dorzalnog strijatuma i piriformnog korteksa.

7.3 Strukturne promjene uzrokovane intermitentnom hipoksijom manje su izražene u životinja bez gena TLR2

Usporedbom strukturnih promjena uzrokovanih IH u životinja sa i bez gena TLR2 pokazano je kako su promjene hipokampusa, korteksa i talamusa više izražene u miševa s funkcionalnim genom TLR2. Životinje bez gena TLR2 pokazale su hipotrofične promjene u ponsu, mezencefalonu te produljenoj moždini, kao i hipertrofiju regija malog mozga. Ovi rezultati navode na zaključak kako je TLR2 uključen u odgovor mozga na IH, no nije utvrđeno da li je njegova uloga dugoročno protektivna ili detrimentalna.

7.4 Intermitentna hipoksija uzrokuje ograničene funkcionalne promjene mozga

Specifični cilj ovog istraživanja bio je utvrditi razvoj funkcionalnih promjena tijekom kronične intermitentne hipoksije u miša. Pokazano je kako izlaganje IH utječe na gubitak tjelesne težine koji se u životinja sa funkcionalnim genom TLR2 uspjeva kompenzirati u kroničnim fazama izlaganja. Nadalje, pokazano je kako IH ne uzrokuje značajne promjene u sposobnosti za prostorno pamćenje miševa kao ni promjene u ponašajnju miševa u testu otvorenog polja. Miševi su pokazali hiperekscitaciju u obje grupe izložene IH na testu visenja na repu. Rezultati dovode do zaključka da IH uzrokuje specifične i ograničene funkcionalne promjene u miševa sa i bez gena TLR2.

7.5 Receptori TLR2 sudjeluju u akutnom i kroničnom odgovoru mozga na intermitentnu hipoksiju

Specifični cilj ovog istraživanja bio je utvrditi ulogu i vremenski raspored indukcije TLR2 korištenjem transgeničnog mišjeg modela. Utvrđeno je kako TLR2 sudjeluje u akutnom odgovoru mozga na IH već nakon 8 h izlaganja, te u kroničnom odgovoru tijekom 3 tjedna izlaganja IH.

7.6 Intermitentna hipoksija uzrokuje apoptozu neurona u regiji hipokampusa CA1, CA3 i DG

Istraživanje je pokazalo da izlaganje IH uzrokuje statistički značajno veće brojeve apoptotičnih neurona u regiji CA1, CA3 te DG. Nalaz apoptoza u regijama hipokampusa u kontrastu je sa strukturnim nalazima hipertrofije hipokampusa u TLR2 IH skupini, no u skladu s prethodnom literaturom.

7.7 Strukturne promjene uzrokovane intermitentnom hipoksijom nisu popraćene proliferacijom mikroglije i astrocita

Specifični cilj istraživanja bio je korelirati rezultate slikovnih nalaza sa rezultatima imunohistokemijskog bojenja mikroglije i astrocita. Pokazano je kako strukturne promjene nađene MRI oslikavanjem nakon izlaganja IH nisu popraćene proliferacijom mikroglije i astrocita u hipokampusu, hipotalamusu i talamusu.

8 SAŽETAK

Opstruktivna apneja spavanja (OSA) kronična je, često neprepoznata, multisistemska bolest karakterizirana intermitentnom hipoksijom (IH) i fragmentacijom sna koja nastupa zbog periodičke opstrukcije gornjeg dišnog puta tijekom spavanja. OSA je povezana s brojnim komorbiditetima, od kojih su najvažnije kardiovaskularne bolesti, moždani udar i Alzheimerova bolest (AD). Za potvrdu pretpostavke kako su upalni procesu u mozgu bolesnika s OSA-om u pozadini povezanosti ove bolesti s AD, potrebno je razumijevanje upalnih procesa u OSA-i. Provedeno je istraživanje na mišjem modelu OSA-e kako bi se utvrdile značajke neuroinflamacije u životinja izloženih IH.

Za optimizaciju modela IH razvijen je sustav kojim se hipoksija brzo i precizno regulirala. Transgenični TLR2-luc-GFP miševi izloženi su IH (N=20) i tijekom 21 dan praćeni *in vivo* snimanjem bioluminiscenicije, dok je kontrolna skupina (N=6) praćena na isti način bez izlaganja IH. Skupine miševa sa i bez Tlr2 gena izložene IH (N(TLR2 IH)= 15, N($TLR2^{-/-}$ IH)= 15) te njihove kontrole (N(TLR2 CTRL)= 11, N($TLR2^{-/-}$ CTRL)= 8) podvrgnute su testu visenja na repu, otvorenog polja i Y-labirinta. Mozgovi su izolirani i snimljeni ex vivo magnetskom rezonancom te su imunohistokemijskim bojanjem kvantificirane stanice mikroglije (Iba1+), astrocita (GFAP+) i cFos-pozitivni neuroni.

Snimanjem bioluminiscencije pokazano je akutno povišenje ekspresije TLR2 koje ostaje kronično povišeno tijekom 3 tjedna izlaganja IH. U TLR2 IH skupini pokazana je hipertrofija hipokampusa, motornog i cingulatnog korteksa te hipotrofija talamusa i piriformnog korteksa. Strukturne promjene $TLR2^{-/-}$ IH skupine bile su manje izražene u velikom mozgu no pokazana je hipotrofija struktura mezencefalona, ponsa i produljene moždine te hipertrofija malog mozga. IH ne utječe na prostorno pamćenje i opću pokretnost životinja ali pojačava pokretnost životinja na testu visenja na repu. Nije pokazan utjecaj IH na promjene u broju stanica mikroglije, astrocita i c-Fos-pozitivnih neurona.

IH uzrokuje akutno i kronično povišenje ekspresije TLR2 u mozgu te uzrokuje strukturne promjene mozga izraženije u životinjama sa pristunim genom TLR2. IH uzrokuje ograničene funkcionalne i histološke promjene mozga koje se nisu razlikovale među skupinama sa i bez gena TLR2.

9 SUMMARY

Characteristics of neuroinflammation during chronic intermittent hypoxia, a mouse model of obstructive sleep apnea

Dora Polšek, 2017

Obstructive sleep apnea (OSA) is a chronic, underdiagnosed, multi-system disease characterized by intermittent hypoxia (IH) and sleep fragmentation that occurs due to periodic upper airway obstruction during sleep. OSA often presents with multiple comorbidities, the most important of which are cardiovascular diseases, stroke and Alzheimer's dementia (AD). Detailed research is needed to confirm the hypothesis that neuroinflammation is the common ethiopathogenic background for both OSA and AD. The study focused on establishing the properties of neuroinflammation in animals exposed to IH, the mouse model of OSA.

