

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

Gorup, Dunja

Doctoral thesis / Disertacija

2016

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

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

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Dunja Gorup

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

DISERTACIJA



Zagreb, 2016.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Dunja Gorup

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

DISERTACIJA

Zagreb, 2016.

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

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

Voditelj rada: prof. dr. sc. Srećko Gajović

Suvoditeljica rada: prof. dr. sc. Jasna Križ

Zahvaljujem svojim voditeljima,

*prof. dr. sc. Jasni Križ i prof. dr. sc. Srećku Gajoviću
na izlasku ususret, potpori i pomoći tijekom izrade ovog doktorata,
ali i oblikovanju i usmjeravanju mog pristupa znanosti.
Svojim su primjerom strpljivo i mudro ukazali
na temeljne odrednice kvalitetnog istraživanja,
te je sama izrada doktorata u njihovim laboratorijima bila privilegija koja
poziva da se mladi znanstvenik na njih ugleda i u svom daljnjem radu.*

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

*Hvala kolegici Ladi Brkić Ahmed na motivaciji i lektoriranju radnih verzija
disertacije te svim suradnicima na njihovoj bezrezervnoj pomoći i
profesionalnosti.*

Zahvaljujem svojoj obitelji na podršci i razumijevanju.

SADRŽAJ

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

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

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

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

10.	POPIS LITERATURE	136
11.	ŽIVOTOPIS.....	144

POPIS OZNAKA I KRATICA

Kratika	Engleski	Hrvatski
ACA	<i>anterior cerebral artery</i>	prednja moždana arterija
AcGFP	<i>Aequorea coerulescens green fluorescent protein</i>	zeleni fluorescentni protein iz akvoreje
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>	Ű-amino-3-hidroksi-5-metilizoksazol-4-propionska kiselina
APCs	<i>antigen presenting cells</i>	stanice koje predol'uju antigen
Arc	<i>activity regulated cytoskeletal-associated protein</i>	citoskeletna bjelančevina regulirana aktivnošću
ATF-3	<i>activation transcription factor</i>	čimbenik aktivacije transkripcije
ATP	<i>adenosine triphosphate</i>	adenozin trifosfat
BBB	<i>blood brain barrier</i>	krvnomoždana barijera
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>	neurotropni čimbenik iz mozga
CAD	<i>caspase-activated DNase</i>	kaspazom aktivirana DNA-za
CASP3	<i>caspase-3</i>	kaspaza-3
CCA	<i>common carotid artery</i>	zajednička karotidna arterija
CCD	<i>charge coupled device</i>	nabojem spregnuti sklop
CFC	<i>contextual fear conditioning</i>	kontekstualno kondicioniranje straha
CNS	<i>central nervous system</i>	središnji živčani sustav
DALY	<i>disability adjusted life years</i>	godine života s onesposobljenošću
DAMP	<i>danger/damage associated molecular patterns</i>	molekularni uzorci povezani s općenom
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	deoksiribonukleinska kiselina
ECA	<i>external carotid artery</i>	vanjska karotidna arterija
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i>	bjelančevina s domenom za usmrćivanje povezana s Fas-om
Fluc	<i>firefly luciferase</i>	luciferaza krijesnice
GABA	<i>gamma-aminobutyric acid</i>	gama-amino-maslačna kiselina
GAP43	<i>growth-associated protein-43</i>	bjelančevina povezana s rastom
GDNF	<i>glia derived neurotrophic factor</i>	neurotrofni čimbenik porijeklom iz stanica glije
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>	glijalna fibrilarna kiselina bjelančevina
GFP	<i>green fluorescent protein</i>	zeleni fluorescentni bjelančevina
HSPs	<i>heat shock proteins</i>	bjelančevina toplinskog šoka
ICA	<i>internal carotid artery</i>	unutarnja karotidna arterija
ICAD	<i>inhibitor of caspase-activated DNase</i>	inhibitor kaspazom aktivirane DNA-ze
IGF-1	<i>insulin-like growth factor-1</i>	čimbenik rasta nalik inzulinu -1
IKK	<i>IκB kinase complex</i>	kompleks kinaze IκB
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>	inducibilnu sintetazu dušičnog monoksida
IP (CI)	<i>confidence interval</i>	interval pouzdanosti
IRAK	<i>interleukin-1 receptor associated kinase</i>	kinaza povezana s receptorom za interleukin-1

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

TIRAP	<i>TIR adaptor protein</i>	adapterska bjelančevina za TIR
TLR	<i>Toll like teceptor</i>	receptor nalik na Toll
Tlr2-/-	<i>Tlr2 knock out mice</i>	miševi s onemogućenim <i>Tlr2</i> genom
tMCAO	<i>transient middle cerebral artery occlusion</i>	privremena okluzija središnje moždane arterije
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-α</i>	limbenik nekroze tumora- α
Tollip	<i>Toll interacting protein</i>	bjelančevina koja međudjeluje s Toll-om
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>	limbenik povezan s receptorom za TNF
TRAIL	<i>tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand</i>	ligand koji inducira apoptozu vezan uz limbenik nekroze tumora
TRAM	<i>Toll-receptor-associated molecule</i>	molekula povezana s Toll receptorom
TRIF	<i>Toll-receptor-associated activator of interferons</i>	aktivator interferona povezan s Toll receptorom
WHO	<i>World Health Organisation</i>	Svjetska zdravstvena organizacija
WT	<i>wild type mice</i>	miševi divljeg tipa

1. UVOD I SVRHA RADA

Moždani udar (apoplexia cerebri, apopleksija, CVI, cerebrovaskularni inzult, moždana kap, ģlag, ģlog) je, prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije (*engl. World Health Organization, WHO*) iz 1978. godine, naglo nastao ģariģni (fokalni), ili rjeģe globalni gubitak moģdanih funkcija s neuroloģkim simptomima koji traju duģe od 24 sata ili unutar 24 sata dovode do smrti, a moguģe ga je objasniti iskljuģivo poremeģajem moģdane cirkulacije, odnosno perfuzije (krvnog protoka) (1). Granica od 24 sata dijeli dijagnozu moģdanog udara u razvoju (24-28h) i zavrģenog moģdanog udara (nakon 48h) od tranzitorne ishemijske atake (TIA; kraģe od 24h) (2).

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

Poglavito poradi visoke prevalencije, kako u Hrvatskoj, tako i u svijetu, istraģivanja sekundarne prevencije i potencijalnih novih terapijskih pristupa zasluģuju veģu pozornost akademske zajednice. Ovaj doktorat objaģnjava ulogu dijela uroģene imunosti posredovane receptorom nalik na Toll-2 (*engl. Toll Like Receptor 2, TLR2*) u oporavku nakon ishemijskog oģteģenja mozga.

1.1. Istraģivanje moģdanog udara kao javnozdravstveni prioritet

Moģdani udar je meģu vodeģim uzrocima smrti u svijetu s mortalitetom od 6,7 milijuna godiģnje, a kao pojedinaģni uzrok smrti prethodi mu samo ishemijska bolest srca (7,4 milijuna godiģnje) (4). Primjerice, u SAD-u od moģdanog udara svake 3 minute umre jedna osoba (5), a svaka ģe ģesta osoba tijekom svog ģivota pretrpjeti bar jedan moģdani udar (6). Globalni podaci pokazuju kako je 2010. godine incidencija moģdanog udara iznosila 17 milijuna osoba, dok je ukupna prevalencija koja ukljuģuje i preģivjele s ranije pretrpjeljenim moģdanim udarom iznosila ģak 33 milijuna (7).

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

(dijagnostička skupina I60-69 prema 10. Međunarodnoj klasifikaciji bolesti: 7.300), slijede rak bronha i pluća (2.827) te zloćudna novotvorina debelog crijeva (2.094) (8).

Pri tom moždani udar čini veliku većinu unutar dijagnostičke skupine I60-69, u koju spadaju još i subarahnoidno, subduralno i epiduralno krvarenje, okluzije, stenoze i ostali rjeđi poremećaji krvnih žila mozga (3).

Smrtnost od kardiovaskularnih bolesti, pod koje se moždani udar registrira, u Europskoj uniji opada, no kako očekivano trajanje života raste i produljuje se očekivano preživljenje osoba s bolestima srca i krvnih žila, raste broj muškaraca i žena koje žive s navedenim bolestima. Naime, smrtnost nakon prvog nastupa moždanog udara iznosi oko 30% unutar prvih mjesec dana, dok kod 30% preživjelih nakon 6 mjeseci postoji trajno teško neurološko oštećenje (9).

Prema podacima iz 2007. godine, cerebrovaskularne bolesti nalazile su se među najčešćim uzrokom bolničkog liječenja u Hrvatskoj s ukupnim brojem od 18.893 hospitalizacija (420/100.000), a među njima je kao najčešća pojedinačna dijagnoza bio moždani udar s 50,3% (10). Prema procjeni WHO-a iz 2003. godine, prosječni troškovi njege po bolesniku 6 mjeseci nakon moždanog udara iznosili su 16.000 EUR na temelju čega je moždani udar zauzeo 2. mjesto na popisu najskupljih bolesti starijih osoba (nakon demencije) te se smatra kako će se ti troškovi unutar 10 godina povećati za 40% (11).

Socioekonomsko i javnozdravstveno opterećenje moždanim udarom razvidno je prikazano prilagođenim godinama života s onesposobljenošću (*engl. Disability adjusted life years*, DALYs), u čiji izračun ulaze izgubljene godine života uslijed prijevremenog umiranja i godine života s onesposobljenošću/disabilitetom. WHO procjenjuje kako Hrvatska godišnje izgubi 989 godina na 100.000 stanovnika, tj. ukupno oko 50.000 godina, dok se na globalnoj razini predviđa kako će teret bolesti porasti s 38 milijuna DALY-a izračunatih 1990. na 61 milijun DALY-a 2020. godine.

Unatoč velikom javnozdravstvenom utjecaju, moždanom se udaru u mnogim zemljama ne pridaje dovoljno značenje (12). Iako se u razvijenim zemljama, kao što su „stare” članice Europske unije, mortalitet od moždanog udara posljednjih godina stabilizirao na oko 65/100.000 (u Hrvatskoj iznosi 112,3/100.000), zbog povećanja udjela stanovništva starije dobne skupine te daljnjim napretkom zemalja s niskom stopom razvoja, projekcije govore kako će incidencija moždanog udara i ubuduće rasti (13, 14).

Zato se bez ulinkovitije strategije prevencije, liječenja i rehabilitacije moždanog udara i troškovi liječenja ove bolesti mogu samo povećavati (15). Takvo zatečeno neuroepidemiološko stanje, uz prognoze zdravstvenih stručnjaka, zahtijeva ulaganja u nova znanstvena istraživanja, uključujući i ona na bazičnoj razini, koja će se svojom translacijskom vrijednošću odraziti na kvalitetu života oboljelih.

1.2. Životinjski modeli ishemijskog moždanog udara

Između moždanog udara svakog pojedinog oboljelog postoji velika varijabilnost u pogledu uzroka, trajanja, lokalizacije, težine ishemije i pratiteljskih sustavnih oboljenja.

To otežava provođenje kliničkog ispitivanja jer je za isključivanje čimbenika posredne povezanosti potrebno okupiti vrlo velik broj ispitanika.

Suprotno tome, eksperimentalni modeli omogućuju potpunu kontrolu varijabli i istraživanje specifičnih znanstvenih pitanja čimbenika rizika, patofizioloških procesa te preventivno-terapijskih postupaka prije i nakon oštećenja. Od modela se istovremeno očekuje da što vjernije oponaša ishemijske procese prisutne kod čovjeka.

1.2.1. Osnovne značajke životinjskih modela ishemijskog moždanog udara

Kako bi se ishemijski procesi prisutni kod čovjeka što stvarnije modelirali, prilikom razvoja, odabira ili prilagodbe određenog modela, potrebno je uzeti u obzir nekoliko značajki:

- I. znanje patofizioloških zbivanja za moždani udar kod čovjeka
- II. reproducibilnost
- III. jednostavnost i minimalna invazivnost
- IV. mogućnost nadziranja i održavanja fizioloških parametara
- V. dostupnost uzoraka za histopatološka, biokemijska i molekularna mjerenja
- VI. uloženi trud i troškovi moraju biti unutar granica razumno izvedivog (16)

Prva točka naglašava kako je presudan odabir životinjske vrste koja bi omogućila ekstrapolaciju rezultata istraživanja na ljude. Prema preporukama Okruglog stola znanstvenika i industrije za liječenje moždanog udara (*engl. Stroke Treatment Academic Industry Round Table, STAIR*) ispitivanje lijekova valja započeti na malim životinjama, a u slučaju pozitivnog rezultata replicirati istraživanje na višim sisavcima, primatima (17).

Ispitivanja na manjim životinjama (glodavcima), imaju i oluje prednosti u vidu manjih troškova uzgoja te bolje etike prihvatljivosti u odnosu na primata. U tom su se svjetlu glodavci, a osobito štakor i miš kao vrste, pokazali idealni jer svojom anatomijom krvnih žila s olujanim Willisovim krugom i fiziologijom nalikuju čovjeku (18).

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

Ontogenetska istraživanja pokazuju kako je razvoj krvnih žila pratio razvoj encefalona kako bi zadovoljio njegove visoke potrebe za kisikom i glukozom te su, unatoč svim promjenama arterijskih grana, teritoriji pojedinih moždanih krvnih žila ostali olujani (19). Međutim, ostale životinjske vrste pored glodavaca, poput zeca, školjmiša, mačke, psa i svinje pokazuju prisutnost uspostave kolateralne cirkulacije. Tako primjerice kod pasa *a.vertebralis* preuzima ulogu *a.carotis internae* te brojnim intra- i ekstrakranijalnim anastomozama štiti encefalon od ishemije (20). Takve se vrste, osobito mongolski školjmiš, mogu koristiti u modelima globalne ishemije koji oponašaju oštećenje mozga nastalo zakašnjenom ili slabo djelotvornom kardiorespiratornom resuscitacijom s nastupom hipoperfuzije, no nisu pogodne za modele fokalne ishemije (Tablica 1.) (21).

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

Globalna ishemija		Žarišna (fokalna) ishemija	
POTPUNA	NEPOTPUNA	UNIFOKALNA	MULTIFOKALNA
• dekapitacija • okluzija aorte/v.cave • vanjska poveska ili kompresija • srčani zastoj	• krvarenje ili hipotenzija • hipoksična ishemija • intrakranijalna hipertenzija i okluzija zajedničke karotide (CCA) • okluzija 2 žile i hipotenzija • okluzija 4 žile • unilaterala okluzija CCA	• konstrikcija endotelinom-1 • <u>MCAO:</u> → <u>endovaskularna (reverzibilna)</u> → transkranijalna proksimalna(trajna) → transkranijalna distalna(trajna) • spontani moždani udar • embolizacija makrosferama	• embolizacija krvnim ugruškom • embolizacija mikrosferama • fototromboza

1.2.3. Značajke MCAO modela ishemijskog oštećenja mozga

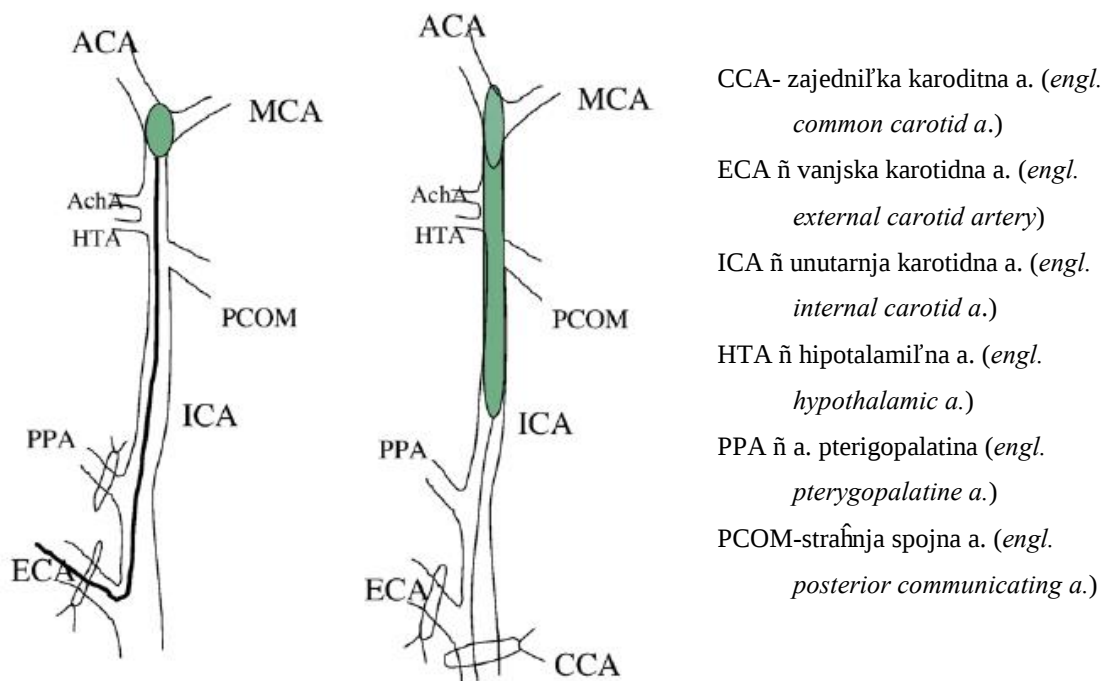
Budući da ishemijski oblik moždanog udara čini oko 80% svih moždanih udara te nastaje uslijed trombotskog ili embolijskog zatvaranja (okluzije) neke od velikih terminalnih krvnih žila mozga, najčešće srednje moždane arterije (*a. cerebri media*), životinjski modeli najčešće nastoje reproducirati ishemiju u teritoriju MCA (22).