To optimize the IH model a fast and precise system was developed. Transgenic TLR2-luc-GFP mice underwent 21 days of IH (N=20) and their TLR2 expression was followed using *in vivo* bioluminescenc imaging (BLI), while the controls (N=6) were imaged in the same way without IH exposure. Groups of mice with and without Tlr2 gene exposed to IH (N(TLR2 IH)= 15, N($TLR2^{-/-}$ IH)= 15) and their controls (N(TLR2 CTRL)= 11, N($TLR2^{-/-}$ CTRL)= 8) were tested using the tail suspension test (TST), open field and Y maze. The brains were subsequently isolated and imaged *ex vivo* using MRI. Immunohistochemical staining for microglia (Iba1), astrocytes (GFAP) and c-Fos positive neurons was quantified.

BLI showed an acute upregulation of TLR2 after IH exposure that remained elevated throughout the 21-day protocol. Bilateral hypertrophy of the hippocampal, and left motor and cingulate cortex as well as hypotrophy of the thalamus and piriform cortex were found in the TLR2 IH group. Structural changes were less pronounced in the $TLR2^{-/-}$ IH group in the cerebrum, while significant hypotrophic changes were found in the midbrain, pons and medulla as well as hypertrophy of the cerebellum. Behavioral and histological testing found limited effects that warrant further investigation.

IH exposure caused an acute and chronic upregulation of TLR2 expression in the brain and induced structural changes that were more pronounced in animals with the functional TLR2 gene. IH caused limited functional and histological changes in the brain.

10 POPIS LITERATURE

1. Medicine AAoS. The international classification of sleep disorders: diagnostic and coding manual. 2005.

2. Rosenzweig I, Williams SC, Morrell MJ. The impact of sleep and hypoxia on the brain: potential mechanisms for the effects of obstructive sleep apnea. Current opinion in pulmonary medicine. 2014;20(6):565-71.

3. Sánchez AI, Martínez P, Miró E, Bardwell WA, Buela-Casal G. CPAP and behavioral therapies in patients with obstructive sleep apnea: effects on daytime sleepiness, mood, and cognitive function. Sleep medicine reviews. 2009;13(3):223-33.

4. Abel T, Havekes R, Saletin JM, Walker MP. Sleep, plasticity and memory from molecules to whole-brain networks. Current biology. 2013;23(17):R774-R88.

5. Gelber RP, Redline S, Ross GW, Petrovitch H, Sonnen JA, Zarow C, et al. Associations of brain lesions at autopsy with polysomnography features before death. Neurology. 2015;84(3):296-303.

6. Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. New England Journal of Medicine. 1993;328(17):1230-5.

7. Franklin KA, Lindberg E. Obstructive sleep apnea is a common disorder in the population—a review on the epidemiology of sleep apnea. Journal of thoracic disease. 2015;7(8):1311-22.

8. Lumeng JC, Chervin RD. Epidemiology of pediatric obstructive sleep apnea. Proceedings of the American Thoracic Society. 2008;5(2):242-52.

9. Lurie A. Obstructive sleep apnea in adults: epidemiology, clinical presentation, and treatment options. Obstructive Sleep Apnea in Adults. 2011;46:1-42.

10. Andreou G, Vlachos F, Makanikas K. Effects of chronic obstructive pulmonary disease and obstructive sleep apnea on cognitive functions: evidence for a common nature. Sleep disorders. 2014;2014.

11. Ferini-Strambi L, Fantini M, Castronovo C. Epidemiology of obstructive sleep apnea syndrome. Minerva medica. 2004;95(3):187-202.

12. Mokhlesi B, Ham SA, Gozal D. The effect of sex and age on the comorbidity burden of OSA: an observational analysis from a large nationwide US health claims database. European Respiratory Journal. 2016:ERJ-01618-2015.

13. Cairns A, Poulos G, Bogan R. Sex differences in sleep apnea predictors and outcomes from home sleep apnea testing. Nature and Science of Sleep. 2016;8:197.

14. Jehan S, Auguste E, Zizi F, Pandi-Perumal SR, Gupta R, Attarian H, et al. Obstructive Sleep Apnea: Women's Perspective. Journal of sleep medicine and disorders. 2016;3(6).

15. Galvan T, Camuso J, Sullivan K, Kim S, White D, Redline S, et al. Association of estradiol with sleep apnea in depressed perimenopausal and postmenopausal women: a preliminary study. Menopause. 2017;24(1):112-7.

16. Hongyo K, Ito N, Yamamoto K, Yasunobe Y, Takeda M, Oguro R, et al. Factors associated with the severity of obstructive sleep apnea in older adults. Geriatrics & gerontology international. 2016.

17. Kent BD, Ryan S, McNicholas WT. Obstructive sleep apnea and inflammation: relationship to cardiovascular co-morbidity. Respiratory physiology & neurobiology. 2011;178(3):475-81.

18. Bradley TD, Floras JS. Obstructive sleep apnoea and its cardiovascular consequences. The Lancet. 2009;373(9657):82-93.

19. Qu H, Guo M, Zhang Y, Shi D-z. Obstructive sleep apnea increases the risk of cardiac events after percutaneous coronary intervention: a meta-analysis of prospective cohort studies. Sleep and Breathing. 2017:1-8.

20. Toukh M, Pereira EJ, Falcon BJ, Liak C, Lerner M, Hopman WM, et al. CPAP reduces hypercoagulability, as assessed by thromboelastography, in severe obstructive sleep apnoea. Respiratory physiology & neurobiology. 2012;183(3):218-23.

21. Tan H-L, Gozal D, Samiei A, Bhattacharjee R, Wang Y, Ramirez HM, et al. T regulatory lymphocytes and endothelial function in pediatric obstructive sleep apnea. PloS one. 2013;8(7):e69710.

22. Ifergane G, Ovanyan A, Toledano R, Goldbart A, Abu-Salame I, Tal A, et al. Obstructive Sleep Apnea in Acute Stroke. Stroke. 2016;47(5):1207-12.

23. Gildeh N, Drakatos P, Higgins S, Rosenzweig I, Kent BD. Emerging co-morbidities of obstructive sleep apnea: cognition, kidney disease, and cancer. Journal of Thoracic Disease. 2016;8(9):E901.

24. Bista SR, Barkoukis TJ. Medical disorders impacted by obstructive sleep apnea. Dental Clinics of North America. 2012;56(2):373-86.

25. Saaresranta T, Hedner J, Bonsignore MR, Riha RL, McNicholas WT, Penzel T, et al. Clinical Phenotypes and Comorbidity in European Sleep Apnoea Patients. PloS one. 2016;11(10):e0163439.

26. Medeiros C, De Bruin V, Andrade G, Coutinho W, de Castro-Silva C, De Bruin P. Obstructive sleep apnea and biomarkers of inflammation in ischemic stroke. Acta Neurologica Scandinavica. 2012;126(1):17-22.

27. Akinnusi M, Jaoude P, Kufel T, El-Solh AA. Toll-like receptor activity in patients with obstructive sleep apnea. Sleep and Breathing. 2013;17(3):1009-16.

28. Stanke-Labesque F, Pépin J-L, Gautier-Veyret E, Lévy P, Bäck M. Leukotrienes as a molecular link between obstructive sleep apnoea and atherosclerosis. Cardiovascular research. 2014;101(2):187-93.

29. Chen Y-C, Su M-C, Liou C-W, Liu S-F, Chen C-J, Lin H-C, et al. Co-upregulation of Toll-like receptors 2 and 6 on peripheral blood cells in patients with obstructive sleep apnea. Sleep and Breathing. 2015;19(3):873-82.

30. Rosenzweig I, Glasser M, Polsek D, Leschziner GD, Williams SC, Morrell MJ. Sleep apnoea and the brain: a complex relationship. The Lancet Respiratory Medicine. 2015;3(5):404-14.

31. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. Circulation. 2005;112(17):2660-7.

32. Kaditis AG, Finder J, Alexopoulos EI, Starantzis K, Tanou K, Gampeta S, et al. Sleep-disordered breathing in 3,680 Greek children. Pediatric pulmonology. 2004;37(6):499-509.

33. Capdevila OS, Kheirandish-Gozal L, Dayyat E, Gozal D. Pediatric obstructive sleep apnea: complications, management, and long-term outcomes. Proceedings of the American Thoracic Society. 2008;5(2):274-82.

34. Katz ES, Mitchell RB, D'ambrosio CM. Obstructive sleep apnea in infants. American journal of respiratory and critical care medicine. 2012;185(8):805-16.

35. Cielo CM, Montalva FM, Taylor JA, editors. Craniofacial disorders associated with airway obstruction in the neonate. Seminars in Fetal and Neonatal Medicine; 2016: Elsevier.

36. Rosenzweig I, Williams SC, Morrell MJ. CrossTalk opposing view: the intermittent hypoxia attending severe obstructive sleep apnoea does not lead to alterations in brain structure and function. The Journal of physiology. 2013;591(2):383-5.

37. Beaudin AE, Waltz X, Hanly PJ, Poulin MJ. Impact of obstructive sleep apnoea and intermittent hypoxia on cardiovascular and cerebrovascular regulation. Experimental Physiology. 2017.

38. Chen C, Ho C, Chen C, Yu C. Nocturnal Desaturation is Associated With Atrial Fibrillation in Patients With Ischemic Stroke and Obstructive Sleep Apnea. Journal of clinical sleep medicine: JCSM: official publication of the American Academy of Sleep Medicine. 2017;13(5):729.

39. Menon D, Sukumaran S, Varma R, Radhakrishnan A. Impact of obstructive sleep apnea on neurological recovery after ischemic stroke: A prospective study. Acta Neurologica Scandinavica. 2017.

40. Emamian F, Khazaie H, Tahmasian M, Leschziner GD, Morrell MJ, Hsiung G-YR, et al. The association between obstructive sleep apnea and Alzheimer's disease: a meta-analysis perspective. Frontiers in aging neuroscience. 2016;8.

41. Tkacova R, McNicholas WT, Javorsky M, Fietze I, Sliwinski P, Parati G, et al. Nocturnal intermittent hypoxia predicts prevalent hypertension in the European Sleep Apnoea Database cohort study. European Respiratory Journal. 2014;44(4):931-41.

42. Daulatzai MA. Death by a thousand cuts in Alzheimer's disease: hypoxia—the prodrome. Neurotoxicity research. 2013;24(2):216-43.

43. Ju Y-ES, Lucey BP, Holtzman DM. Sleep and Alzheimer disease pathology [mdash] a bidirectional relationship. Nature reviews Neurology. 2014;10(2):115-9.

44. Kang J-E, Lim MM, Bateman RJ, Lee JJ, Smyth LP, Cirrito JR, et al. Amyloid-β dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle. Science. 2009;326(5955):1005-7.

45. Mander BA, Winer JR, Jagust WJ, Walker MP. Sleep: a novel mechanistic pathway, biomarker, and treatment target in the pathology of Alzheimer's disease? Trends in Neurosciences. 2016;39(8):552-66.

46. Xanthos DN, Sandkühler J. Neurogenic neuroinflammation: inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. Nature Reviews Neuroscience. 2014;15(1):43-53.

47. Cedernaes J, Osorio RS, Varga AW, Kam K, Schiöth HB, Benedict C. Candidate mechanisms underlying the association between sleep-wake disruptions and Alzheimer's disease. Sleep medicine reviews. 2017;31:102-11.

48. Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. The Lancet Neurology. 2015;14(4):388-405.

49. Bernardi G, Cecchetti L, Siclari F, Buchmann A, Yu X, Handjaras G, et al. Sleep reverts changes in human gray and white matter caused by wake-dependent training. NeuroImage. 2016;129:367-77.

50. Carvalho DZ, Gerhardt GJ, Dellagustin G, Emerson L, Lemke N, Segal AZ, et al. Loss of sleep spindle frequency deceleration in obstructive sleep apnea. Clinical Neurophysiology. 2014;125(2):306-12.

51. Ancoli-Israel S, Palmer BW, Cooke JR, Corey-Bloom J, Fiorentino L, Natarajan L, et al. Cognitive effects of treating obstructive sleep apnea in Alzheimer's disease: a randomized controlled study. Journal of the American Geriatrics Society. 2008;56(11):2076-81.

52. Barnes M, Houston D, Worsnop CJ, Neill AM, Mykytyn IJ, Kay A, et al. A randomized controlled trial of continuous positive airway pressure in mild obstructive

sleep apnea. American journal of respiratory and critical care medicine. 2002;165(6):773-80.

53. Barnes M, McEvoy RD, Banks S, Tarquinio N, Murray CG, Vowles N, et al. Efficacy of positive airway pressure and oral appliance in mild to moderate obstructive sleep apnea. American journal of respiratory and critical care medicine. 2004;170(6):656-64.