Na, i visoko srodni sojevi miševa poput C57Bl/6, koji su genetska osnova svih miševa korištenih u ovom doktoratu, pokazuju varijacije moždane cirkulacije s visokom učestalošću displazije stražnjih poveznih arterija (*lat. a. communicantes posteriores, engl. posterior communicating a., PcomA*) što uzrokuje povećanu smrtnost i nestabilnost lezije kod primjene trajne okluzije MCA intraluminalnim filamentom. Navedeno je moguće izbjeći ukoliko se za okluziju upotrebljava vrlo tanka silikonska presvlaka (veličine 8-0) (23).

Brojna postupna unapređenja postupka ključna su za njegovo poboljšavanje (*engl. refinement*) u pogledu preživljenja životinja, koje čini jedno od 3R dobre laboratorijske prakse rada sa životinjama (zamjena, smanjenje, poboljšavanje, *engl. replacement, reduction, refinement, RRR*) (24). To je važno iz razloga što STAIR preporučuje model trajne MCAO za provođenje početnih ispitivanja lijekova za primjenu u moždanom udaru, osim u slučajevima kad se djelovanje lijeka očekuje nakon reperfuzije (17).

1.2.4. Inačice MCAO modela

Koizumi je 1986. godine prvi opisao izazivanje MCAO intraluminalnim filamentom kod gltakora, a od tada je zahvat dohivao brojne preinake. Npr. model je prilagođen i za miševe, uvedene su nove duljine samog filameta, kao i duljina i materijal kojim je presvučen (Slika 1.) (25, 26). Obzirom na mogućnost ostavljanja trajne okluzije ili uspostave reperfuzije, ustanovljeno je da je vremensko razdoblje 3 sata ključno za ireverzibilna ishemijska oštećenja, dok je za izazivanje reproducibilnih oštećenja koja uključuju reperfuziju potrebno trajanje okluzije od 60-90 minuta (27). Inačice trajne okluzije MCA su i elektroauterizacija njenog proksimalnog (28) i distalnog dijela (29) kroz kraniotomiju.



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

1.2.5. Čimbenici varijabilnosti MCAO modela

Cilj ishemijskog modela je postići homogenu i reproducibilnu leziju s malom varijabilnošću kako bi se povećala pouzdanost pokusa.

Reperfuzija s proizvoljno varijabilnim vremenom jedna je od prednosti MCAO modela intraluminalnim tj. endovaskularnim filamentom, što preciznije imitira rekanalizaciju koja se zajedno s reperfuzijskom ozljedom najčešće događa kod ljudi (31). Preostale prednosti predstavljaju mala invazivnost (ne zahtjeva kraniotomiju kao primjerice elektroauterizacija proksimalne ili distalne MCA), mogućnost kontroliranja fizioloških parametara i izazivanje reproducibilnih oštećenja.

Prepoznati izvori varijabilnosti uključuju čimbenike koji ovise o životinjama (odabir životinja po genotipu, dobi i spolu), vrijeme u danu za provođenje zahvata, variranje fizioloških parametara životinje tijekom zahvata te razlike između osoba koje zahvate provode.

Mogući nedostaci same metode uključuju i puknuće krvne žile s posljedičnim subarahnoidalnim krvarenjem. Kako bi se ono svelo na najmanju mjeru komercijalna tvrtka Docol (Sharon, MA, US) sudjeluje sa znanstvenicima u razvoju optimalnog oblika presvučenog filameta. Standardizirali su presvlaku (presvlaka od poli-L-lizina ili silikona), oblik vrha filameta (zaobljen, oštar, koničan), teksturu i konzistenciju (mekana i savitljiva) čime su smanjili učestalost subarahnoidalnog krvarenja i standardnu devijaciju volumena ishemijske lezije (32).

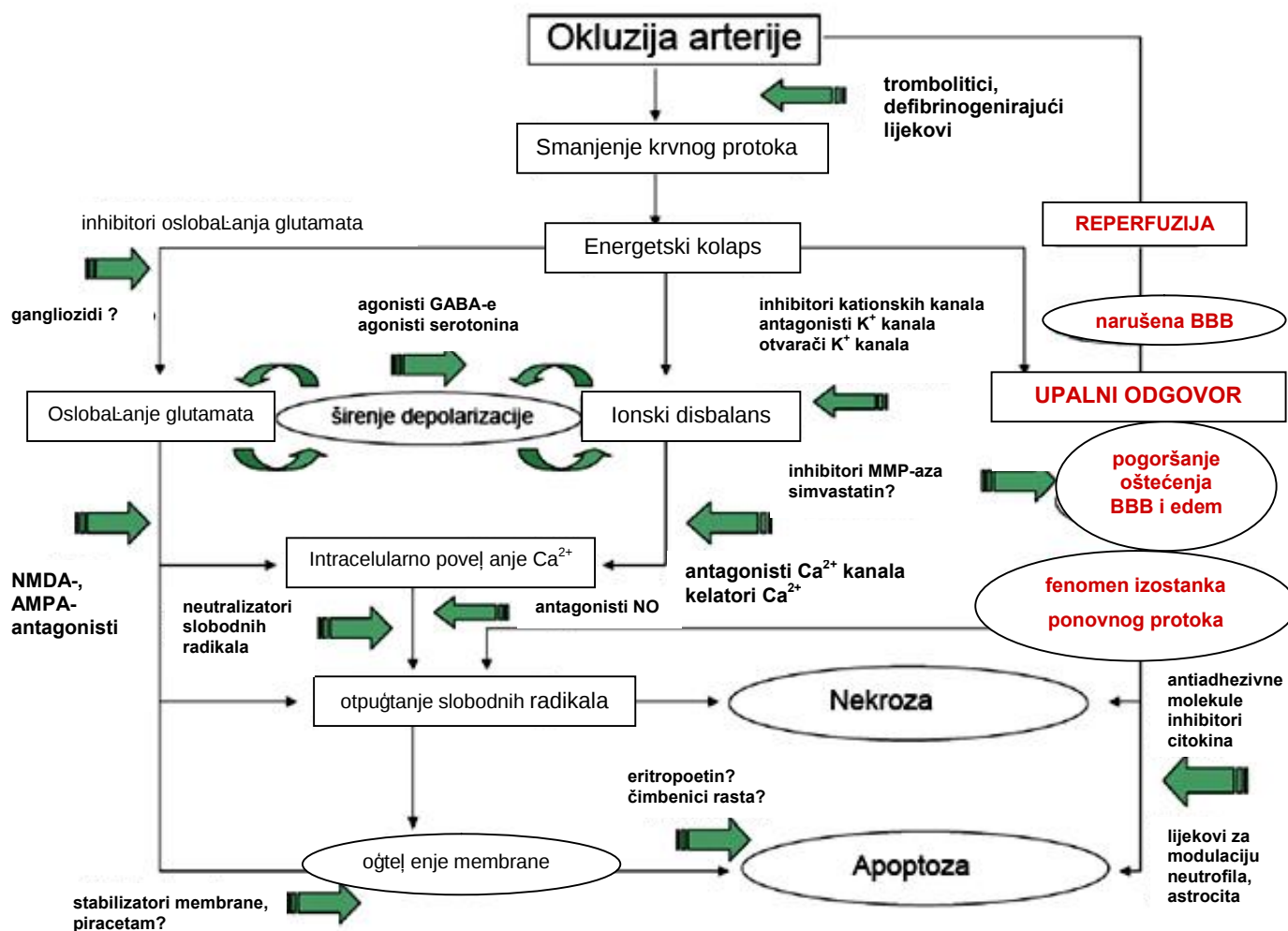
Ostale navedene izvore varijabilnosti svodi se na najmanju moguću mjeru praćenjem protoka pomoću sustava laserskog doplera u teritoriju MCA, praćenjem fizioloških parametara (disanje, tjelesna temperatura, hidracija), osiguravanjem istog operatera koji provodi zahvat te uključivanjem dovoljnog broja lažno operiranih kontrola.

Ne postoji standardni kirurški model koji bi zadovoljavao sve istraživačke potrebe. Naprotiv, obilje različitih postupaka i varijacija istih doprinosi bogatstvu i raznolikosti u bazilnom istraživanju te potom na razini zajedničkog rezervoara ishoda imitira stvarni problem oboljenja kod ljudi.

1.3. Akutna i odgođena zbivanja u ishemijskom oštećenju mozga

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

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

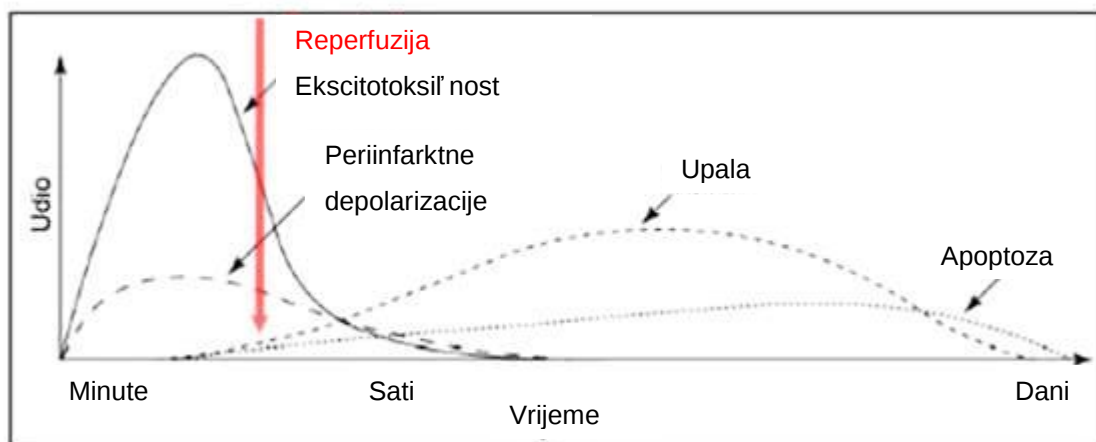


Slika 2. Različite sastavnice ishemijske kaskade koje se međusobno isprepliću. NO-dušični monoksid; GABA, gama aminomaslačna kiselina; NMDA, N-metil-D-aspartat; AMPA, alfa-amino-3-hidroksi-5-metilizoksazol-4-propionska kiselina; MMP-aze, metaloproteinaze matriksa. Prilagođeno i preuzeto iz (30).

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

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

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



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

1.3.2. Reperfuzija pojačava intenzitet upale i apoptoze neurona

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

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

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

1.3.3. Neurotoksična i neuroprotektivna svojstva upalnih čimbenika

Intenzitet i trajanje upale, koja dominira u subakutnoj fazi, ovisit je o razmjeru akutnih zbivanja ekscitotoksičnosti, depolarizacijama i oksidativnom stresu. Tako je se kratak i akutni prekid krvne opskrbe sa slabim oksidativnim i dugotrajnim opterećenjem brzo stabilizirati upravo zahvaljujući mehanizmima akutne upale te neće značajno utjecati na dugoročno preživljenje neurona, dok je opsežnija ishemijska lezija dovesti do opetovanih i pojačanih upalnih zbivanja koja mijenjaju svoju prvobitno korisnu funkciju (45).

1.3.3.1. Mikroglija kao središnja točka upale nakon ishemije

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

Prvi ih je opisao njemački liječnik i „otac moderne patologije“ Rudolf Ludwig Carl Virchow još 1856. kao „*nervenkitt*“ (*njem. nervenkitt*, hrv. lijepilo za živce) nazivajući ih neuroglija (46). U zreom središnjem živčanom sustavu mogu se podijeliti na astrocite, oligodendrocite, ependimalne stanice i mikrogliju (47).

Tradicionalno stajalište smatralo je gliju pasivnim sudionikom u navedenim funkcijama. Danas se ovo stajalište uvelike promijenilo uslijed napretka tehnologije i akumulacije znanja o gliji. Stoga ove stanice na koje otpada 50 % stanica mozga imaju važne uloge aktivno oblikujući i modulirajući neurone (48).

Stanice mikroglije, koje čine 20% svih glija stanica, prvi je opisao Franz Nissl (*njem. Stabchenzellen*, hrv. štapičaste stanice) 1880. godine, no „ocem mikroglije“ smatra se Pío del Río Hortega (učenik Santiaga Ramón y Cajala), koji ih je promatrao nakon oštećenja tkiva mozga te povezao sa značajkama makrofaga (49, 50).

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

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

Dok makroglija potječe iz neuralne cijevi (ektoderm), podrijetlo mikroglije su hematopoetske matične stanice iz ljudske vreće (ekstraembrionalni mezoderm) koje po diferenciji u primitivne makrofage koloniziraju neuroepitel (52). Primitivni makrofagi ulaze u osnovu za mozak s 9,5 tjedana embrionalnog razvoja (E9,5), prije nego što se krvno-moždana barijera krene stvarati kod E13,5 (53).

Iako se može smatrati kako su sve stanice zatečene u području ishemije jednakomjerno sudionici upale, uključujući i novopristigle neutrofile i makrofage iz krvi, stanice mikroglije su zajednička konvergencijska točka za podražaje nastale u akutnom razdoblju, one se prve aktiviraju te stvojem raznovrsnim učincima igraju glavnu ulogu u odgođenim zbivanjima nakon ishemijske lezije (45). Njihova aktivacija nije još u potpunosti razjašnjena, no smatra se kako raspad neurona zajedno s reaktivnim kisikovim radikalima dovodi do aktivacije inače uspavane i mirujuće razgranate mikroglije (54). Izraz „uspavana“ mikroglija nije u potpunosti opravdan, jer i u tom stanju mikroglija ima nadzornu ulogu stalno se pregrađujući u pretrazi vlastitog teritorija. O pretvaranju u aktivan ameboidni fenotip odlučuje prevaga niza vanjskih čimbenika kao što su bakterijski lipopolisaharid, LPS, podjedinice ovojnice retrovirusa gp41 i gp120, ali i unutarnjih čimbenika kao što su agregati beta amiloida, ATP, ioni kalija, citokini (Tablica 2.) (51).

Već 2 sata nakon smrti prvih neurona, na mjestu ishemije nalazimo mikrogliju pretvorenu u rezidentne makrofage (55). Dok su neuroni izrazito osjetljivi na hipoksiju, mikroglija je pak i u srcu ishemijskog oštećenja nadživjeti i neurone i astrocite, sve dok ishemija ne traje duže od 90 minuta (55, 56). I mikroglija iz okolnih područja bit će privučena signalom oštećenih neurona te ih u bliskom kontaktu (*engl. capping*, hrv. poklapanje) obilježiti za buduću fagocitozu (57).

U aktivnom stanju, pored fagocitoze, mikroglija proizvodi upalne i citotoksične medijatore te tako pojačava oštećenje stanica i staničnu smrt. Primjerice, proizvodi citokine, male signalne molekule koje reguliraju stanični rast, proliferaciju i diferencijaciju (58).

U zdravom su moždanom tkivu citokini konstitutivno prisutni u malim, teško detektabilnim razinama, no nakon nastupa oštećenja, dolazi do brzog i intenzivnog pojačanja njihovog izražaja (26). U skupini proinflammatoryh citokina navode se IL-1 α , TNF- α i IL-6, dok su protuupalni čimbenici transformirajući čimbenik rasta- β (*engl. Transforming growth factor- β* , TGF- β) i IL-10 (59).

Proizvodnja TGF- β 1 i IL-10 govori u prilog hipotezi da bi aktivacija mikroglije mogla biti i neuroprotektivna (60). Primjerice, stanice mikroglije fagocitiraju neutrofile u oštećenom tkivu te tako sprječavaju daljnje oslobađanje toksičnih medijatora (61). Osim neutrofila i rezidentni makrofagi, u koje se glia pretvorila, uklanjaju nekrotično tkivo i čestice sastavnice debrisa.

K tome, stanice mikroglije proizvode neurotropne čimbenike koji stimuliraju neurogenezu i plastičnost (58).

Takav razvoj događaja ukazuje da je rana aktivacija glijalnih stanica štetna za okolno tkivo, dok je kasnija korisna u pogledu uspostave zdrave stanične okoline (45).

Prethodna istraživanja naših suradnika na transgenični miševima kod kojih je selektivnom ablacijom Mac-2 (galektin-3) pozitivnih stanica inhibirana proliferacija mikroglije pokazuju povećani volumen infarciranog tkiva za 13% nakon ishemije od 60 minuta s reperfuzijom, što ipak govori u prilog neuroprotektivnom djelovanju proliferirajuće mikroglije nakon ishemije (62).

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

1.3.3.2 Rezidentne stanice CNS-a u upali nakon ishemijskog oštećenja

Pored glavnog efektor upale, stanica mikroglije, u razvoju upale sudjeluju i makroglija (astrociti, oligodendrociti), perivaskularni makrofagi, dendritičke stanice i mastociti, a od infiltrirajućih stanica pridolaznih iz krvi valja spomenuti neutrofile, monocite i limfocite.

1.3.3.2.1. Astrociti

U zdravom mozgu astrociti čine najveći udio populacije glia stanica (80%), ali i svih stanica u mozgu općenito (50%) te se svojim oblikom razlikuju ovisno o dijelu mozga u kojem se nalaze (63). Tako u sivoj tvari nalazimo protoplazmatske astrocite s brojnim radijarnim staničnim nastavcima koji svojim nožicama s jedne strane komuniciraju s neuronima, a s druge oblažu krvne žile i čine sastavnicu krvno-moždane barijere (64). Fibrilarni astrociti, prisutni u bijeloj tvari, nisu u tako bliskom kontaktu s tijelima neurona te nemaju izraženu ulogu tijekom ishemijskog oštećenja (65).