54. Kylstra WA, Aaronson JA, Hofman WF, Schmand BA. Neuropsychological functioning after CPAP treatment in obstructive sleep apnea: a meta-analysis. Sleep medicine reviews. 2013;17(5):341-7.

55. Marshall N, Neill A, Campbell A, Sheppard D. Randomised controlled crossover trial of humidified continuous positive airway pressure in mild obstructive sleep apnoea. Thorax. 2005;60(5):427-32.

56. Monasterio C, Vidal S, Duran J, Ferrer M, Carmona C, Barbe F, et al. Effectiveness of continuous positive airway pressure in mild sleep apnea–hypopnea syndrome. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2001;164(6):939-43.

57. Pelletier-Fleury N, Meslier N, Gagnadoux F, Person C, Rakotonanahary D, Ouksel H, et al. Economic arguments for the immediate management of moderate-to-severe obstructive sleep apnoea syndrome. European Respiratory Journal. 2004;23(1):53-60.

58. Lee I-S, Bardwell WA, Kamat R, Tomfohr L, Heaton RK, Ancoli-Israel S, et al. A model for studying neuropsychological effects of sleep intervention: the effect of three-week continuous positive airway pressure treatment. Drug Discovery Today: Disease Models. 2012;8(4):147-54.

59. Kushida CA, Nichols DA, Holmes TH, Quan SF, Walsh JK, Gottlieb DJ, et al. Effects of continuous positive airway pressure on neurocognitive function in obstructive sleep apnea patients: the Apnea Positive Pressure Long-term Efficacy Study (APPLES). Sleep. 2012;35(12):1593-602.

60. Gagnon K, Baril A-A, Gagnon J-F, Fortin M, Decary A, Lafond C, et al. Cognitive impairment in obstructive sleep apnea. Pathologie Biologie. 2014;62(5):233-40.

61. Engleman H, Joffe D. Neuropsychological function in obstructive sleep apnoea. Sleep Medicine Reviews. 1999;3(1):59-78.

62. Canessa N, Castronovo V, Cappa SF, Aloia MS, Marelli S, Falini A, et al. Obstructive sleep apnea: brain structural changes and neurocognitive function before and after treatment. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2011;183(10):1419-26.

63. Lojander J, Kajaste S, Maasilta P, Partinen M. Cognitive function and treatment of obstructive sleep apnea syndrome. Journal of sleep research. 1999;8(1):71-6.

64. Gozal D. CrossTalk proposal: the intermittent hypoxia attending severe obstructive sleep apnoea does lead to alterations in brain structure and function. The Journal of physiology. 2013;591(2):379-81.

65. Lau EYY, Eskes GA, Morrison DL, Rajda M, Spurr KF. Executive function in patients with obstructive sleep apnea treated with continuous positive airway pressure. Journal of the International Neuropsychological Society. 2010;16(06):1077-88.

66. Bucks RS, Olaithe M, Eastwood P. Neurocognitive function in obstructive sleep apnoea: A meta-review. Respirology. 2013;18(1):61-70.

67. Beebe DW, Gozal D. Obstructive sleep apnea and the prefrontal cortex: towards a comprehensive model linking nocturnal upper airway obstruction to daytime cognitive and behavioral deficits. Journal of sleep research. 2002;11(1):1-16.

68. Tononi G, Cirelli C. Sleep and the price of plasticity: from synaptic and cellular homeostasis to memory consolidation and integration. Neuron. 2014;81(1):12-34.

69. Rosenzweig I, Glasser M, Crum WR, Kempton MJ, Milosevic M, McMillan A, et al. Changes in neurocognitive architecture in patients with obstructive sleep apnea treated with continuous positive airway pressure. EBioMedicine. 2016;7:221-9.

70. Rosenzweig I, Kempton MJ, Crum WR, Glasser M, Milosevic M, Beniczky S, et al. Hippocampal hypertrophy and sleep apnea: a role for the ischemic preconditioning? PloS one. 2013;8(12):e83173.

71. Chuah L, Chee M. Functional neuroimaging of sleep deprived healthy volunteers and persons with sleep disorders: a brief review. Ann Acad Med Singapore. 2008;37(8):689-94.

72. Twigg GL, Papaioannou I, Jackson M, Ghiassi R, Shaikh Z, Jaye J, et al. Obstructive sleep apnea syndrome is associated with deficits in verbal but not visual memory. American journal of respiratory and critical care medicine. 2010;182(1):98-103.

73. Baril A-A, Gagnon K, Gagnon J-F, Montplaisir J, Gosselin N. Association between waking electroencephalography and cognitive event-related potentials in patients with obstructive sleep apnea. Sleep medicine. 2013;14(7):685-7.

74. Morisson F, Décary A, Petit D, Lavigne G, Malo J, Montplaisir J. Daytime sleepiness and EEG spectral analysis in apneic patients before and after treatment with continuous positive airway pressure. CHEST Journal. 2001;119(1):45-52.

75. Morisson F, Lavigne G, Petit D, Nielsen T, Malo J, Montplaisir J. Spectral analysis of wakefulness and REM sleep EEG in patients with sleep apnoea syndrome. European Respiratory Journal. 1998;11(5):1135-40.

76. Schoenwald SV, Carvalho DZ, de Santa-Helena EL, Lemke N, Gerhardt GJ. Topography-specific spindle frequency changes in obstructive sleep apnea. BMC neuroscience. 2012;13(1):89.

77. Macey PM, Henderson LA, Macey KE, Alger JR, Frysinger RC, Woo MA, et al. Brain morphology associated with obstructive sleep apnea. American journal of respiratory and critical care medicine. 2002;166(10):1382-7.

78. Morrell M, Jackson M, Twigg G, Ghiassi R, McRobbie D, Quest R, et al. Changes in brain morphology in patients with obstructive sleep apnoea. Thorax. 2010;65(10):908-14.

79. Morrell MJ, McRobbie DW, Quest RA, Cummin AR, Ghiassi R, Corfield DR. Changes in brain morphology associated with obstructive sleep apnea. Sleep medicine. 2003;4(5):451-4.

80. Yaouhi K, Bertran F, Clochon P, Mézenge F, Denise P, Foret J, et al. A combined neuropsychological and brain imaging study of obstructive sleep apnea. Journal of sleep research. 2009;18(1):36-48.

81. Gozal D, Row BW, Gozal E, Kheirandish L, Neville JJ, Brittian KR, et al. Temporal aspects of spatial task performance during intermittent hypoxia in the rat: evidence for neurogenesis. European Journal of Neuroscience. 2003;18(8):2335-42.