Astrociti pružaju strukturnu, trofičku i metaboličku potporu neuronima te moduliraju sinaptičku plastičnost, što je uvjetovano neposrednim kontaktom dvaju navedenih tipova stanica (66).

Otpornost astrocita na ishemiju u moždanom tkivu tek malo premašuje onu neurona, poglavito iz razloga što su manje osjetljivi na hipoksiju te mogu anaerobno iskoristavati glukozu proizvodeći laktat (67). Njihov je zadatak, neposredno nakon nastupa ishemije, dokazan u ublažavanju ekscitotoksičnosti glutamata aktivnim preuzimanjem glutamata Na^+ ovisnim transporterima (68).

U akutnom razdoblju od nekoliko sati od oštećenja bilo kakvog uzroka dolazi do hipertrofije i proliferacije astrocita koje se naziva reaktivna astroglioza (69), s povećanjem izražaja njihovih strukturnih bjelaničevina (GFAP, vimentin) te enzima poput dismutaze, glutation-

peroksidaze i metalotioneina što povećava kapacitet astrocita za neutralizaciju ROS-ova (70, 71). Pored toga, poticanjem izražaja hem-oksigenaze uklanjaju željezo iz hema time također smanjuju oksidativni stres u slučaju hemoragijskog moždanog udara ili konverzije ishemijskog u hemoragijski moždani udar (66).

U razdoblju od nekoliko sati do nekoliko dana, s najvećim intenzitetom tijekom 48-72 h, astrociti izražavaju inducibilnu sintetazu dušičnog monoksida (*engl. inducible nitric oxide synthase*, iNOS) što može doprinijeti odgovornom oštećenju neurona nakon ishemijskog oštećenja (72). Od upalnih citokina, astrociti proizvode TNF- α , IL-1, -6, -10 i IFN- γ (73, 74). Istovremeno u odgovornom odgovoru na ishemijsko oštećenje astrociti proliferiraju, migriraju do ruba ishemijske lezije i sudjeluju u stvaranju glijalnog ožiljka (75). Glijalni ožiljak, kao i svaka barijera, ima dvojaki učinak: štiti neoštećeno tkivo, sprječava širenje upale i neizravno doprinosi kontroli sastava izvanstaničnog okoliša (76), dok je istovremeno fizička prepreka izrastanju neurita prema mjestu ishemijske lezije (77).

Uslijed ispreplitanja djelovanja raznih čimbenika, kao što je primjerice izlučivanje citokina iz raznih tipova stanica, preostaje tek ustanoviti točan doprinos astrocita upali.

1.3.3.2.2. Perivaskularni makrofagi

Citokine izlučuju i perivaskularni makrofagi te se smatra kako upravo oni svojom lokacijom utječu na izražaj adhezivnih molekula na krvnim žilama i posljedičnu infiltraciju upalnim stanicama (78).

1.3.3.2.3. Dendritičke stanice

Dendritičke stanice su dio imunološkog sustava sisavaca čija je uloga predolavanje antigena (*engl. antigen presenting cells*, APCs) na vlastitoj površini T-limfocitima te se smatraju glasilnicima između urođene i stečene imunosti.

Ne nalazimo ih u zdravom moždanom tkivu, već u meningama, koroidnom spletu i likvoru. No, nakon podražaja ishemijom one se počinju nagomilavati na periferiji (od rezidentnih dendritičkih stanica), ali kasnije i u samom središtu oštećenja (novopridošle dendritičke stanice) (79).

1.3.3.3. *Infiltrirajuće stanice u upali nakon ishemijskog oštećenja*

1.3.3.3.1. Neutrofili

Neutrofilni granulociti najbrojniji su tip leukocita (40%), proizvode se u koštanoj srži od matičnih stanica i otpuštaju u krv odakle privučeni adhezivnim molekulama i citokinima

prianjaju uz endotel krvnih žila zahvaćenih upalnim zbivanjima te prolaze kroz stijenku krvnih žila (ekstravazacija). Uloga im je izlučivanje upalnih limfocita i fagocitoza.

Uslijed velikog izražaja E-selektina, koji je adhezijska molekula za neutrofile, u malim krvnim žilama može nastupiti tzv. sindrom izostanka ponovnog protoka (*engl. no reflow phenomenon*) zbog začepljenja nagomilanih stanica koje se još nisu uspjele probiti u tkivo (80).

Infiltracija neutrofilima započinje već unutar pola sata nakon ishemije, a doseže vrhunac unutar nekoliko sati nakon čega ih zamjenjuje dominacija monocita/makrofaga (81, 82).

Svojom degranulacijom akutno otpuštaju iNOS, NADPH oksidazu, mijeloperoksidazu, te enzimi matriks-metaloproteinaze koji pojačavaju upalu.

U odgođenim zbivanjima izlučuju velike količine slobodnih kisikovih radikala, proupalnih citokina (IL-1 α , IL-6, TNF- α), kemokina (MCP-1, MIP-1 α , IL-8), elastaze, matriks-metaloproteinaze (uglavnom MMP-9), no njihov utjecaj na veličinu ishemijske lezije nije dokazan (83).

1.3.3.3.2. Makrofagi i limfociti

Upalni signal privlači i monocite iz krvi koji se unutar 10-12 sati nakon ishemijske lezije pridružuju mikroglijii i gotovo ih je nemoguće morfološki i funkcionalno razlikovati od rezidentnih makrofaga (aktivirana mikroglija) te zajedno s njima sudjeluje u uklanjanju staničnog debrisa neutrofila i nekrotičnih stanica (84).

Limfociti pak ulaze u tkivo nakon otvaranja krvno-moždane barijere te se uključuju u komunikaciju s ranije spomenutim dendritičkim stanicama (85). Točan vremenski slijed pojave pojedinih podvrsta limfocita tijekom ishemijskog oštećenja nije poznat, kao ni njihov krajnji učinak (86).

Pojedine stanice i signalne molekule uključene u upalu, ne mogu se smatrati isključivo neurotoksičnim ili neuroprotektivnim protagonistom postishemijskih zbivanja, već je samo ravnoteža između njihovih „štetnih“ i „korisnih“ učinaka pridonijeti konačnom pogoršanju ili oporavku ovisno o fiziološkom i biokemijskom kontekstu trenutno prisutnom u oštećenom tkivu (87).

1.4. Upala i receptori nalik na Toll

U obrani protiv patogena imunološki sustav čovjeka ima na raspolaganju mehanizme urođene i stečene imunosti. Stečena se imunost, specifična za kralježnjake, oslanja na stvaranje imunološkog pamćenja koje omogućuje prepoznavanje tijelu stranih antigena specifičnim

protutijelima. Dok uroĽena imunost prisutna i kod beskraljeĽnjaka, nije na taj naĽin specifiĽna za odreĽenu tvar, veĽ se u svojoj brznoj aktivaciji oslanja na ograniĽenu skupinu bjelanĽevina i fagocitne stanice koje prepoznaju konzervirana svojstva patogena (88).

1.4.1. Otkriće i filogenetska konzerviranost

Dok se steĽena imunost intenzivno istraĽivala od kraja 19. stoljeĽa, mehanizmi uroĽene imunosti poĽeli su se rasvijetĽjavati tek krajem 1980.-ih godina.

Tad je za otkriĽe posebnog gena koji kodira razvoj dorzoventralne osi kod vinskih muĽica (*Drosophila melanogaster*, Meigen) dodijeljena Nobelova nagrada za fiziologiju ili medicinu Christiane Nüsslein-Volhard i Ericu Wieschausu (89). Uspostavilo se da je isti gen, nazvan Toll (*njem. Toll*, odliĽno, super, „gubaó), presudan za obranu vinskih muĽica od gljiviĽne infekcije (90).

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

Nastao tsunami istraĽivanja TLR-ova je pokazao da su receptori nalik na Toll (*engl. Toll like receptors*, TLR) razred evolucijski oĽuĽvanih receptora uroĽene imunosti koji su izraĽeni u filogenetskom nizu sve od morskih jeĽinaca pa do ljudi.

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

1.4.2. Struktura i izraĽaj

BjelanĽevine iz TLR obitelji transmembranske su bjelanĽevine tipa 1 (s jednom regijom koja prolazi kroz membranu i izvanstaniĽnim N-krajem) (94). Citoplazmatski dio koji pokazuje veliku sliĽnost s obitelji IL-1 receptora, naziva se Toll/IL-1 (TIR) domena. Osim te sliĽnosti, izvanstaniĽno se meĽusobno razlikuju jer domena IL-1 receptora nalikuje na imunoglobuline, dok izvanstaniĽna domena TLR-ova posjeduje leucinom bogata ponavljanja (*engl. leucine-rich repeats*, LRR) (95).

No, nisu svi TLR-ovi prisutni na staniĽnoj membrani. Dok je to veĽinom sluĽaj za TLR1, -2, -4, -5 i -6, receptori TLR3, -7, -8 i -9 izraĽeni su u unutarstaniĽnim odjeljcima (29,45ñ47) (96-98). No, ta podjela nije fundamentalna jer TLR2, -4 i -5 mogu biti internalizirani, a TLR9 se moĽe pojaviti na staniĽnoj povrĽini (93). Smatra se da su upravo unutarstaniĽni odjeljci (endosomi/lizosomi) mjesto prepoznavanja sastavnica patogena pomoĽu TLR-ova, Ľak i za membranski izraĽene receptore (poput TLR2) (99).

TLR-ovi pokazuju diferencijalni histološki, ali i stanični profil izražaja. Tako primjerice TLR3 ima kritičnu ulogu u penetraciji virusa Zapadnog Nila kroz krvno-moždanu barijeru, a izražaj TLR2 i -4 na endotelnim stanicama uzrokuje specifičnu osjetljivost na bakterijske ligande te usmjerava putujuće leukocite unutar tkiva (93).

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

Izražaj TLR-ova se mijenja unutar pojedine stanice ovisno o izloženosti okolišnom stresu, patogenima ili citokinima. Primjerice lipopolisaharid, LPS i dsRNA (RNA dvostrukog lanca) povećavaju izražaj TLR2 (101). Također, uočeno je i međudjelovanje unutar skupine TLR-ova, pa tako do koordiniranog povećanja TLR2 dovodi i aktivacija neutrofila putem TLR2 (102).

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

Na, i sami neuroni podraženi pomoću interferona- γ (IFN- γ) i deprivacijom glukoze izražavaju TLR2 i TLR4, te navedeni receptori u kortikalnim neuronima posreduju aktivaciju puta aktivirajuće bjelančevine Janus kinaza-1 (*engl. Janus Kinase activating protein-1*, JNK-AP-1) i kaspaze-3 (104). Postavlja se pitanje postoje li stanice koje ne izražavaju TLR receptore ukoliko su podražene na odgovarajući način.

1.4.3. Signalni put

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

Primjeri PAMP-ova koji se vežu na TLR-ove porijeklom su iz bakterija, gljivica, protozoa i virusa kao što su LPS, flagelin (iz bijele bakterije), peptidoglikan i sl.

Dok su DAMP-ovi koji pokreću signalni put TLR-ova endogeni proizvodi vlastitih raspadnutih stanica nakon nekroze. U njih spadaju molekularni šaperoni (*engl. heat shock protein*, HSP, bjelančevine toplinskog šoka) -60, -70, -90, HMGB1, heparan sulfat

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

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

Signalni put TLR-ova započinje TIR domenom te uključuje jednu od 4 adaptorskih bjelančevina (Slika 4) (108):

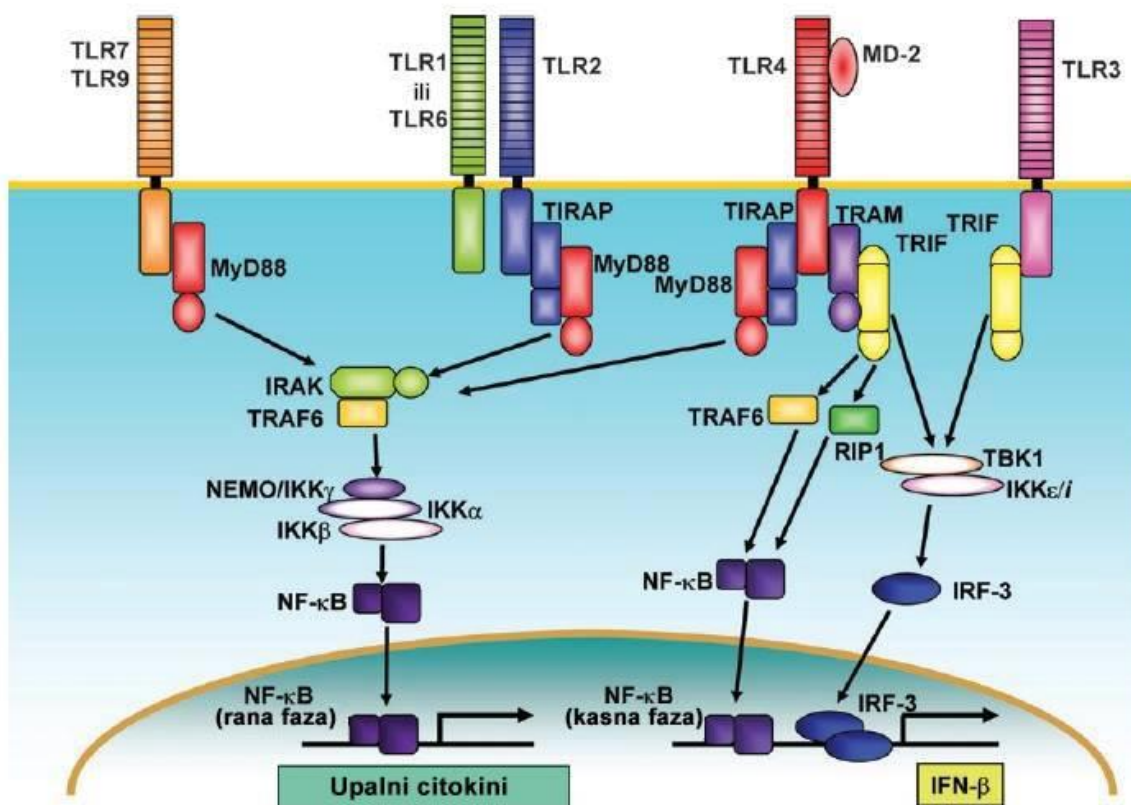
- **MyD88** (*engl. myeloid differentiation factor 88*, mijeloidni limbenik diferencijacije),
- **MAL/TIRAP** (*engl. MyD88-adaptor-like/TIR-associated proteins*, bjelančevine nalik na MYD88 adaptor povezane s TIR-om)
- **TRIF** (*engl. Toll-receptor-associated activator of interferons*, aktivator interferona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

Put preko adaptorske molekule MyD88 prihvaća i signal IL-1 receptora, obzirom da i oni posjeduju TIR-domen. MyD88 povezuje kinazu-4 povezanu s receptorom za interleukin-1 (*engl. interleukin-1 receptor-associated kinase 4*, IRAK4) s TLR-om i facilitira fosforilaciju IRAK-1. Aktivirani IRAK-1 se potom veže za limbenik povezan s receptorom za TNF-6 (*engl. TNF receptor-associated factor 6*, TRAF6).

Potom se aktiviraju 2 puta: 1. vodi u aktivaciju transkripcijskih limbenika za AP1 preko MAP kinaza; a 2. aktivira TAK1/TAB kompleks (*engl. Transforming growth factor beta-activated kinase 1*, kinaza aktivirana transformirajućim limbenikom rasta beta 1/ *engl. TAK1-binding protein 2*, bjelančevina koja veže TAK1) koji pojačava aktivnost kompleksa kinaze I κ B (*engl. I κ B kinaze complex*, IKK). IKK inducira fosforilaciju i posljedičnu degradaciju I κ B što dovodi do premještanja nuklearnog limbenika κ B (*engl. nuclear factor- κ B*, NF- κ B) u jezgu (110).

Put preko adaptorske molekule TIRAP/Mal nuhan je za aktivaciju TLR2 i TLR4 signalnih puteva koji se odvijaju preko MyD88. No, za TLR4 postoji i put neovisan o MyD88, pa tako i o TIRAP/Mal adapteru, iako je nešto slabiji. Naime, stimulacija TLR4 virusnom DNA, ili pomoću DNA dvostrukog lanca (*engl. double-stranded DNA*, dsDNA), dovodi do aktivacije limbenika transkripcije IRF-3 i aktivaciju kasne faze NF- κ B, neovisno o MyD88. Taj put preko IRF-3 dovodi do stvaranja IFN- α (111). IFN- α aktivira *Stat1* i potiče nekoliko gena koji ovise o IFN- α . Točni mehanizmi aktivacije transkripcijskih limbenika putem TLR-ova nisu u

potpunosti poznati i još uvijek su predmet istraživanja, jer se, primjerice, pokazalo da imunološke funkcije TLR-a ovise o kontekstu: u slučaju invazije patogena imaju glavnu ulogu u pokretanju i koordinaciji učinkovitog imunološkog odgovora, dok tijekom aseptičkog oštećenja pokazuju gletno djelovanje okidajući isti upalni odgovor (112).



Slika 4. Signalni put TLR-ova započinje na TIR domeni. MyD88 adapter se povezuje s TIR domenom receptora i regrutira IRAK. IRAK potom aktivira TRAF6, koji aktivira IKK kompleks koji se sastoji od IKKα i IKKβ i NEMO/IKKγ. IKK kompleks fosforilira IκB što dovodi do premještanja NFκB u jezgru i poticanja prepisivanja upalnih citokina. TIRAP, drugi adapter za TIR, je uključen u signalni put ovisan o MyD88 za TLR2 i -4. Kod TLR3 i -4 aktivacija IRF-3 i IFNβ ne ovise o MyD88 za što je potreban treći adaptor za TIR-a, TRIF. Netipični IKK1/IKKε i TBK1 posreduju aktivaciju IRF-3. TRAM je 4 adaptor za TIR koji je specifičan za TLR4 signalni put neovisan o MyD88/TRIF-u. Preuzeto i prilagođeno iz (110).

1.5. Signalni put ovisan o TLR2 u postishemijskoj upali mozga

U postishemijskoj upali, unutar TLR porodice, TLR2 ima najveći porast izražaja (152-154), a u tome ga slijede TLR4 i -9. Kako je ishemijsko oštećenje mozga primarno aseptično, jedini dostupni ligandi specifični za TLR2 endogeni alarmini, odnosno DAMP-ovi: HSP60, HSP70, HMBG1 i stanični fibronektin (113-115). Spajanjem s ligandom i heterodimerizacijom s TLR1 ili -6 nastupa signalna kaskada kojoj je svrha pojačavanje i modulacija unutarstaničnih

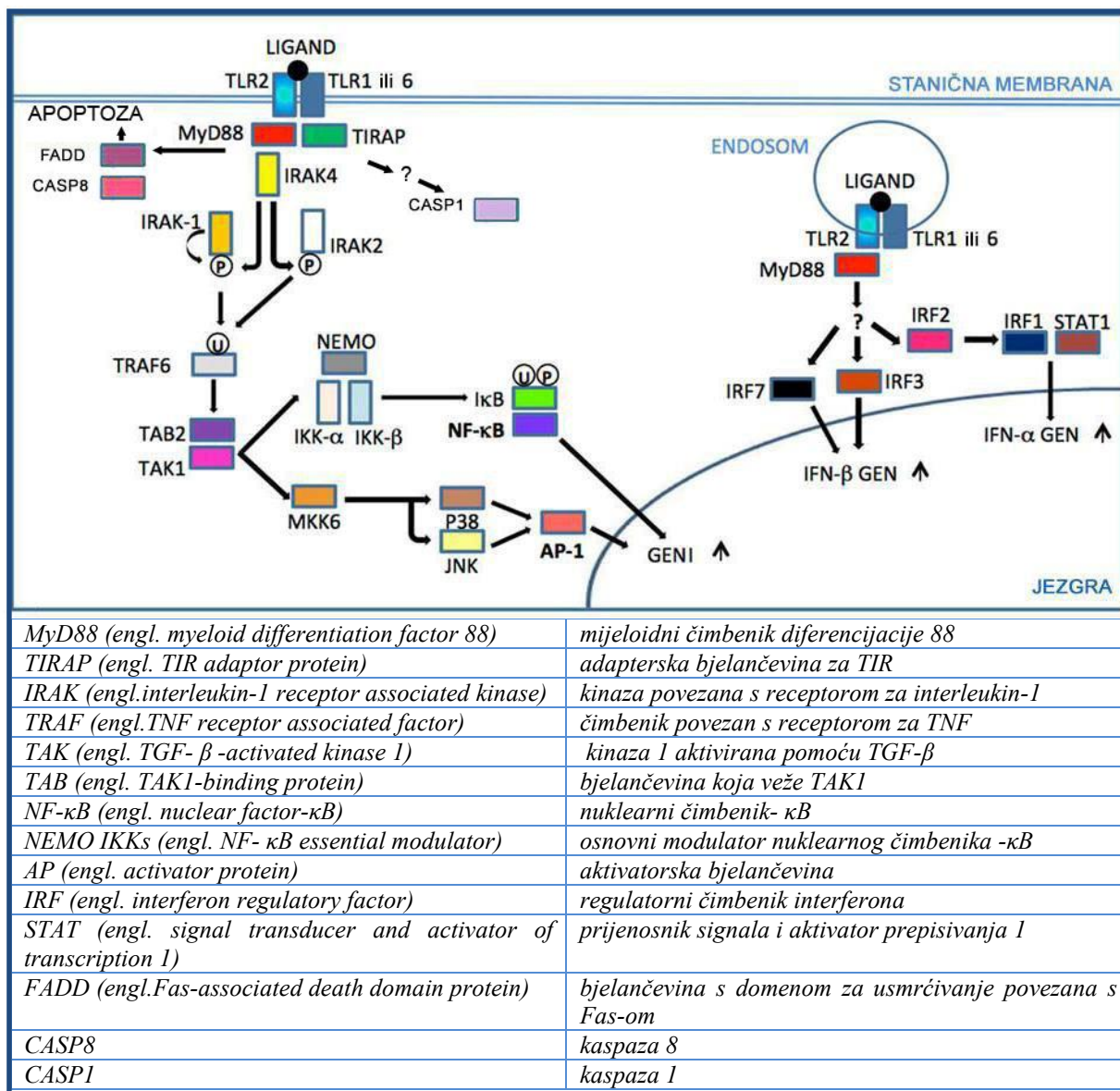
glasnika te postupno dovodi do pojačanog otpuštanja IFN- α , IFN- γ , IL-1 α i IL-6 (Slika 5.) (116, 117).

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

Dosad su se promatrali izražaji gena signalnog puta TLR2 u akutnoj fazi nakon ishemijskog oštećenja mozga te pokazali kako manjak TLR2 u akutnom razdoblju nakon hrgne ishemije smanjuje veličinu lezije, a ne utječe na regrutiranje granulocita u zahvaćeno područje te da je TLR2 na mikrogliji presudan za girenje oštećenja (116, 117, 119). Obzirom da je pokazano i kako pojačani izražaj TLR2 postoji i u kroničnoj fazi nakon ishemije, jedan od ciljeva ovog doktorata je proširiti analizu modulacije mRNA ovisnih o TLR2 u odgođenoj fazi oporavka (62).

Prethodna istraživanja pod vodstvom prof. Jasne Krih provedena na miševima s onemogućenim *Tlr2* genom (*Tlr2*^{-/-}) pokazala su kako aktivacija stanica mikroglije/makrofaga ovisi o funkcionalnom TLR2 receptoru. TLR2 potom sudjeluje i u proliferaciji stanica mikroglije, te u regrutiranju upalnih stanica monocita/makrofaga i limfocita iz cirkulacije (120). U longitudinalnom praćenju do kasnih vremenskih točaka odgođenog odgovora i kroničnog oporavka pokazalo se kako je veličina ishemijskog oštećenja ipak veća kod miševa bez djelatnog TLR2. Također, kod miševa s onemogućenim *Tlr2* genom smanjeno je nakupljanje astrocita na području oko ishemijske lezije.

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



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

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

1.6. Pretkliničko snimanje laboratorijskih životinja

Zajedno s razvojem životinjskih modela za bolesti ljudi raste i potreba za neinvazivnim praćenjem patofizioloških procesa samog oboljenja, ali i primjenjene potencijalne terapije na pojedinoj životinji. Postojale su tehničke zapreke za učinkovitu uporabu modela, obzirom na malu veličinu glodavaca kao najčešće upotrebljavanih laboratorijskih životinja, te potrebu za velikom prostornom razlučivošću. Razvojem tehnologija s pojačanim omjerom signala i čuma te snažnijim detektorima, danas se u praćenju oporavka miševa nakon ishemijskog oštećenja uspješno koriste oslikavanja pomoću:

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

Bioluminiscencija je ipak jedina neinvazivna metoda kojom je moguće praćenje izražaja pojedinih gena *in vivo*, koja je zbog tome osjetljivija, prilagođenija za životinje, te lakša za korištenje u usporedbi s ostalim modalitetima oslikavanja (128).

1.6.1. Primjena bioluminiscencije u biomedicinskim istraživanjima

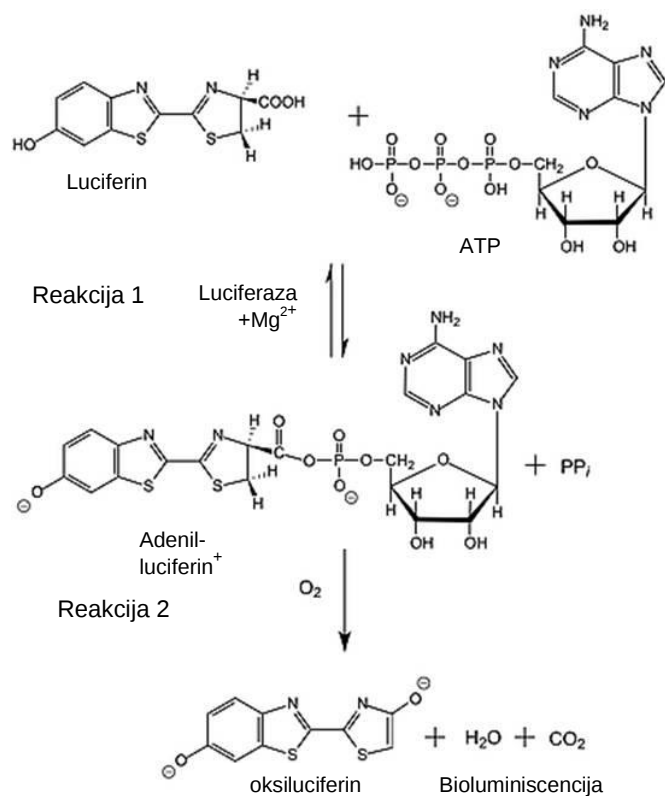
Bioluminiscencija je oblik kemiluminiscencije prisutan u brojnim morskim životinjama, insektima i bakterijama (Slika 6).

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

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

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

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



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

1995. godine Contag i suradnici su prvi put *in vivo* pratili bioluminiscenciju na sisavcima, miševima inficiranim salmonelom koja izražava luciferazu. To im je omogućilo praćenje razvoja i tijeka infekcije u stvarnom vremenu, bez žrtvovanja životinje u pojedinim vremenskim točkama (132).

1.6.2. Oslikavanje bioluminiscencije na modelu ishemijskog oštećenja mišjeg mozga

Ubrzo su stvoreni i sami transgenični miševi u kojima je gen za luciferazu poslužio umjesto dotad prisutnog reportera beta-galaktozidaze (gen Lac-Z). Prvi transgenični miš za praćenje izražaja gena bioluminiscencijom prikazivao je aktivaciju gena za Nf-kB koji ima ulogu

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

U posljednjih 20 godina razvijeno je nekoliko transgeni'nih mi'ijih modela bioluminiscencije i fluorescencije specifi'nih za praenje upale, o'eteljenja i stresa neurona te njihovog oporavka. IzmeLu ostalih namjena, reporterski sustavi korigteni su kao biomarkeri aktivnih patolo'kih dogaLaja nakon ishemijskog o'eteljenja (62, 120, 134); za provoLenje testa probira novih biokompatibilnih molekula (135); te za analizu patogenih procesa u ranoj fazi kao i za praenje ul'inkovitosti terapije u kroni'nim neurolo'kim poremeLajima (136, 137).

Tako je, primjerice, u vel' ranijem spomenutom istraivanju korigten reporterski sustav *Tlr2-luc-Gfp* za prikaz aktivacije mikroglije u akutnim vremenskim toLkama nakon ishemijske lezije (62).

1.6.3. Snimanje izraLaja *Gap43* u mozgu

Promatra li se funkcionalni oporavak i praenje neurolo'kog deficita, u l'ijoj je osnovi preivljavanje i umreLavanje neurona, bilo je potrebno pronaLi odgovarajuLi reporterski sustav specifi'an upravo za navedene stanice u podrahenom aktiviranom stanju.

Kao gen kandidat pokazao se *Gap43* obzirom na svoj poveLani izraLaj nakon o'eteljenja aksona i regenerativnog odovora u zreom sredi'njem ivl'anom sustavu (138).

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

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

Perinatalno je izrahen u svim neuronima, no njegov izraLaj opada sa smanjenjem arborizacije aksona i sinaptogeneze te preostaje samo u regijama visoke plasti'nosti, kao Lto su hipokampus i njuLna lukovica (olfaktorni bulbus) kod mi'eva (143).

TakoLer, izraLaj *Gap43* je izrazito poja'an kod odraslih ozlijeLenih neurona kao dio regeneracije, Lto je opisano kod ozljede perifernih ivaca, kraljeLnice, ali i mozga (138, 144-146). Osim toga, zanimljivo je kako je poremeLaj regulacije *Gap43* prisutan u

neurodegenerativnim poremećajima, kao što su Alzheimerova bolest, multipla skleroza i amiotrofična lateralna skleroza (147-151).

Prethodna istraživanja k tome ukazuju kako je povećan izražaj *Gap43* prikladan biljeg za procjenu oštećenja aksona i regenerativnog odgovora neurona u zreлом središnjem živčanom sustavu (138).

Nedavno se pokazala i nova uloga bjelančevine GAP43 kao supstrata za kaspazu-4 (CASP3). Također, mutacija *Gap43* gena uzrokuje smanjenu endocitozu receptora 1-amino-3-hidroksi-5-metil-4 izoksazolpropionske kiseline (engl. *1-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*, AMPA) dovodeći do poremećene dugotrajne depolarizacije na razini postsinaptičke membrane (152).

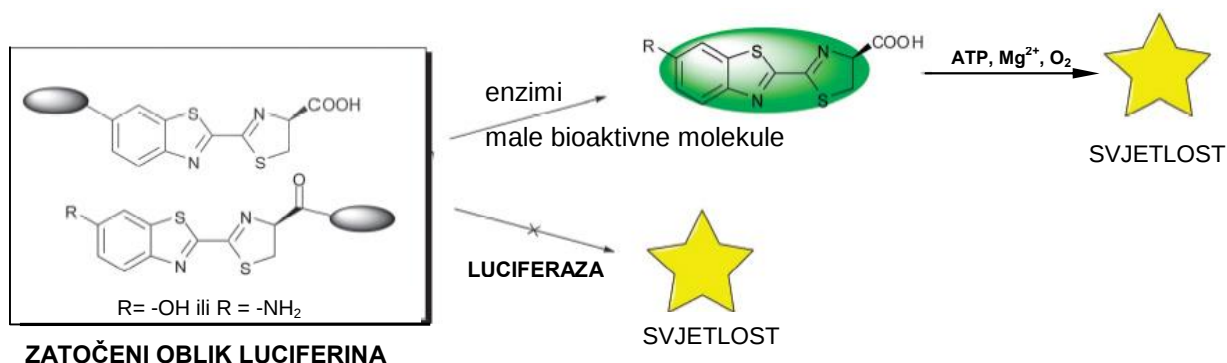
Kako bi se istražila prostorno-vremenska dinamika indukcije *Gap43* u oštećenju mozga stvorena je transgenična mišja linija koja sadrži bicistronski reporterski sustav (luciferaza 2, luc2; zelena fluorescentna bjelančevina, green fluorescent protein, GFP) pod izražajem promotora za *Gap43* u Laboratoriju Zavoda za psihijatriju i neuroznanost Istraživačkog centra Sveučilišta Laval u Quebecu, u kojemu je proveden dio istraživanja prikazanog u ovoj disertaciji (vidi poglavlje Uzorci i postupci, Transgenična mišja linija GAP43-luc/gfp).

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

Sustav je potvrđen promatranjem izražaj gena *Gap43* gena tijekom embrionalnog razvoja kad je normalno prisutan, ali je ustanovljena i postishemijska dinamika istog gena s porastom u akutnom razdoblju i odgođenim blagim pojačanjem izražaja (127).

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

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



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

Kako bi se istražilo jesu li aktivirani neuroni istovremeno podložni apoptozi, osnovnom modelu transgeničnog *Gap43-luc/gfp* miša pridodan je pristup modificiranim supstratom koji se oslobađa samo u prisutstvu cjepajućih bjelančevina CASP3/7 koje su ujedno i biljezi apoptotičkog puta.

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

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

Njegova primjena u živom mišu koji selektivno izražava luciferazu u odabranoj populaciji neurona predstavljala bi osjetljiv pokazatelj intenziteta zbivanja nakon ishemijskog oštećenja upućujući na primjenu odgovarajućih terapijskih pristupa u točno određenom vremenskom prozoru. Takva bi orijentacija u mogla poslužiti u poboljšanju istraživanja neuroprotektivnih lijekova koji su se ranije primjenjivali neovisno o molekularnim zbivanjima unutar neurona.

2. HIPOTEZA

Hipoteza ovog istraživanja bila je da djelovanje TLR2 nakon ishemijskog oštećenja mišjeg mozga potiče funkcionalni oporavak i reaktivnu sinaptogenezu.

3. CILJEVI RADA

3.1. Opći cilj

Opći cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj TLR2 kao posrednika urođenog upalnog odgovora na oporavak miševa i sinaptičku plastičnost nakon ishemijske ozljede.

3.2. Specifični ciljevi

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

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Usklađenost s etičkim smjernicama i zakonskim propisima

Svi postupci provedeni za ovaj doktorski rad odobreni su od Etičkog povjerenstva Sveučilišta u Zagrebu, Medicinski fakultet i u skladu su s nalogima Etičkog kodeksa Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama, koji je usklađen sa nalogima Međunarodnog vijeća za znanost o pokusnim životinjama (International Council for Laboratory Animal Science).