82. O'Donoghue FJ, Wellard RM, Rochford PD, Dawson A, Barnes M, Ruehland WR, et al. Magnetic resonance spectroscopy and neurocognitive dysfunction in obstructive sleep apnea before and after CPAP treatment. Sleep. 2012;35(1):41-8.

83. Alkan A, Sharifov R, Akkoyunlu ME, Kiliçarslan R, Toprak H, Aralasmak A, et al. MR spectroscopy features of brain in patients with mild and severe obstructive sleep apnea syndrome. Clinical imaging. 2013;37(6):989-92.

84. McMillan A, Bratton DJ, Faria R, Laskawiec-Szkonter M, Griffin S, Davies RJ, et al. Continuous positive airway pressure in older people with obstructive sleep apnoea syndrome (PREDICT): a 12-month, multicentre, randomised trial. The Lancet Respiratory Medicine. 2014;2(10):804-12.

85. Engleman HM, Martin SE, Kingshott RN, Mackay TW, Deary IJ, Douglas NJ. Randomised placebo controlled trial of daytime function after continuous positive airway pressure (CPAP) therapy for the sleep apnoea/hypopnoea syndrome. Thorax. 1998;53(5):341-5.

86. Engleman HM, Martin SE, Deary IJ, Douglas NJ. Effect of CPAP therapy on daytime function in patients with mild sleep apnoea/hypopnoea syndrome. Thorax. 1997;52(2):114-9.

87. Castronovo V, Scifo P, Castellano A, Aloia MS, Iadanza A, Marelli S, et al. White matter integrity in obstructive sleep apnea before and after treatment. Sleep. 2014;37(9):1465.

88. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. Science. 2010;330(6005):841-5.

89. Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T. Origin and differentiation of microglia. Frontiers in cellular neuroscience. 2013;7.

90. Jacobs AH, Tavitian B. Noninvasive molecular imaging of neuroinflammation. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 2012;32(7):1393-415.

91. Olah M, Biber K, Vinet J, Wgm Boddeke H. Microglia phenotype diversity. CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders). 2011;10(1):108-18.

92. Czeh M, Gressens P, Kaindl AM. The yin and yang of microglia. Developmental neuroscience. 2011;33(3-4):199-209.

93. Bohacek I, Cordeau P, Lalancette–Hébert M, Gorup D, Weng Y-C, Gajovic S, et al. Toll-like receptor 2 deficiency leads to delayed exacerbation of ischemic injury. Journal of neuroinflammation. 2012;9(1):191.

94. Graeber MB, Li W, Rodriguez ML. Role of microglia in CNS inflammation. FEBS letters. 2011;585(23):3798-805.

95. Xu W, Chi L, Row B, Xu R, Ke Y, Xu B, et al. Increased oxidative stress is associated with chronic intermittent hypoxia-mediated brain cortical neuronal cell apoptosis in a mouse model of sleep apnea. Neuroscience. 2004;126(2):313-23.

96. Nair D, Dayyat EA, Zhang SX, Wang Y, Gozal D. Intermittent hypoxia-induced cognitive deficits are mediated by NADPH oxidase activity in a murine model of sleep apnea. PLoS One. 2011;6(5):e19847.

97. Li RC, Row BW, Gozal E, Kheirandish L, Fan Q, Brittian KR, et al. Cyclooxygenase 2 and intermittent hypoxia-induced spatial deficits in the rat. American journal of respiratory and critical care medicine. 2003;168(4):469-75.

98. Wohleb ES. Neuron–Microglia Interactions in Mental Health Disorders:"For Better, and For Worse". Frontiers in Immunology. 2016;7.

99. del Río-Hortega P. El Tercer elemento de los centros nerviosos: histogénesis y evolución normal: éxodo y distribución regional de microglía: Junta para Ampliación de Estudios e Investigaciones Científicas; 1921.

100. Raivich G. Like cops on the beat: the active role of resting microglia. Trends in neurosciences. 2005;28(11):571-3.

101. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science. 2005;308(5726):1314-8.

102. Michelucci A, Heurtaux T, Grandbarbe L, Morga E, Heuschling P. Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: effects of oligomeric and fibrillar amyloid-β. Journal of neuroimmunology. 2009;210(1):3-12.

103. Hanisch U-K, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nature neuroscience. 2007;10(11):1387-94.

104. Verkhratsky A, Parpura V, Pekna M, Pekny M, Sofroniew M. Glia in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. Portland Press Limited; 2014.

105. DeWitt DA, Perry G, Cohen M, Doller C, Silver J. Astrocytes regulate microglial phagocytosis of senile plaque cores of Alzheimer's disease. Experimental neurology. 1998;149(2):329-40.

106. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β. Science translational medicine. 2012;4(147):147ra11-ra11.

107. Sherpa AD, Hrabetova S. Astrocytes and diffusive spread of substances in brain extracellular space.

108. Sherpa AD, van de Nes P, Xiao F, Weedon J, Hrabetova S. Gliotoxin-induced swelling of astrocytes hinders diffusion in brain extracellular space via formation of dead-space microdomains. Glia. 2014;62(7):1053-65.

109. Okun E, Griffioen KJ, Lathia JD, Tang S-C, Mattson MP, Arumugam TV. Toll-like receptors in neurodegeneration. Brain research reviews. 2009;59(2):278-92.

110. Okun E, Griffioen KJ, Mattson MP. Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease. Trends in neurosciences. 2011;34(5):269-81.

111. Anderson KV, Jürgens G, Nüsslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. Cell. 1985;42(3):779-89.

112. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J-M, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell. 1996;86(6):973-83.

113. Leulier F, Lemaitre B. Toll-like receptors—taking an evolutionary approach. Nature Reviews Genetics. 2008;9(3):165-78.

114. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. Journal of leukocyte biology. 2007;81(1):1-5.

115. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. Annual review of immunology. 2003;21(1):335-76.

116. Hayward JH, Lee SJ. A decade of research on TLR2 discovering its pivotal role in glial activation and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. Experimental neurobiology. 2014;23(2):138-47.

117. Sabroe I, Parker L, Dower S, Whyte M. The role of TLR activation in inflammation. The Journal of pathology. 2008;214(2):126-35.

118. Marsh BJ, Williams-Karnesky RL, Stenzel-Poore MP. Toll-like receptor signaling in endogenous neuroprotection and stroke. Neuroscience. 2009;158(3):1007-20.

119. Godfroy III JI, Roostan M, Moroz YS, Korendovych IV, Yin H. Isolated Toll-like receptor transmembrane domains are capable of oligomerization. PloS one. 2012;7(11):e48875.

120. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. Nature Reviews Immunology. 2007;7(5):353-64.

121. Hopkins P, Sriskandan S. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. Clinical & Experimental Immunology. 2005;140(3):395-407.

122. Winters L, Winters T, Gorup D, Mitrečić D, Ćurlin M, Križ J, et al. Expression analysis of genes involved in TLR2-related signaling pathway: inflammation and apoptosis after ischemic brain injury. Neuroscience. 2013;238:87-96.

123. Daniele SG, Béraud D, Davenport C, Cheng K, Yin H, Maguire-Zeiss KA. Activation of MyD88-dependent TLR1/2 signaling by misfolded α-synuclein, a protein linked to neurodegenerative disorders. Science signaling. 2015;8(376):ra45.

124. Drouin-Ouellet J, St-Amour I, Saint-Pierre M, Lamontagne-Proulx J, Kriz J, Barker RA, et al. Toll-like receptor expression in the blood and brain of patients and a mouse model of Parkinson's disease. International Journal of Neuropsychopharmacology. 2015;18(6):pyu103.

125. Richard KL, Filali M, Préfontaine P, Rivest S. Toll-like receptor 2 acts as a natural innate immune receptor to clear amyloid β1–42 and delay the cognitive decline in a mouse model of Alzheimer's disease. Journal of Neuroscience. 2008;28(22):5784-93.

126. Reed-Geaghan EG, Savage JC, Hise AG, Landreth GE. CD14 and toll-like receptors 2 and 4 are required for fibrillar Aβ-stimulated microglial activation. Journal of Neuroscience. 2009;29(38):11982-92.

127. Zhang W, Wang L-Z, Yu J-T, Chi Z-F, Tan L. Increased expressions of TLR2 and TLR4 on peripheral blood mononuclear cells from patients with Alzheimer's disease. Journal of the neurological sciences. 2012;315(1):67-71.

128. Smith SM, Friedle SA, Watters JJ. Chronic intermittent hypoxia exerts CNS region-specific effects on rat microglial inflammatory and TLR4 gene expression. PloS one. 2013;8(12):e81584.

129. Brennick MJ, Pack AI, Ko K, Kim E, Pickup S, Maislin G, et al. Altered upper airway and soft tissue structures in the New Zealand Obese mouse. American journal of respiratory and critical care medicine. 2009;179(2):158-69.

130. Carley DW, Berecek K, Videnovic A, Radulovacki M. Sleep-disordered respiration in phenotypically normotensive, genetically hypertensive rats. American journal of respiratory and critical care medicine. 2000;162(4):1474-9.

131. Davis EM, O'Donnell CP. Rodent models of sleep apnea. Respiratory physiology & neurobiology. 2013;188(3):355-61.

132. Almendros I, Carreras A, Montserrat JM, Gozal D, Navajas D, Farre R. Potential role of adult stem cells in obstructive sleep apnea. Frontiers in neurology. 2012;3:112.

133. Salejee I, Tarasiuk A, Reder I, Scharf SM. Chrol1ic Upper Airway Obstrudion Produces Right but Not Left Ventricular Hypertrophy in Rats. Am Rev Respir Dis. 1993;148:1346-50.

134. Gozal D, Daniel JM, Dohanich GP. Behavioral and anatomical correlates of chronic episodic hypoxia during sleep in the rat. Journal of Neuroscience. 2001;21(7):2442-50.

135. Tagaito Y, Polotsky V, Campen M, Wilson J, Balbir A, Smith P, et al. A model of sleep-disordered breathing in the C57BL/6J mouse. Journal of applied physiology. 2001;91(6):2758-66.

136. Jackman KA, Zhou P, Faraco G, Peixoto PM, Coleman C, Voss HU, et al. Dichotomous effects of chronic intermittent hypoxia on focal cerebral ischemic injury. Stroke. 2014;45(5):1460-7.

137. Lavie L. Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia–revisited–the bad ugly and good: implications to the heart and brain. Sleep medicine reviews. 2015;20:27-45.

138. Gozal E, Gozal D, Pierce WM, Thongboonkerd V, Scherzer JA, R Sachleben L, et al. Proteomic analysis of CA1 and CA3 regions of rat hippocampus and differential susceptibility to intermittent hypoxia. Journal of neurochemistry. 2002;83(2):331-45.

139. Okun E, Griffioen KJ, Rothman S, Wan R, Cong W-N, De Cabo R, et al. Toll-like receptors 2 and 4 modulate autonomic control of heart rate and energy metabolism. Brain, behavior, and immunity. 2014;36:90-100.

140. Satriotomo I, Nichols N, Dale E, Emery A, Dahlberg J, Mitchell G. Repetitive acute intermittent hypoxia increases growth/neurotrophic factor expression in non-respiratory motor neurons. Neuroscience. 2016;322:479-88.

141. Kiernan EA, Smith S, Mitchell GS, Watters JJ. Mechanisms of microglial activation in models of inflammation and hypoxia: Implications for chronic intermittent hypoxia. The Journal of physiology. 2016;594(6):1563-77.

142. Adamczak J, Hoehn M. In vivo imaging of cell transplants in experimental ischemia. Progress in brain research. 2011;201:55-78.

143. Gorup D, Bohaček I, Miličević T, Pochet R, Mitrečić D, Križ J, et al. Increased expression and colocalization of GAP43 and CASP3 after brain ischemic lesion in mouse. Neuroscience letters. 2015;597:176-82.

144. Cordeau P, Kriz J. 7 Real-Time Imaging After Cerebral Ischemia: Model Systems for Visualization of Inflammation and Neuronal Repair. Methods in enzymology. 2012;506:117.

145. Tannous BA. Gaussia luciferase reporter assay for monitoring biological processes in culture and in vivo. Nature protocols. 2009;4(4):582-91.

146. Tennstaedt A, Aswendt M, Adamczak J, Hoehn M. Noninvasive multimodal imaging of stem cell transplants in the brain using bioluminescence imaging and magnetic resonance imaging. Imaging and Tracking Stem Cells: Methods and Protocols. 2013:153-66.

147. Lalancette-Hebert M, Phaneuf D, Soucy G, Weng Y, 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;132(4):940-54.

148. Aswendt M, Adamczak J, Couillard-Despres S, Hoehn M. Boosting bioluminescence neuroimaging: an optimized protocol for brain studies. PloS one. 2013;8(2):e55662.

149. Deoni SC. Transverse relaxation time (T2) mapping in the brain with off-resonance correction using phase-cycled steady-state free precession imaging. Journal of Magnetic Resonance Imaging. 2009;30(2):411-7.