Istraživanje je provedeno u skladu s odredbama Zakona o zaštiti životinja (NN 135/06) i čl. 9 Pravilnika o uvjetima držanja pokusnih životinja, posebnim uvjetima za nastambe i vrstama pokusa (NN 176/04).

Svi eksperimentalni postupci izvedeni u Kanadi odobreni su od Etičkog odbora za brigu o životinjama Sveučilišta Laval (Laval University Animal Care Ethics Committee), te su u skladu s Vodičem za skrb i uporabu pokusnih životinja Kanadskog vijeća za skrb o životinjama (The Guide to the Care and Use of Experimental Animals of the Canadian Council on Animal Care) (154).

4.2. Plan istraživanja s vremenskim točkama

U istraživanju je korišteno ukupno 155 miševa.

Vremenske točke koje su se proučavale su sam dan izazivanja ishemije (0) za mjerenje početnih vrijednosti te 1, 3, 4, 7, 14 i 28 dana nakon MCAO (Tablica 3).

Za procjenu veličine ishemijske lezije korištena su po 3 Gap43tg miša u 2 vremenske točke (1,4 dana) (ukupno 6 miševa).

Za proučavanje funkcionalnog oporavka odabrane su vremenske točke od 3,7,14 i 28 dana te su oblikovane 4 pokusne skupine. Pojedine skupine su se sastojale od 10 miševa divljeg tipa C57Bl/6, 10 miševa s onemogućenim Tlr2 genom (skraćeno Tlr2^{-/-}), a kontrolne skupine su se sastojale od lažno operiranih miševa divljeg tipa (5 miševa) i lažno operiranih Tlr2^{-/-} (5 miševa) (ukupno 30 miševa).

Za proučavanje broja aksona 28 dana nakon MCAO oblikovale su se 4 pokusne skupine s Thy1 miševima s MCAO (4), Thy1Tlr2^{-/-} miševima s MCAO (4) , te kontrolne skupine s lažno operiranim miševima Thy1 (3 miša) i lažno operiranim Thy1Tlr2^{-/-} miševima (3 miša) (ukupno 14 miševa).

Za izolaciju mRNA za kvantitativni real-time RT-PCR korištena su po 3 miša po genotipu (2 genotipa WT, Tlr2^{-/-}) po vremenskoj točki (4 vremenske točke: 0, 3, 7, 28 dana)(ukupno 24 miša).

Za izolaciju bjelančevina za Western blot korišteno je po 5 miševa po genotipu (2 genotipa: WT, Tlr2^{-/-}) po vremenskoj točki (5 vremenskih točaka: 0, 3, 7, 14, 28 dana) (50 miševa).

Za procjenu izražaja i kolokalizacije GAP43 i CASP3 korišteno je po 5 Gap43tg u 3 vremenske točke (0, 1, 4 dana) (ukupno 15 miševa)

Za pokuse snimanja bioluminiscencije korištena su ukupno 4 *Gap43-luc/gfp* transgenična miša (skraćeno u tablici Gap43tg).

Etilku krajnju točku tijekom pokusa dostiglo je 5 životinja, te su one uklonjene iz ispitivanja. Na temelju praćenja perfuzije teritorija MCA pomoću LDF-a iz ispitivanja je uklonjeno 7 životinja.

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

Postupak	Vrijeme nakon MCAO								
	-14 dana	-7 dana	0 dana	1 dana	3 dana	4 dana	7 dana	14 dana	28 dana
Tjelesna težina	15 WT 15 Tlr2-/-								
Neurološki deficit									
Ubrzavajući i rotarod									
Schallertov cilindar									
Y-labirint									
Bilateralna taktilna stimulacija									
Snimanje bioluminiscencije			4 Gap43tg						
Procjena veličine ishemijskog oštećenja				3 Gap43tg		3 Gap43tg			
GAP43 CASP3 kolokalizacija			5 Gap43tg	5 Gap43tg		5 Gap43tg			
GAP43 IOD									
CASP3 IOD									
Br. GAP43 pozitivnih stanica									
Br. CASP3 pozitivnih stanica									
q RT-PCR			3WT 3Tlr2-/-		3WT 3Tlr2-/-		3WT 3Tlr2-/-		3WT 3Tlr2-/-
Western Blot			5WT 5Tlr2-/-		5WT 5Tlr2-/-		5WT 5Tlr2-/-	5WT 5Tlr2-/-	5WT 5Tlr2-/-
Analiza gustoće aksona									7Thy1 7Thy1Tlr2-/-
Analiza krvnih žila									

4.3. Pokusne životinje

U istraživanju su korišćeni miševi stari od 2 do 4 mjeseca i to isključivo mušjaci kako bi se izbjegao neuroprotektivni učinak estrogena kao l'imbenik posredne povezanosti(134).

Sojevi koji su se koristili u pokusima su sljedeći i:

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

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

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

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

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

Podsoj C57Bl/6 odvojio se od C57Bl/10 oko 1937. godine te postao najpopularniji za uporabu u znanstvenim istraživanjima od svih prethodnih podsojeva. To je postao inercijom: velik broj pol'etnih istraživanja koja su provoLena na njemu, dovela su do daljnjih još opsefnijih istraživanja. Dostupni su za nabavku u više od 20 ustanova koje ih uzgajaju diljem

svijeta. Laboratorij za neurogenetiku uzgaja miševe kupljene od tvrtke Charles River, te je puni naziv tog podsoja C57Bl/6NCrJ.

Krzneno im je crne boje. Ostale važne značajke su visoko preferiranje morfina i alkohola, niska incidencija tumora mliječne žlijezde, otpornost na audiogene napadaje, visoka podložnost razvijanju ateroskleroze inducirane dijetom, visoka incidencija mikrofthalmije, visoka podložnost razvoja kroničnog ulceroznog dermatitisa i gubitka sluha uzrokovanog bukom. Otporni su na zračenje, anafilaktički šok. Prosječna veličina legla je 6-8 mladih, a odvajanje od legla nastupa s 20 dana starosti (155). U daljnjem tekstu rada se označavaju kao divlji tip, odnosno WT (*engl. Wild Type*).

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

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

Homozigoti su normalne veličine, ne pokazuju krupne tjelesne anomalije ili anomalije ponašanja, no prilikom podražaja antigenima spiroheta, kao što je LPS, ne razvijaju simptome bolesti jer ne proizvode TNF-alfa, ni IL-6 (156).

4.3.3. Transgenična mišja linija *Gap43-luc/gfp*

Transgenična mišja linija *Gap43-luc/gfp* generirana je na Platformi za generiranje transgeničnih miševa u sklopu Istraživačkog centra Kliničkog bolničkog centra Sveučilišta Laval (CHUL), na C57Bl/6 podlozi.

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

izolirani kao fragment *SpeI/ClaI* i mikroinjektirani u muški pronukleus oplođene oocyte C57BL/6(127).



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

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

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

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

Ova transgenična linija izražava žutu fluorescentnu bjelančevinu (*engl. yellow fluorescent protein, YFP*) u visokoj razini u motornim i osjetnim neuronima, te podvrstama neurona središnjeg živčanog sustava. Transgenična linija tako posjeduje snažan i specifičan vitalni biljeg aksona, a izražaj je snažan već od srednje gestacijske dobi(157).

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

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

Soj Tlr2^{-/-} B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J (skraćeno Thy1Tlr2^{-/-}) dobiven je sparivanjem soja Tlr2^{-/-} i Thy1 kroz 2 generacije te daljnjim sparivanjem s Tlr2^{-/-}. Miševi su se za sparenja i pokuse identificirali pomoću lančane reakcije polimerazom.

4.4. Kriteriji za isključivanje životinja iz ispitivanja

Kriteriji za isključivanje životinje iz ispitivanja su bili sljedeći:

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

Kriterij pod IV. točkom zahtijeva dodatno pojašnjenje. Na dosezanje humane krajnje točke upućuju znakovi moribundnog stanja životinje(159):

- a. Nesposobnost uzimanja vode i hrane
- b. Brzi ili znatan gubitak težine (>20%)
- c. Odsustvo voljnih reakcija na podražaj
- d. Otežano disanje
- e. Ćutica ili anemija (bljedilo)
- f. Krvarenje iz bilo kojeg tjelesnog otvora
- g. Nesposobnost uspravljanja
- h. Zgrčeni položaj
- i. Poliurija ili anurija
- j. Atrofija mišića
- k. Tremor, grčevi, kljenut
- l. Produljena hipo- ili hipertermija

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

4.5. Genotipizacija miševa

4.5.1. Izolacija DNA iz tkiva

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

Tkivo uha bilo je uronjeno u 300 µl pufera za razgradnju bioptata uha (engl. *ear punch buffer*, priprema: 500 µl 10M NaOH, 100 µl EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina), do

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

Tkivo repa je bilo uronjeno u ukupno 500 µl pufera za razgradnju (*engl. lysis buffer*, priprema 400 ml: 20 mL 1M Tris (pH = 8.0), 80 mL 0,5 M EDTA (pH = 8,0, 40 mL 10% SDS; 40 mL proteinaze K, 220 mL ultra l'ista voda). Uzorci su u navedenom puferu inkubirani preko noĽi na 56°C, a potom l'uvani na +4 °C do izvoĽenja genotipizacije.

4.5.2. LanĽana reakcija polimerazom (PCR)

Genotipizacija miĽeva ul'injena je metodom lanĽane reakcije polimerazom (*engl. Polymerase Chain Reaction*, PCR).

25 µl reakcijske smjese za jedan uzorak sadrĽavalo je:

Ľ 2 µl DNA

Ľ 2,20 µl 25 mM MgCl₂

Ľ 1 µl 20 mM pol'etnica 1(navedene u tablici 4. u stupcu „Pol'etnice za sojŃ)

Ľ 1 µl 20 mM pol'etnica 2 (navedene u tablici 4. u stupci „Pol'etnice za divlji tip C57Bl/6Ń)

Ľ 0,5 µl 25 mM dNTP

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

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

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

Genotip	Pol'etnice za soj	Pol'etnice za divlji tip C57Bl/6
Tlr2-/-	5'-CTTGGGTGGAGAGGCTATTC-3' 5'-AGGTGAGATGACAGGAGATC-3' (Neo alel)	5'-TGGTTCTTTTCCCAAAGTGG-3' 5'-CAATGGGAATCCTGCTCACT-3'
Gap43	JK3: 5'- GGCGCAGTAGGCAAGGTGGT-3' 5'-GGGCACATCCTCTCATTGT-3' (luc alel)	JK4: 5'-CAGCAGGATGCTCTCCAGTCC-3' 5'-GGGCACATCCTCTCATTGT-3'
Thy1	5' - CGGTGGTGCAGATGAACT T - 3' i 5' - ACAGACACACACCCA GGACA - 3'	5'-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT -- 3', 5' -GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC-3'

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

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

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

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

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

4.6.1. Osnovne značajke korištenog MCAO modela

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

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

Kako bi se na temelju promjena tjelesne težine moglo zaključivati o stanju životinje nakon MCAO, životinjama je izmjerena tjelesna težina prije samog zahvata.

4.6.2. Inhalacijska anestezija

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

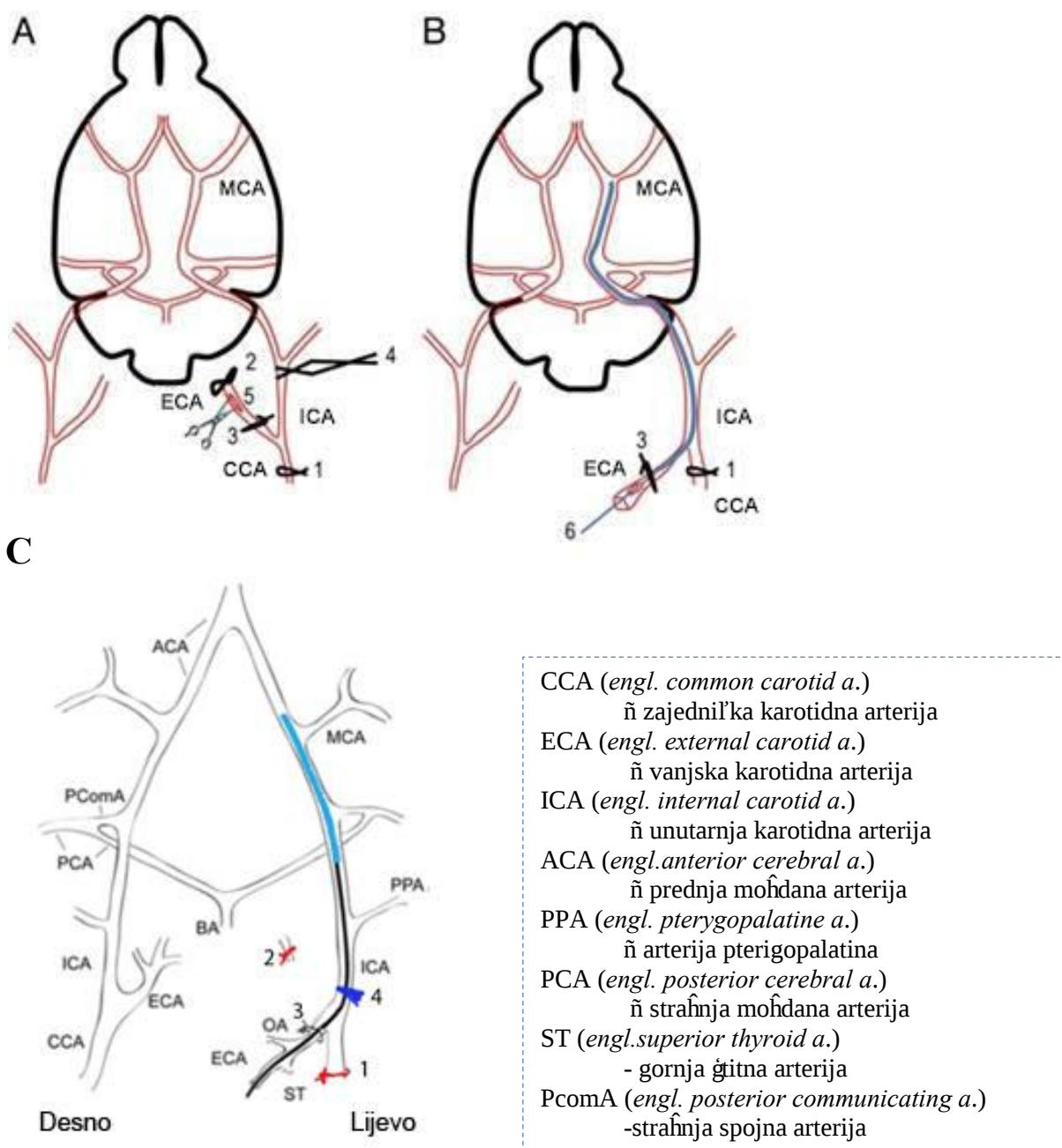
4.6.3. Izbjegavanje čimbenika posredne povezanosti pri MCAO

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

Obzirom da postoje dokazi u prilog neuroprotektivnog učinka hipotermije miša nakon izazivanja ishemijske ozljede, presudno je održavati tjelesnu temperaturu životinje stalnom (160). Tjelesna temperatura održavana je na 37,0 ± 37,5 °C pomoću grijane podloge na kojoj je miš ležao tijekom i nakon operativnog zahvata te anorektalne sonde za detekciju temperature (Moor Instruments, Devon, UK).

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

4.6.4. Opis MCAO zahvata



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

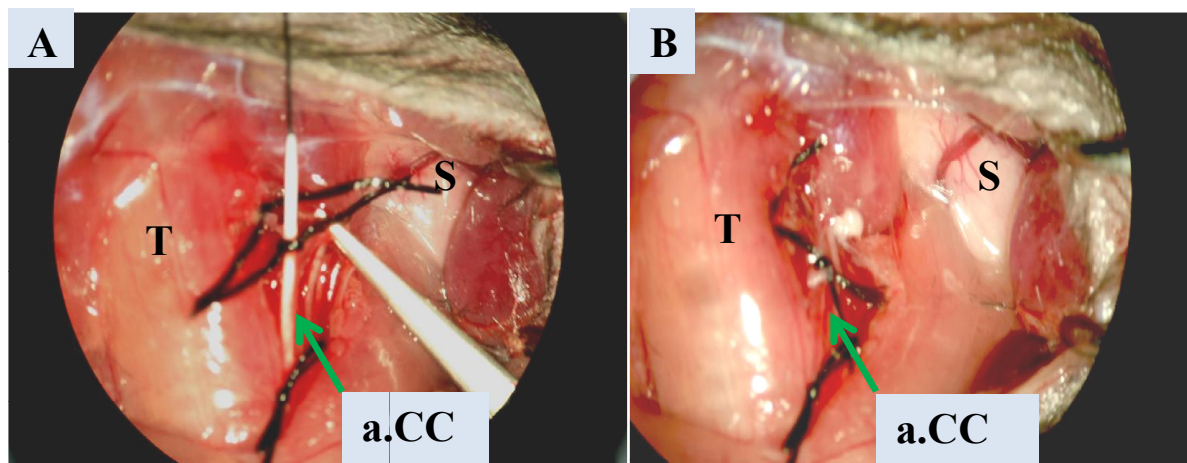
A) Položaj prvog čvora (1) na zajedničkoj karotidnoj arteriji (CCA), drugog (2) i (3) čvora na vanjskoj karotidnoj arteriji (ECA), položaj samozatvarajuće pincete (4) i mjesto reza. **B)** Položaj monofilamenta prilikom okluzije kada blokira ulazak krvi u središnju moždanu arteriju (MCA), položaj prvog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

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

Prilikom MCAO zahvata miđ je bio položen na leđ, te je bio ulinjen rez u području vrata u središnjoj liniji. Meka tkiva i žlijezde slinovnice su odmaknute u stranu kako bi se prikazale zajednička, unutarnja i vanjska karotidna arterija. Lijeva zajednička karotidna arterija izdvojena je od okolnog tkiva, n. vagusa i jugularne vene. Na zajedničkoj karotidnoj arteriji prije rađvanja postavljen je prvi lvor svilenim koncem debljine 6-0 (Slika 9). Taj lvor je privremen, tj. ostavljen je jedan kraj niti u obliku petlje, ltime se omogućilo naknadno odvezivanje lvora jednim potezom. Nakon postavljanja prvog lvora lijeva vanjska karotidna arterija izdvojena je od okolnih struktura, a na njoj je postavljen drugi lvor n trajni lvor, što je distalnije bilo moguće kako bi manevarski prostor na vanjskoj karotidnoj arteriji bio što veći. Treći lvor je postavljen labavo, također na vanjskoj karotidnoj arteriji, proksimalno od drugog lvora, neposredno uz rađvište zajedničke karotidne arterije. Nakon postavljanja trećeg lvora, lijeva unutarnja karotidna arterija izdvojena je od okolnih struktura, te je privremeno zatvorena uz pomoć posebne Dumont pincete br. 7 (12161-30., Fine Science instruments GmbH, Heidelberg, Njemačka), koja je specifična po tome što se sama zatvara, a uz pomoć primijenjene sile otvara, što je obrnuto od principa klasične pincete. Ulinjen je maleni poprečni (nepotpuni) kosi (kako bi se povećala površina presjeka) rez između drugog i trećeg lvora kroz koji je uvedena monofilamentna nit obložena silikonom, debljine 6-0 (Docol Corporation, Sharon, MA, USA), te je pogurana proksimalno do rađvišta zajedničke karotidne arterije. Zatim je treći lvor pritegnut oko monofilamentne niti koja se sada nalazi u lijevoj vanjskoj karotidnoj arteriji i seže do rađvišta (Slika 9. A). Nakon toga je u potpunosti prerezana vanjska karotidna arterija na istom mjestu gdje je ulinjen nepotpuni rez i uveden monofilament. Uklonjena je Dumont pinceta br. 7, a monofilament je gurnut u unutarnju karotidnu arteriju, a anatomskim slijedom i u Willisov krug, na taj način zaustavljajući protok krvi u početnom dijelu srednje moždane arterije (Slika 9. B). Nit je u pravilu uvedena u duljini od oko 14 mm, mjereno od rađvišta zajedničke karotidne arterije, odnosno do pružanja otpora niti što nam govori da je nit sezala do rađvišta srednje moždane arterije. Naknadno je pritegnut treći lvor oko monofilamenta kako se ne bi pomaknuo van uslijed pokreta miđa u budnom stanju. Rana je zatvorena posebnim privremenim pričvrsnim spajalicama ili šavovima. Miđ se potom probudio iz anestezije i premješten je u grijani kavez na 60 minuta. Nakon 60 minuta okluzije srednje moždane arterije, miđ je ponovno uspavan u indukcijskoj komori inhalacijskom anestezijom. Uklonjene su privremene pričvrsne spajalice ili šavovi, a monofilamentna nit je izvučena do trenutka kada se vrh niti nije približio na udaljenost od oko 2 mm do otvora na vanjskoj karotidnoj arteriji kroz koji je monofilament uveden. Ponovno je postavljena privremena okluzija Dumont pincetom br. 7 na unutarnju karotidnu arteriju, a

potom je filament u potpunosti izvađen iz krvne žile. Treći l'vor potom je l'vrsto pritegnut kako bi se spriječilo naknadno krvarenje. Samozatvarajuća pinceta je potom uklonjena, kao i prvi l'vor koji je postavljen na zajedničkoj karotidnoj arteriji na samom početku zahvata. Rana je zatvorena uz pomoć spajalica ili trajnim šavovima pomoću 4-0 svilenog konca.

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



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

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

4.6.5. Postoperativna njega

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

4.6.6. Lažno operirane životinje kao kontrole

Kako bi se umanjio utjecaj posrednih fimbrija povezanosti koje sa sobom nosi inhalacijska anestezija i operativni zahvat bez same okluzije, bilo je potrebno koristiti lažno operirane kontrolne životinje. Kod lažno operiranih životinja zahvat je bio identičan uz umetanje filameta, a izuzeto je tek ostavljanje umetnutnog filameta 60 minuta u srednjoj moždanoj arteriji.

4.6.7. Uporaba laserskog doppler sustava za provjeru protoka u MCA

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

4.7. Testovi ponašanja miševa

4.7.1. Uvjeti za provođenje testova ponašanja

Radi privikavanja miševa na ispitivače i uređaje za ispitivanje, testovi ponašanja pol'eli su se provoditi, uz mjerenje tjelesne težine, 2 tjedna prije samog zahvata.. Ispitivači su bili slijepi za genotip i tretman životinja, odnosno nije im bila poznato u koju skupinu miš pripada.

Radilo se u skladu s općim pravilima rada u životinjskoj nastambi koja uključuju zabranu hrane, guma za hvatanje, pića i kozmetike. Cijelo vrijeme nosila su se zaštitna odijela, maska i kapa te zaštitne rukavice, a uređaji su se temeljito čistili deterdžentom i alkoholom nakon svake ispitivane životinje.

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

4.7.2. Procjena neurološkog oštećenja

Pregled za neurološko oštećenje pripada u redovitu procjenu stanja životinje nakon MCAO zahvata, kako bi se pratio oporavak životinje, ali i utvrdile eventualne humane krajnje točke. Provodi se prema metodi po Garcii (1963). Najveći mogući broj bodova je 18, a najmanji 3 boda (Tablica 6).

Spontana aktivnost ocjenjivala se u trajanju od 5 minuta u, za miša, normalnom okruženju (kavezu). Proučavana je spontana aktivnost prilikom istraživanja prostora. Ispitivalo se nije pokretao, niti proizvodio buku kako ne bi ometao miša i uzrokovao „smrzavanje“, (engl. freezing) tj. karakteristično ponašanje miša u kojemu se on zaustavi i ukoči, a javlja se u situacijama kada se životinja osjeća ugroženom.

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

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

Penjanje po zidu hišnog kaveza provodilo se tako da je poklopac kaveza postavljen pod kutom od gotovo 90 stupnjeva, a miš je postavljen na donju trećinu poklopca. Miš se instinktivno nastoji popeti do vrha, a u prisutstvu oštećenja, to radi sporije ili kruži po rešetki.

Propriocepcija se ispitivala tako da se životinja dodirne tupim štapićem s jedne, a potom i s druge strane tijela. Tipičan odgovor zdrave životinje uključivao je okretanje glave i pokret cijelog tijela prema štapiću, s ciljem proučavanja i njužkanja štapića. Životinja s neurološkim ispadom zanemarivala je jednu stranu tijela, a navedeni odgovor izostajao je na desnoj strani prilikom dodira štapićem.

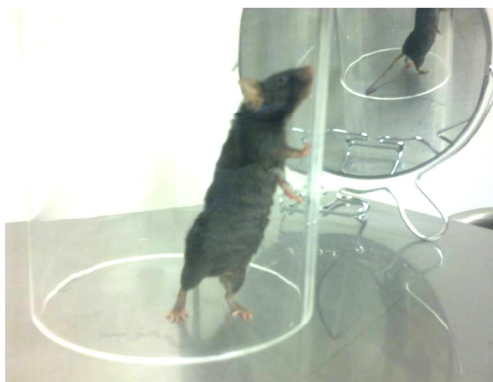
Odgovor na dodir brkova provodio se dodirivanjem brkova na obje strane tupim štapićem. Štapić se pružao odostraga kako miš ne bi vidio štapić, već bi imao isključivo dodirni podražaj. Zdrava životinja pomicala je brkove na dodir i okrenula je glavu u smjeru

podrađaja, a ponekad i pomaknula cijelo tijelo, sve s ciljem istrađivanja i njuđkanja, dok je kod řivotinje koja ima neurološki ispad ta reakcija izostala.

Tablica 6. Procjena neurološkog oštećenja prema Garcii (163)

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

4.7.3. Schallertov cilindar



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

Test u Schallertovom cilindru mjeri uporabu prednjih udova za potporu tijela tijekom uspravljanja (Slika 11) (164). Njime se testira koliko životinja preferira korištenje nezahvalnog prednjeg uda za pokrete premještanja tijela tijekom spontanog vertikalnog istraživanja prostora.

Provodi se u cilindru od pleksiglasa dimenzija 12,7 cm u promjeru i 25,4 cm visine (165). Zrcalo iza cilindra zakrenuto pod uglom omogućuje praćenje malih pokreta životinje kad nije usmjerena prema kameri.

Testiranje započinje stavljanjem životinje u cilindar i snimanjem pokreta kroz 180 minuta.

Ponovnim pregledom snimaka s mogućnošću uspoređivanja ispitivač bilježi samostalno korištenje lijevog/desnog prednjeg uda prilikom dodirivanja zida tijekom punog odizanja, za započinjanje pokreta cijelog tijela i za ponovno postizanje ravnoteže. Bilježi se i samostalna uporaba lijevog/desnog uda za spuštanje na tlo nakon odizanja. Pored toga, broji se istovremena uporaba oba uda prilikom dodirivanja stijenke tijekom punog odizanja i postranične kretanje duž stijenke te istovremena uporaba oba prednja uda tijekom spuštanja na tlo nakon odizanja. Ako ispitivač nije mogao odrediti je li za pokret korišten jedan ili oba prednja uda, taj se pomak nije brojao. Kretanje po tlu nakon spuštanja, tj. četveronožno hodanje, ne ulazi u analizu.

Za analizu se koristi ukupni zbroj kretnji te ocjena asimetrije.

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

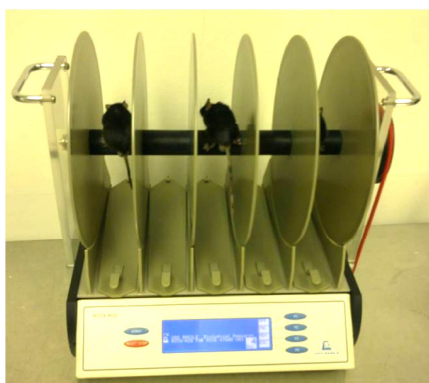
Za bodovanje prilikom promatranja snimke za svaku pojedinu životinju se koristi Tablica 7.

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

Br. životinje:	LIJEVI	DESNI	OBA
stjenka			
pod			

4.7.4. Ubrzavajući rotarod

Svrha rotarod testa je procjena motorne koordinacije i ravnoteže kod glodavaca. Miševi održavaju ravnotežu na štapi koji se okreće i pri tom ubrzava. Mjeri se vrijeme (latencija) koje miš provede uspješno se održavajući na štapi pri ravnomjernom ubrzanju od 4 do 40 okreta u minuti kroz 300 sekundi.



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

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

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

Miševi se postavljaju u svoje trake s jednom trakom razmaka između svake životinje te se privikavaju na hodanje po štapi brzine 4 okreta u minuti. Testiranje započinje kad su svi miševi postavljeni i ritmično hodaju nekoliko sekundi po štapi. Bilježi se vrijeme (latencija) koje je potrebno da miš izgubi ravnotežu i padne sa štapa ili prestaje napredovati okrećući se pasivno zajedno sa štapi.

4.7.5. Obostrani podražaj dodirnom (bilateralna taktilna stimulacija)

Obostrani podražaj dodirnom se koristi za mjerenje jednostranog zanemarivanja i nedostatka detekcije podražaja dodira na zahvaćenoj strani (Slika 13) (165).

Miš je bio stavljen u prazan kavez bez stelje te mu se bila dozvolila 1 minuta za prilagodbe na novi okoliš. Potom je životinja bila uzeta u ruku i lagano se bila prilagodila u gaci držeći je za nuchalni nabor. Na prednje su šape s ventralne strane bile stavljene naljepnice dimenzija 127x3 mm. Miš je potom bio vraćen u prazan kavez bez stelje te mu je bilo dozvoljeno da ukloni naljepnice koristeći zube. Mjerilo se vrijeme (latencija) koje je potrebno da prvo kontaktira, te potom i ukloni naljepnicu sa svake šape i to u 5 pokušaja s 30 sekundi odmora između testiranja.



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

Izračunavalo se prosječno vrijeme svakog stimulusa oduzimajući vrijeme od kontaktiranja naljepnice na jednoj strani do njenog uklanjanja te se za daljnju analizu uzimala prosječna vrijednost 5 testiranja (166).

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

4.8. Histološka analiza tkiva

4.8.1. Priprema tkiva za histološke analize

4.8.1.1. Izolacija mozga za histološke analize

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

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

4.8.1.2. Rezanje na kriostatu

Prije rezanja na kriostatu, mozak je uklopljen u otopinu za rezanje (Tissue Tek, O.C.T, Sakura, US), smrznut na -80°C kako bi se formirao tvrdi blok, koji je potom montiran na dr̂hal' kriostata (Leica CM3050 S). Na kriostatu su rezani popreĉni (frontalni) rezovi debljine 30 µm, koji su odmah montirani na pozitivno nabijena staklca (Menzel SuperFrost Plus ili Thermo Scientific Colorfrost Plus Slides). Rezovi su montirani na naĉin da su stvarane paralelne serije rezova oznaĉene slovima od a-f, kako bi se isti mozak mogao koristiti za 6 razliĉitih pokusa. Potom su staklaca sa rezovima spremljena u adekvatno oznaĉene kutije koje su odloĉene u zamrzivaĉ na -20 °C.

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

Svrha bojenja prema Nisslu bio je prikaz i procjene veliĉine ishemijske lezije 1 i 4 dana nakon MCAO. Rezovi su najprije dodatno fiksirani na stakalca uranjanjem u 100% metanol 10 minuta, a potom je uslijedila rehidracija rezova; uronjeni su redomu: 95% etanol 15 minuta, 70% etanol 2 minute, 50% etanol 2 minute, destilirana voda 2 minute, ponovno destilirana voda 2 minute. Potom je uslijedilo bojenje prema Nisslu, uranjanjem stakalaca s rezovima na 6 minuta u otopinu koja je sadr̂havala boju krezil violet (Sastav: 1,25 g krezil violet acetata i 0,75 ml ledene octene kiseline dodaje se u 250 ml tople destilirane vode. Otopina se promijeĉa, ohladi i filtrira.). Nakon bojenja uslijedilo je ispiranje i dehidracija rezova uranjanjem redom u: destiliranu vodu 2 minute, 50% etanol 2 minute, 70% zakiseljeni etanol (sastav: 2 ml ledene octene kiseline u 200 ml 70% etanola) 1 minuta, 95% etanol 2 minute, 95% etanol nekoliko puta umoĉena stakalca sa rezovima, 100% etanol 2 minute. Prosvjetljavanje je provedeno sa ksilenom uranjanjem stakalaca sa rezovima 2 puta po 3 minute. Uslijedilo je poklapanje preparata mjeĉavinom dibutil-ftalata (plastifikator), polistriena i ksilena (*engl. Dibutylphthalate, Polystirene, Xylene* ņ DPX). Staklaca s rezovima su ostavljena preko noĉi u ventiliranoj laboratorijskoj komori, digestoru, kako bi medij za pokrivanje DPX polimerizirao i oĉvrstnuo. Sljedeĉi dan se viĉak oĉvrstnutog medija za pokrivanje odstranio skalpelom, a stakalca s rezovima su odloĉena u obiljeĉene kutije ŉuvane na sobnoj temperaturi.

4.8.3. Imunohistokemija

Za prikaz izraĉaja GAP43 na staniĉnoj razini koristila se metoda indirektne imunohistokemije fluorescentnim protutijelima. Analiza je provedena na transgeniĉnim miĉevima s unesenom

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

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

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

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

Sljedeći dan stakalca su se ispirala 5 puta po 5 minuta u PBS-u uz dodatak 0.2% Tritona X-100 te su se potom inkubirala u odgovarajućim sekundarnim protutijelima koja se specifično vežu za primarna protutijela životinja u kojima su generirana (Tablica 9) 2 sata pri sobnoj temperaturi u mraku. Stakalca se ispiru 5 puta po 5 minuta u PBS-u uz dodatak 0,2% Tritona X100, a zatim 2 puta po 1 minutu u PBS-u. Naposljetku se uzorci prekrivaju sredstvom za olućavanje fluorescencije (Fluorescence Mounting Medium, Dako S3023) i pokrovnicom.

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

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

Za prikaz krvnih žila i aksonogeneze u ipsi- i kontralateralnoj moždanoj kori korišćeni su rezovi Thy1Tlr2-/- i Thy1 miševa, od kojih je 4 miša po genotipu tretirano s MCAO, dok su po 3 životinje po genotipu predstavljale lažne kontrole.

Obzirom da Thy1 transgenični miševi konstitutivno izražavaju žutu fluorescentnu bjelinu (engl. *Yellow fluorescent protein*, YFP) i to u dovoljnoj mjeri za njezinu vizualizaciju bez potrebe za protutijelima, rezovi su tretirani samo lektinom iz rajčice za obilježavanje krvnih žila.

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

Kako bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela uzorci su se inkubirali 60 minuta u 10% kozjem serumu u PBS-u uz dodatak 0,2% Tritona X-100.

Kako bi se smanjio volumen korišćenih protutijela na stakalcima se prerezi zaokružile masnom olovkom koja sprječava izlijevanje tekućine izvan nacrtanog okvira (Dako Pen, Dako S2002).