150. Wood TC, Simmons C, Hurley SA, Vernon AC, Torres J, Dell'Acqua F, et al. Whole-brain ex-vivo quantitative MRI of the cuprizone mouse. PeerJ Preprints. 2016;4:e2323v1.

151. Wood TC. Improved formulas for the two optimum VFA flip-angles. Magnetic resonance in medicine. 2015;74(1):1-3.

152. Yarnykh VL. Actual flip-angle imaging in the pulsed steady state: a method for rapid three-dimensional mapping of the transmitted radiofrequency field. Magnetic resonance in Medicine. 2007;57(1):192-200.

153. Yarnykh VL. Optimal radiofrequency and gradient spoiling for improved accuracy of T1 and B1 measurements using fast steady-state techniques. Magnetic resonance in medicine. 2010;63(6):1610-26.

154. Jenkinson M, Beckmann CF, Behrens TE, Woolrich MW, Smith SM. Fsl. Neuroimage. 2012;62(2):782-90.

155. Avants BB, Tustison NJ, Song G, Cook PA, Klein A, Gee JC. A reproducible evaluation of ANTs similarity metric performance in brain image registration. Neuroimage. 2011;54(3):2033-44.

156. Dorr A, Lerch JP, Spring S, Kabani N, Henkelman RM. High resolution three-dimensional brain atlas using an average magnetic resonance image of 40 adult C57Bl/6J mice. Neuroimage. 2008;42(1):60-9.

157. Smith SM, Nichols TE. Threshold-free cluster enhancement: addressing problems of smoothing, threshold dependence and localisation in cluster inference. Neuroimage. 2009;44(1):83-98.

158. Winkler AM, Ridgway GR, Webster MA, Smith SM, Nichols TE. Permutation inference for the general linear model. Neuroimage. 2014;92:381-97.

159. Allen EA, Erhardt EB, Calhoun VD. Data visualization in the neurosciences: overcoming the curse of dimensionality. Neuron. 2012;74(4):603-8.

160. Tschanz SA, Burri PH, Weibel ER. A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. Journal of microscopy. 2011;243(1):47-59.

161. Goldbart A, Row B, Kheirandish L, Schurr A, Gozal E, Guo S, et al. Intermittent hypoxic exposure during light phase induces changes in cAMP response element binding protein activity in the rat CA1 hippocampal region: water maze performance correlates. Neuroscience. 2003;122(3):585-90.

162. Phillips SA, Olson E, Lombard JH, Morgan BJ. Chronic intermittent hypoxia alters NE reactivity and mechanics of skeletal muscle resistance arteries. Journal of Applied Physiology. 2006;100(4):1117-23.

163. Greenberg HE, Sica A, Batson D, Scharf SM. Chronic intermittent hypoxia increases sympathetic responsiveness to hypoxia and hypercapnia. Journal of Applied Physiology. 1999;86(1):298-305.

164. Fletcher EC, Lesske J, Qian W, Miller CC, Unger T. Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats. Hypertension. 1992;19(6 Pt 1):555-61.

165. Lefebvre B, Godin-Ribuot D, Joyeux-Faure M, Caron F, Bessard G, Lévy P, et al. Functional assessment of vascular reactivity after chronic intermittent hypoxia in the rat. Respiratory physiology & neurobiology. 2006;150(2):278-86.

166. Li C, Lu J, Zhang B. Development of a novel chronic intermittent hypoxia chamber. Sleep and Breathing. 2012;16(1):177-9.

167. Aubrecht TG, Weil ZM, Magalang UJ, Nelson RJ. Dim light at night interacts with intermittent hypoxia to alter cognitive and affective responses. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2013;305(1):R78-R86.

168. Kreisman NR, Soliman S, Gozal D. Regional differences in hypoxic depolarization and swelling in hippocampal slices. Journal of neurophysiology. 2000;83(2):1031-8.

169. Pan Y-Y, Deng Y, Xie S, Wang Z-H, Wang Y, Ren J, et al. Altered Wnt signaling pathway in cognitive impairment caused by chronic intermittent hypoxia: focus on glycogen synthase kinase-3β and β-catenin. Chinese medical journal. 2016;129(7):838.

170. Pedroso D, Nunes AR, Diogo LN, Oudot C, Monteiro EC, Brenner C, et al. Hippocampal neurogenesis response: What can we expect from two different models of hypertension? Brain research. 2016;1646:199-206.

171. Schmidt-Kastner R, Freund T. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. Neuroscience. 1991;40(3):599-636.

172. Singh P, Peng W, Zhang Q, Ding X, Suo WZ. GRK5 deficiency leads to susceptibility to intermittent hypoxia-induced cognitive impairment. Behavioural brain research. 2016;302:29-34.

173. Park SJ, Lee JY, Kim SJ, Choi S-Y, Yune TY, Ryu JH. Toll-like receptor-2 deficiency induces schizophrenia-like behaviors in mice. Scientific reports. 2015;5:8502.

174. Vollmar P, Kullmann JS, Thilo B, Claussen MC, Rothhammer V, Jacobi H, et al. Active immunization with amyloid-β 1–42 impairs memory performance through TLR2/4-dependent activation of the innate immune system. The Journal of Immunology. 2010;185(10):6338-47.

175. Malisch JL, Breuner CW, Kolb EM, Wada H, Hannon RM, Chappell MA, et al. Behavioral despair and home-cage activity in mice with chronically elevated baseline corticosterone concentrations. Behavior genetics. 2009;39(2):192-201.

176. KUBO Y, Yanagawa Y, Matsumoto M, Hiraide S, Togashi H. Enhanced depressive-like behaviors after Toll-like receptor 7 stimulation in mice. Nihon shinkei seishin yakurigaku zasshi= Japanese journal of psychopharmacology. 2013;33(2):41-7.

177. Corona AW, Huang Y, O'Connor JC, Dantzer R, Kelley KW, Popovich PG, et al. Fractalkine receptor (CX 3 CR1) deficiency sensitizes mice to the behavioral changes induced by lipopolysaccharide. Journal of neuroinflammation. 2010;7(1):93.

178. Sapin E, Peyron C, Roche F, Gay N, Carcenac C, Savasta M, et al. Chronic intermittent hypoxia induces chronic low-grade neuroinflammation in the dorsal hippocampus of mice. Sleep. 2015;38(10):1537.