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

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

4.8.4. Kvalitativna analiza uzoraka

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

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

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

Za mjerenje parametara krvnih žila sastavljena su 2 makro programska slijeda za obradu u Fiji-u te su njima određeni promjeri krvnih žila, broj dodira s okomitom rešetkom, površina slike koju prekrivaju žile, dok je broj razvika određen ručno od strane zaslijepljenog ispitivača (Slike 14., 15., 16.).

```

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

```

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

```

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

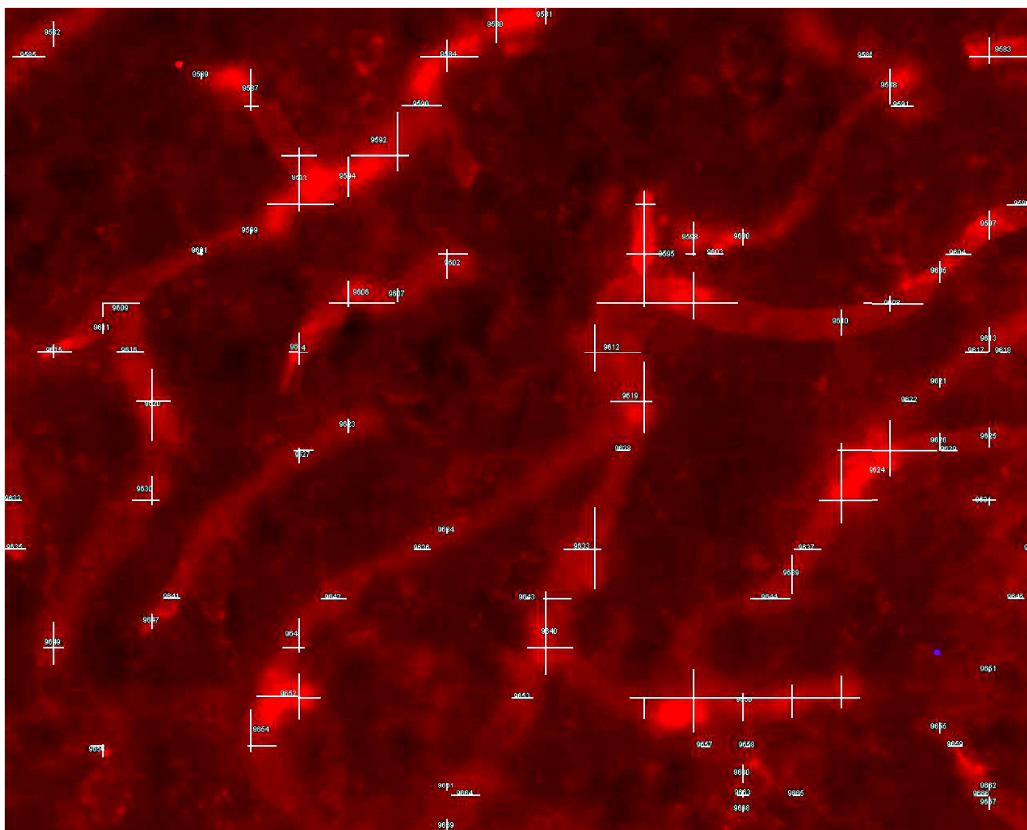
newImage("grid", "8-bit White", 1280, 1024, 1);
selectWindow("grid");
color = "black";
nLines = 20;
width = getWidth;
height = getHeight;
tileWidth = width/(nLines+1);
tileHeight = tileWidth;
xoff=tileWidth;
while (xoff<width) { // draw vertical lines
makeLine(xoff, 0, xoff, height);
run("Fill", "slice");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

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

imageCalculator("Add create", "temp", "grid");
setAutoThreshold("Default");
//run("Threshold...");
setThreshold(0, 0);
run("Convert to Mask");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Outlines
summarize");
imageCalculator("AND create", "IMAGE00x.Tif", "Drawing of Result of temp");

```

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



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

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

4.9.1. Izolacija RNA

Ĥivotinje su Ĥrtvovane prije MCAO (za vremensku toĤku 0 h), 72 sata, tjedan dana i mjesec dana nakon MCAO (po 3 miĤa za skupinu divljeg tipa te 3 za skupinu Tlr2^{-/-} miĤeva). Mozgovi su izvaĤeni nakon usmrĤivanja cervikalnom dislokacijom te su odvojene hemisfere koje su potom naglo smrznute u tekućem duĤiku te su se uzorci Ťuvali na -80°C.

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

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

Homogenizirani sadržaj premješten je u epruvetice od 1,5 mL. U svaku epruveticu dodano je 0,2 mL kloroforma te je dobro promiješano (protreseno). Nakon toga epruvetice su stavljene na centrifugiranje pri 12 000 g / 15 min na 4°C kako bi se odvojile faze. Tijekom centrifugiranja u iste epruvetice stavljeno je 0,5 mL izopropanola, na koji je stavljena vodena faza iz prethodno centrifugiranih epruvetica. Epruvetice s izopropanolom stavljene su na 15 minuta u duboko smrzavanje (-20°C). Nakon toga epruvetice su stavljene na centrifugiranje pri 12 000 g / 15 min na 4°C. Nakon centrifugiranja tekući sadržaj izlije se u l'agu, a epruvetice se okrenu na papir kako bi se što više tekućine ocijedilo (osušilo). Na dnu epruvetice, često se vidi bijeli talog u obliku crtice (RNA).

U sljedećem koraku u epruvetice je stavljeno 1 mL 75% etilnog alkohola (koji je napravljen s vodom tretiranom dietilpirokarbonatom, *engl. Diethylpyrocarbonate*, DEPC) te su epruvetice stavljene na centrifugiranje pri 8 000 g / 6 min na 4°C. Nakon centrifugiranja alkohol se izlije, a epruvetice se malo duže osuše na papiru kako bi što više alkohola isparilo. Nakon toga u epruvetice dodano je 60 µL vode tretirane DEPC-om. Sadržaj u epruveticama lagano je protresen prstom te su epruvetice stavljene na uparavanje kroz 2 minute kako bi preostali alkohol u potpunosti ispario. Nakon uparavanja na uređaju NanoDrop 2000c Spectrophotometer (ThermoScientific) je dobivena izračunata koncentracija RNA u jedinicama µg/µL.

4.9.2. Prepisivanje u cDNA

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

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

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

Epruvetice su lagano protresene prstom te se provelo kratkotrajno centrifugiranje za spužtanje taloga. Epruvetice su stavljene u uređaj za lančanu reakciju polimerazom (Eppendorf Mastercycler) u trajanju od 1h i 5 minuta.

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

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

4.9.3. Kvantitativna reakcija lančane reakcije polimerazom

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

Svi su geni navedeni prema sluľbenim simbolima Nacionalnog centra za biotehnoloľke informacije (*engl. National Center for Biotechnology Information*, NCBI).

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

Prema uputama proizvoľaľa za jedan uzorak nanosilo se:

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

Ispitivani uzorci, prema uputama proizvoľaľa nanijeti su u 96-well ploľe (FG-TCII Reaction Plt-96 Well, 4306737, Invitrogen) u ukupnoj koliľini od 20 µL, a svaki uzorak napravljen je u

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

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

4.10. Western Blot

4.10.1. Izolacija bjelančevina

4.10.1.1. Žrtvovanje životinja za izolaciju bjelančevina

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

4.10.1.2. Homogenizacija bjelančevina

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

Njihova koncentracija utvrđena je spektrofotometrijski u odnosu na slijed BSA rastuće koncentracije (0, 0,5 μ L, 1 μ L, 1,5 μ L, 2 μ L, 2,5 μ L) za određivanje krivulje odnosa absorpcije i koncentracije.

4.10.2. Elektroforeza bjelančevina u gelu

Za elektroforezu se koristio BioRad Mini-PROTEAN[®] 3 sustav (Biorad[®], Hercules, CA, US) s kojim ima za pravljenje 15 jačica i izvorom električnog napona BioRad PowerPac[®] Power Supply (Biorad[®], Hercules, Kalifornija, USA). Debljina prostora za lijevanje gela bila je 1,5 mm.

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

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

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

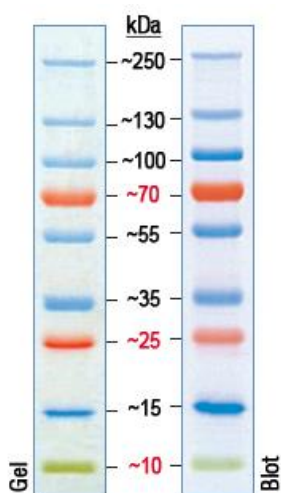
bis-akrilamida, 1,91 mL sterilne vode, 0,75 mL 0,5 M Tris-HCl-a (pH 6,8), 30 μ L 10% SDS-a, 15 μ L 10% APS-a i 6 μ L TEMED-a.

U njega se stavlja ljepljivost za jačice koje se formiraju solidifikacijom gela i uklanjanjem ljepljivosti.

Uzorci su se nanosili u jačice u količini od 15 μ g te proporcionalnom količinom 4X pufera za punjenje bjelančevina.

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

U jednu od jačica nanosena je kontrolna mješavina unaprijed obojenih bjelančevina poznate veličine Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder (ThermoScientific™, Waltham, MA, US) (Slika 17.)



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

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

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

Bjelančevine su migrirale u električnom polju pod naponom od 100 Volti.

4.10.3. Transfer bjelančevina s gela na membranu

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

Gelovi su potom smješteni u sendvič između 2 Whatman® celulozna filter papira (Whatman® 3MM papers, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MI, US) u kupki ispunjenoj puferom

za transfer. Sendvič je obuhvaćen spuštalicama te je smješten u pufer za pažljivo izbjegavanje zarobljene mjehuriće zraka.

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

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

Sustav je bio okružen ledom radi održavanja stalne temperature koja bi u suprotnom rasla i utjecala na bjelančevine. Također, rotirajući magnet u podnožju sustava omogućavao je stalno protjecanje tekućine i tako je spriječeno lokalno zagrijavanje.

Kiselim Ponceau bojenjem provjerena je uspješnost prijenosa bjelančevina na PVDF membranu. To omogućuje rezanje membrane nešto niže od mjesta gdje se prema standardu procjenjuje da je prenesen beta-tubulin (50 kD). Takva 2 dijela membrane mogu se koristiti za zasebno ispitivanje više različitih bjelančevina.

4.10.4. Obilježavanje primarnim protutijelima

Kako bi se blokirala izložena mjesta i spriječilo nespecifično vezanje protutijela pojedini dijelovi membrana su potom inkubirani 1 sat na sobnoj temperaturi u 5% nemasnom mlijeku u prahu u PBS-Tween puferu.

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

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

Protutijelo	Veličina (kD)	Životinja podrijetla	Razrjeđenja	Proizvođač	Katalogski broj
DLG4(PSD95) (D27E11) XP®	95	kunić	1/10,000	CellSignaling	3450S
α -3-tubulin	55	kunić	1/60,000	CellSignaling	5568S
GAP43	43	miš	1/10,000	Sigma-Aldrich®	
Sinaptofizin, (Synaptophysin, clone SY38)	38	miš	1/10,000	Millipore	MAB5258-50UG
CASP3	32	kunić	1/10000	Abcam	ab32351

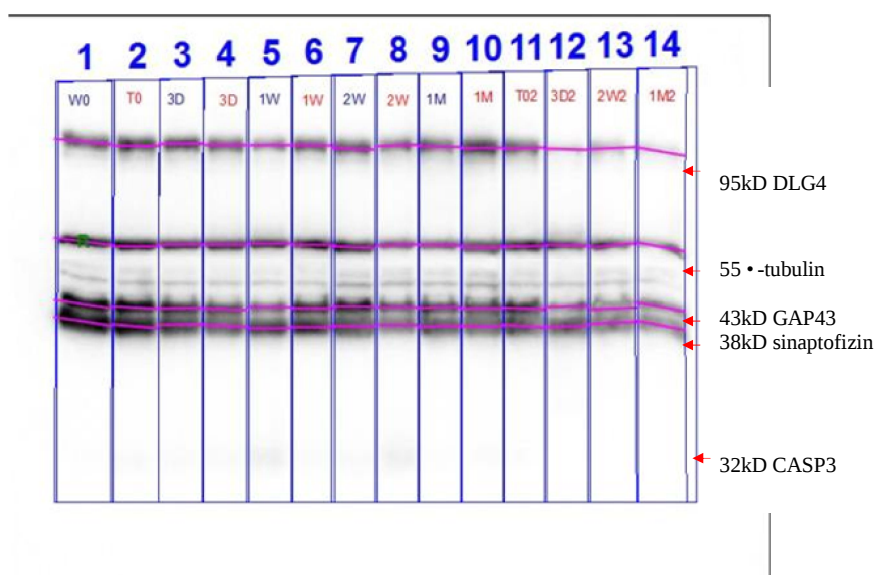
Nakon inkubacije primarnim protutijelom preko noći na temperature od 4°C, membrane se ispiru 4 puta s PBS-Tween puferom u padajućim koncentracijama mlijeka u prahu.

4.10.5. Obilježavanje sekundarnim protutijelima

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

4.10.6. Prikaz signala kemiluminiscencijom

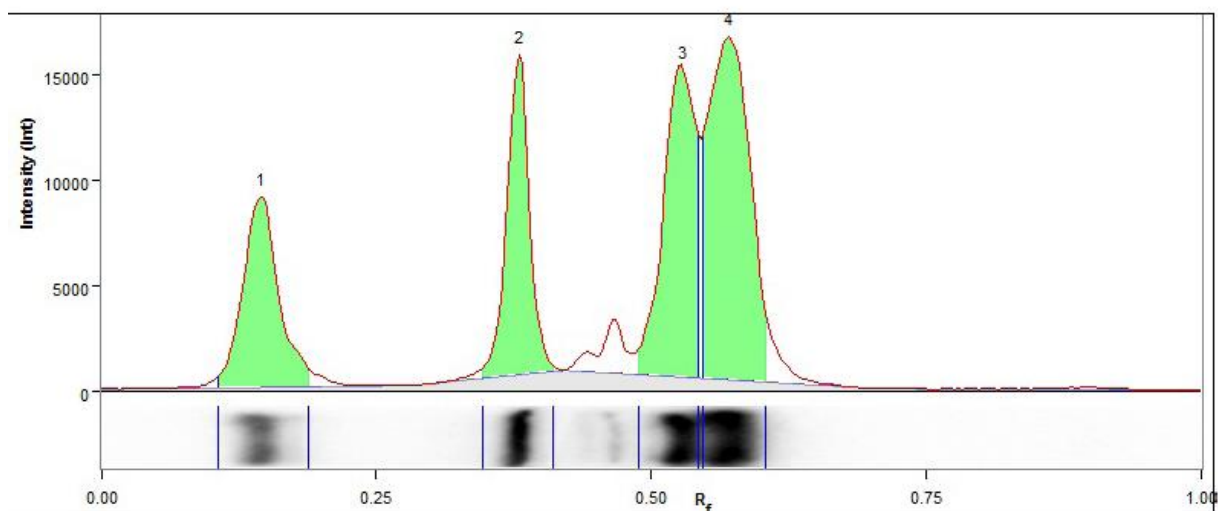
Prikazivanje signala omogućuje kemiluminiscencija koja nastupa uslijed reakcije protutijela i reagensa (Western Lightning[®] ECL Enhanced Chemiluminescence Substrate, PerkinElmer, Waltham, MA, US). Signal se očitava na sustavu ChemiDoc[®] MP System (Biorad[®], Hercules, CA, US) i analizira pomoću softvera Image Lab[®] Software (Slika 19.,20.).



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

Lane And Band Analysis

Lane 1



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

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

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

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

4.11. *In vivo* snimanje bioluminiscencije

4.11.1. Linija miševa za snimanje bioluminiscencije

Za selektivno prikazivanje neurona koji istovremeno izražavaju GAP43 i CASP3 u mozgu živih miševa 1 i 4 dana nakon ishemijske lezije korištena je transgenična mišja linija GAP-43/luc/gfp., koja pod promotorom za gen Gap43 sadrži dvostruki bicistronski reporterski sustav: luciferazu (luc) i zelenu fluorescentnu bjelančevinu (engl. green fluorescent protein, gfp) (162). Budući da crna boja mišjeg krzna (pigment melanin) apsorbira dio svjetlosnog spektra iznad 600 nm i raspršuje signal, krzno je uklonjeno električnim brijalom aparatom sa područja lubanje, dok bi idealan uzorak predstavljala albino mišja linija istog genotipa.