179. Aviles-Reyes RX, Angelo MF, Villarreal A, Rios H, Lazarowski A, Ramos AJ. Intermittent hypoxia during sleep induces reactive gliosis and limited neuronal death in rats: implications for sleep apnea. Journal of neurochemistry. 2010;112(4):854-69.

180. Zhu L-l, Zhao T, Li H-s, Zhao H, Wu L-y, Ding A-s, et al. Neurogenesis in the adult rat brain after intermittent hypoxia. Brain research. 2005;1055(1):1-6.

181. Cruz FC, Koya E, Guez-Barber DH, Bossert JM, Lupica CR, Shaham Y, et al. New technologies for examining the role of neuronal ensembles in drug addiction and fear. Nature Reviews Neuroscience. 2013;14(11):743-54.

182. Mukai T, Nagao Y, Nishioka S, Hayashi T, Shimizu S, Ono A, et al. Preferential suppression of limbic Fos expression by intermittent hypoxia in obese diabetic mice. Neuroscience research. 2013;77(4):202-7.

183. Tononi G, Sporns O, Edelman GM. A measure for brain complexity: relating functional segregation and integration in the nervous system. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1994;91(11):5033-7.

184. Tahmasian M, Rosenzweig I, Eickhoff SB, Sepehry AA, Laird AR, Fox PT, et al. Structural and functional neural adaptations in obstructive sleep apnea: An activation likelihood estimation meta-analysis. Neuroscience & biobehavioral reviews. 2016;65:142-56.

185. Dirnagl U, Becker K, Meisel A. Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use. The Lancet Neurology. 2009;8(4):398-412.

186. Brevoord D, Kranke P, Kuijpers M, Weber N, Hollmann M, Preckel B. Remote ischemic conditioning to protect against ischemia-reperfusion injury: a systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2012;7(7):e42179.

187. Row BW, Liu R, Xu W, Kheirandish L, Gozal D. Intermittent hypoxia is associated with oxidative stress and spatial learning deficits in the rat. American journal of respiratory and critical care medicine. 2003;167(11):1548-53.

188. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn A-M, Nordborg C, Peterson DA, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. Nature medicine. 1998;4(11):1313-7.

189. Ernst A, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Perl S, Tisdale J, et al. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. Cell. 2014;156(5):1072-83.

190. Tsai Y-W, Yang Y-R, Wang PS, Wang R-Y. Intermittent hypoxia after transient focal ischemia induces hippocampal neurogenesis and c-Fos expression and reverses spatial memory deficits in rats. PLoS One. 2011;6(8):e24001.

191. Tsai Y-W, Yang Y-R, Sun SH, Liang K-C, Wang R-Y. Post ischemia intermittent hypoxia induces hippocampal neurogenesis and synaptic alterations and alleviates long-term memory impairment. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 2013;33(5):764-73.

192. Zhang SX, Wang Y, Gozal D. Pathological consequences of intermittent hypoxia in the central nervous system. Comprehensive Physiology. 2012.

193. Rolls A, Shechter R, London A, Ziv Y, Ronen A, Levy R, et al. Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. Nature cell biology. 2007;9(9):1081-8.

194. Lundblad LC, Fatouleh RH, Hammam E, McKenzie DK, Macefield VG, Henderson LA. Brainstem changes associated with increased muscle sympathetic drive in obstructive sleep apnoea. Neuroimage. 2014;103:258-66.

195. Lundblad LC, Fatouleh RH, McKenzie DK, Macefield VG, Henderson LA. Brain stem activity changes associated with restored sympathetic drive following CPAP treatment in OSA subjects: a longitudinal investigation. Journal of neurophysiology. 2015;114(2):893-901.

11 ŽIVOTOPIS

Glavne kvlifikacije:

Doktorica medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, *2012*.

Trenutne pozicije:

Doktorandica postdiplomskog studija Neuroznanost, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, *2013-danas.*

Asistentica u nastavi na Katedri za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, *2013- danas.*

Druge kvalifikacije:

Licencirana članica Hrvatske Liječničke Komore (reg br.19848), *2014*.

Internacionalna dozvola za rukovanje laboratorijskim životinjama (dozvola br. 75.3-13, HR 191/02/P), *2013*.

TOEFL (score 116/120), *2014*.

Diplome d'études en langue Francaise (DELF B2), *2006*.

Diploma muzičke škole Elly Bašić, *2002*.

Radno iskustvo i stručno usavršavanje:

Odsjek za Neurooslikavanje, Institut za psihologiju, psihijatriju i neuroznanost, King's College London , *2015, 2016*.

Urednica časopisa Croatian Medical Journal, 2012-2015.

FP7 project GlowBrain; Semmelweis Institute, University of Budapest, *2013, 2014*.

Stažistica-pripravnica u Psihijatrijskoj bolnici Vrapče, Zagreb, *2012-2013*.

Erasmus stipendija, Université Montpellier 1 and CHU Nîmes, *2010-2011*.

British Council Scholarship, Loretto School, Edinburgh, *2003*.

Klinički i istraživački interesi:

Neuroimaging, neuroinflamacija, opstruktivna apneja spavanja, terapije matičnim stanicama, moždani udar.

Važnije nagrade:

Nagrada za najbolji poster pod naslovom „TLR2 is involved in the acute reaction to intermittent hypoxia" na konferenciji British Sleep Society, *2015.*

Nagrada za mladog istraživača (Young investigator award) na 9. ISABS konferenciji za forenzičku i antropološku genetiku, Bol, Brač, *2015.*

Stipendija Grada Zagreba, *2008-2012*.

Dekanova nagrada za najboljeg studenta godine, *2007/2008*.

Državna stipendija, *2006-2008*.

Publikacije:

1. Polšek D, Bago M, Živaljić M, Rosenzweig I, Lacza Z, Gajović S. A novel adjustable automated system for inducing chronic intermittent hypoxia in mice. PloS one. 2017 Mar 31;12(3):e0174896.

2. Rosenzweig I, Glasser M, Polsek D, Leschziner GD, Williams SC, Morrell MJ. Sleep apnoea and the brain: a complex relationship. The Lancet Respiratory Medicine. 2015 May 31;3(5):404-14.

3. Lo A, Polšek D, Sidhu S. Estimating the burden of neural tube defects in low–and middle–income countries. Journal of global health. 2014 Jun;4(1).

4. Barić H, Polšek D, Andrijašević L, Gajović S. Open access-is this the future of medical publishing?. Croatian medical journal. 2013;54(4):315-8.

5. Polšek D, Jagatic T, Cepanec M, Hof PR, Šimić G. Recent developments in neuropathology of autism spectrum disorders. Translational neuroscience. 2011 Sep 1;2(3):256-64.