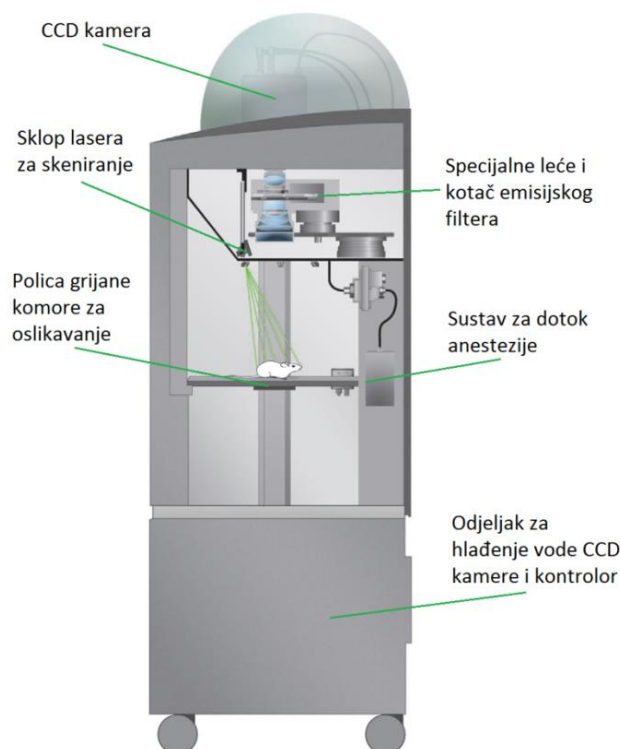
4.11.2. Supstrat za bioluminiscenciju

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

4.11.3. Protokol bioluminiscencije

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

Ukratko, 25 minuta prije samog snimanja miševima je intraperitonealno injiciran supstrat VivoGlo[®] Caspase 3/7 u volumenu 10 µl/g tjelesne težine. Neposredno prije početka snimanja miševi su anestetizirani u indukcijskoj komori. Miševi su potom premješteni u IVIS[®] 200, gdje su položeni na grijanu podlogu u potrbušnom položaju, sa njužkom u otvoru kroz koji je dotjecao inhalacijski anestetik (2% izofluran u 100% kisiku, 1L/min). Mjerenje bioluminiscentnog signala provedeno je pomoću CCD kamere visoke osjetljivosti i rezolucije kojom su zabilježene emitirane valne duljine između 300 i 660 nm. Vrijeme ekspozicije bilo je 2 minute, na području 4 x 4 cm, pomoću visokog stupnja zaprimanja informacija o rezoluciji, te visoke osjetljivosti (engl. *high binning*), uz aperturu leće f/1.



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

4.11.4. Analiza signala bioluminiscencije

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

4.12. Statistička obrada podataka

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

U usporedbi divljeg tipa (WT) kao kontrole i Tlr2^{-/-} po vremenskim točkama (izražaj bjelaničevina, testovi ponašanja, analiza krvnih žila i aksona) korišten je 2-strani ANOVA test za ponovljena mjerenja. Vrijednosti pojedinih skupina po vremenskim točkama uspoređivane su dvostranim T-testom. Radi višestrukih usporedbi korištena je Bonferronijeva korekcija za multiplicitet.

Prilikom označavanja razlika u rezultatima dobivenih kvantitativnim real-time RT-PCR-om, sve statistički značajne razlike su se označavale na grafovima pomoću * oznake, no zato su usporedbe apsolutnih vrijednosti po vremenskim točkama za pojedini genotip prikazane odvojeno od usporedbi relativnih vrijednosti između genotipova.

Razina značajnosti na ostalim grafovima izrazila se za sve pojedine analize, a za razinu statistički značajne razlike uzimala se vrijednost od $P \leq 0,05$.

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

Za razlike između tretirane i netretirane skupine istog genotipa korištene su oznake #, ##, ### za WT, odnosno #, ##, ### za Tlr2^{-/-}.

Za razlike između kontrola divljeg tipa i Tlr2^{-/-} tretiranih s MCAO korištene su oznake i, ii, iii, odnosno i, ii, iii za razlike između kontrola Tlr2^{-/-} životinja i WT tretiranih s MCAO (Tablica 12.)

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

Skupine u usporedbi	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.01$	$P \leq 0.001$
WT kontrola vs. WT MCAO	#	##	###
Tlr2 ^{-/-} kontrola vs. Tlr2 ^{-/-} MCAO	#	##	###
WT kontrola vs. Tlr2 kontrola	+	++	+++
WT kontrola vs. Tlr2 ^{-/-} MCAO	i	ii	iii
Tlr2 kontrola vs. WT MCAO	i	ii	iii
WT MCAO vs. Tlr2 ^{-/-} MCAO	*	**	***

5. REZULTATI

Cilj ovog rada bio je istrađiti utjecaj TLR2 kao posrednika urođenog upalnog odgovora na sinaptičku plastičnost i oporavak miševa nakon ishemijske ozljede.

Kako bi se to postiglo određeni su specifični ciljevi pokusa kojima se trebalo odrediti razlike u funkcionalnom oporavku i reaktivnoj sinaptogenezi u mišem mozgu nakon MCAO između miševa divljeg tipa C57Bl/6 i miševa s onemogućenim Tlr2 genom (Tlr2^{-/-}).

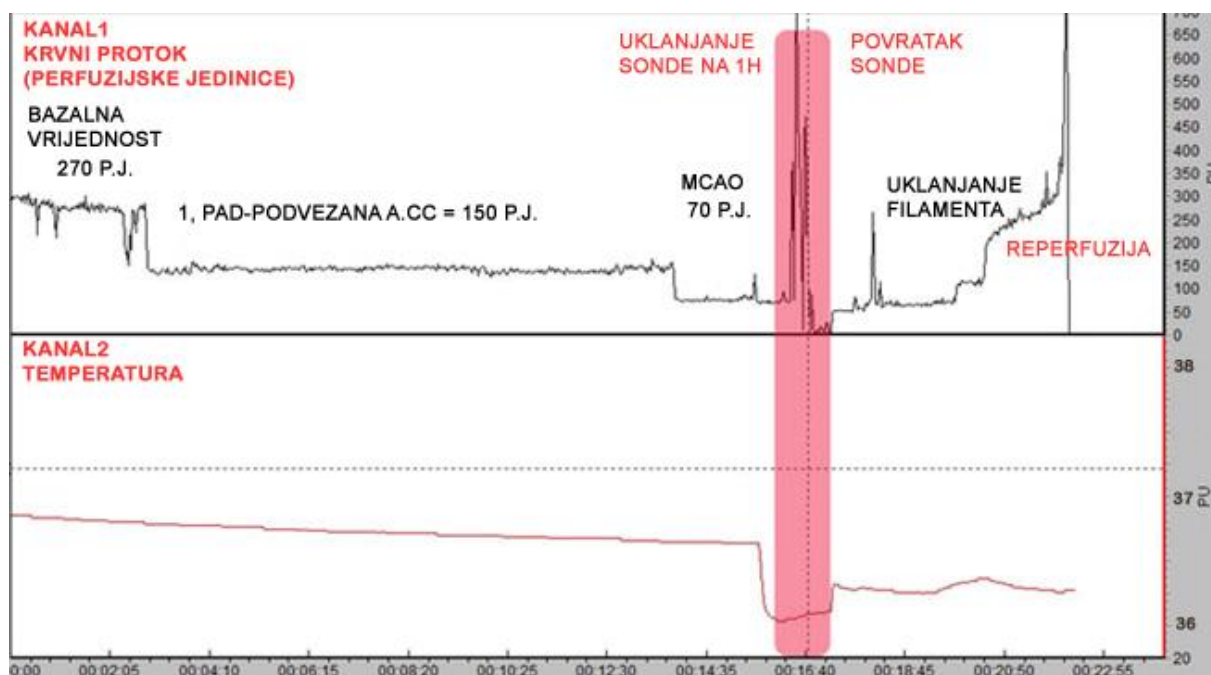
Model ishemije koji se koristio u ovom radu zahtijevao je ujednađavanje veličine lezije kod viših miševa, a koju provodi ista osoba, kako je objašnjeno u Uzorcima i postupcima (3.4.3. Izbjegavanje limbenika posredne povezanosti pri MCAO). Potom se pristupilo analizi funkcionalnog oporavka po vremenskim točkama te analizi izražaja limbenika signalnog puta TLR2, sinaptogeneze, aksonogeneze i angiogeneze koje predstavljaju molekularnu i tkivnu osnovu oštećenja odnosno povrata ledirane funkcije.

5.1. Uspostava i standardizacija mišjeg modela ishemijskog oštećenja

5.1.1. Mjerenje protoka na teritoriju MCA potvrđuje privremenu ishemiju mozga

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

Poljetni se protok kretao oko 500-550 jedinica, da bi se prilikom podvezivanja 1. l'vora dogodio pad za 30% (na otprilike 350 jedinica), a prilikom umetanja filameta je nastupilo daljnje smanjenje na 40% poljetnog protoka (200-250 jedinica) (Slika 21.). Tijekom reperfuzije poljetni protok se uspostavio kroz 20 do 30 sekundi. 4 životinje su isključene iz pokusa jer nije bilo promjena protoka nakon umetanja filameta, ni nakon opetovanog premještanja sonde. 3 su životinje isključene iz pokusa jer nakon 2 do 3 minute nije nastupila reperfuzija, već je protok nastavio opadati. Tako se zahvaljujući LDF-u moglo neizravno zaključiti kako nastupilo subarahnoidalno krvarenje. To je kasnije potvrđeno obdukcijским nalazom.



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

5.1.2. Metoda MCAO uzrokuje reproducibilno ishemijsko oštećenje mozga

5.1.2.1. Bojanje TTC-om prikazuje prisutnost ishemijskog oštećenja

Kako bi se dokazalo izazivanje lezije MCAO zahvatom, koristilo se bojanje TTC-om, krezil violetom te praćenje tjelesne težine i preživljenja operiranih životinja u pokusu.

Bojanje TTC-om je uobičajeno bojanje za brzo i pouzdano prikazivanje hipoksičnog tkiva mozga te za određivanje veličine ishemijskog područja i penumbre.

TTC se pomoću dehidrogenaza reducira u crveni formazan, poglavito u mitohondrijima živulih stanica. Intenzitet boje korelira s brojem i funkcionalnom aktivnošću mitohondrija (169). Pri tom navedena reakcija ne utječe na kvalitetu izolirane RNA i bjelančevina, što omogućuje daljnje korištenje tkiva u pokusima kao što je qRT-PCR i Western Blot (170). Obzirom da tijekom evolucije ishemijske lezije mozga dolazi do znatnih metaboličkih promjena, tim se bojanjem lako može precijeniti ili potcijeniti nekrotsko oštećenje tkiva (171). Stoga je njegova primjena ograničena na kratke vremenske točke gdje

je nekrotični nukleus ligen živih stanica koje uklanjaju detritus ili pol'nju stvarati glijalni ožiljak.

Bojanje TTC-om pokazalo je prisutnost ishemijske lezije na mozgovima miševa koji su potom korišćeni za RT-PCR i Western Blot postupak u akutnoj vremenskoj točki od 3 dana

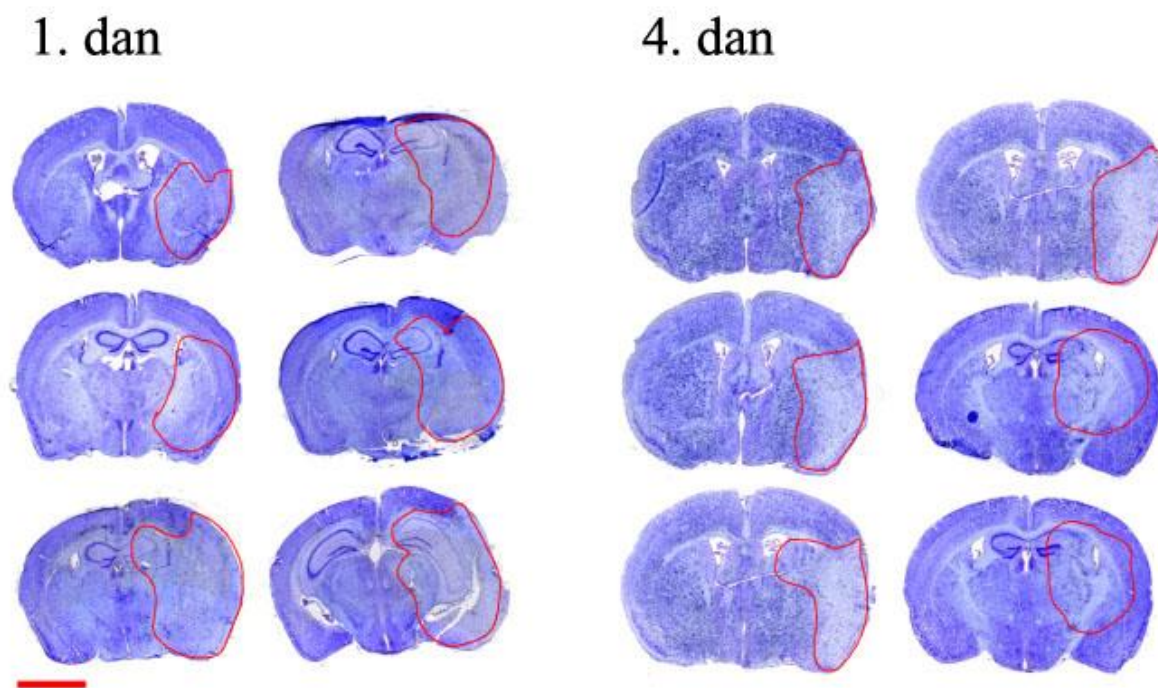


Slika 22. TTC in vitro bojanje koronarnih rezova debljine 2 mm 24h nakon MCAO snimljeno optičkim skenerom. Vitalno tkivo obojeno je crvenim produktom dehidrogenacije formazanom, dok je područje ishemijskog oštećenja ostalo neobojeno. Mjerilo 2 mm.

5.1.2.2. Bojanje krezil violetom pokazuje ishemijsko oštećenje standardne veličine

Bojanje krezil violetom služi za prikaz i izražunavanje veličine ishemijskog oštećenja. Izražunavao se izravni volumen ishemijskog oštećenja. Izravni volumen ishemijskog oštećenja predstavlja volumen lezije vidljiv na histološkim preparatima kao tkivo ipsilateralne hemisfere koje nije uredne histološke građe (svjetlije, edematozno tkivo do 3 dana nakon MCAO) (Slika 24). Izravni volumen ishemijskog oštećenja izražunat je tako da je površina lezije (u mm²) na svakom gustom presjeku kroz mozak umnožena 6 puta te umnožena debljinom presjeka (35 μm). Ishemijska lezija nakon okluzije od 60 minuta obuhvaća korteks, hipokampus i striatum ipsilateralne hemisfere, dok se kontralateralna hemisfera prilikom bojanja krezil violetom može koristiti kao kontrola, obzirom da je jednoližno obojena. Segmentaciju ishemijskog tkiva provodi ocjenjivač koji je slijep za genotipove (WT, Tlr2^{-/-}) i tretman (lažno operirane životinje, životinje s MCAO).

Dobivena prosječna vrijednost volumena ishemijske lezije nakon 24 sata iznosila je 102 mm³ (SD= ± 33 mm³) što je zadovoljen standard prosječnog volumena ishemijske lezije između 90-130 mm³, sa standardnom devijacijom < 40% (172).



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

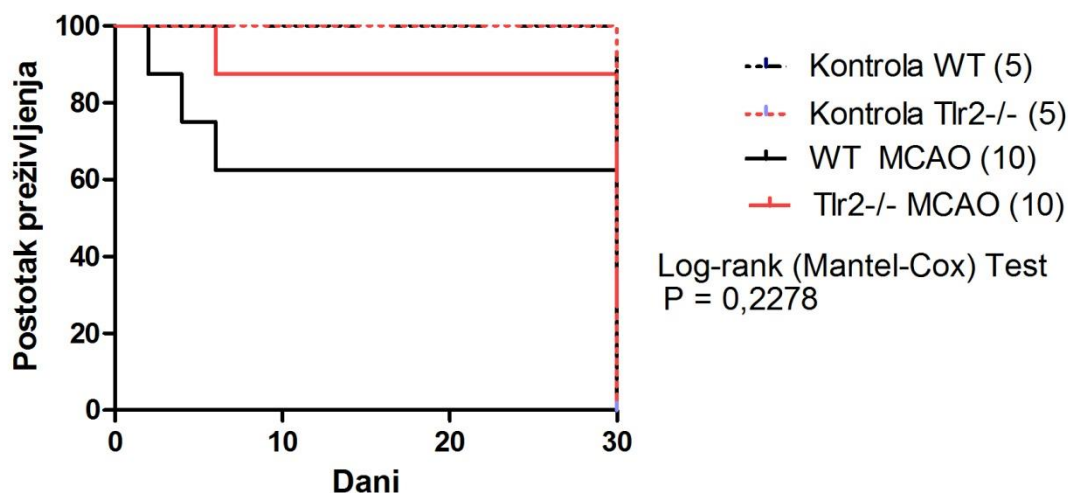
Ranije objavljeno istraživanje dr. Ivana Bohaľeka iz našeg laboratorija bavilo se određivanjem razlike u veličini izravnog i neizravnog volumena ishemijske lezije kod miševa divljeg tipa i Tlr2^{-/-} i u njemu je zaključeno da se kod miševa s onemogućenim Tlr2 genom ishemijska ozljeda povećava u kasnijim vremenskim točkama nakon MCAO (7 i 14 dana), iako je u ranijoj fazi odgovora na ishemijsku leziju (3. dan) volumen lezije manji u odnosu na skupinu miševa divljeg tipa (120). Stoga to nije bio predmet analize ovog doktorata.

5.1.3. Preživljenje nakon MCAO jednako je kod Tlr2^{-/-} i miševa divljeg tipa

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

Tlr2^{-/-}, prema inačici log-rank testa za neparametrijske uzorke (Mantel-Cox) razlika nije statistički značajna ($P=0,2278$).

Iz prikazanog se može zaključiti tek o trendu da životinje s neaktivnim *Tlr2* genom kasnije (4 dan) dostižu humanu krajnju točku u odnosu na svoje kontrole divljeg tipa (WT), što govori u prilog odgođenim zbivanjima upale i nekroze u mozgu bez TLR2.



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

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

5.2.1. Tlr2^{-/-} miševi nakon MCAO manje gube na tjelesnoj težini u odnosu na miševu divljeg tipa

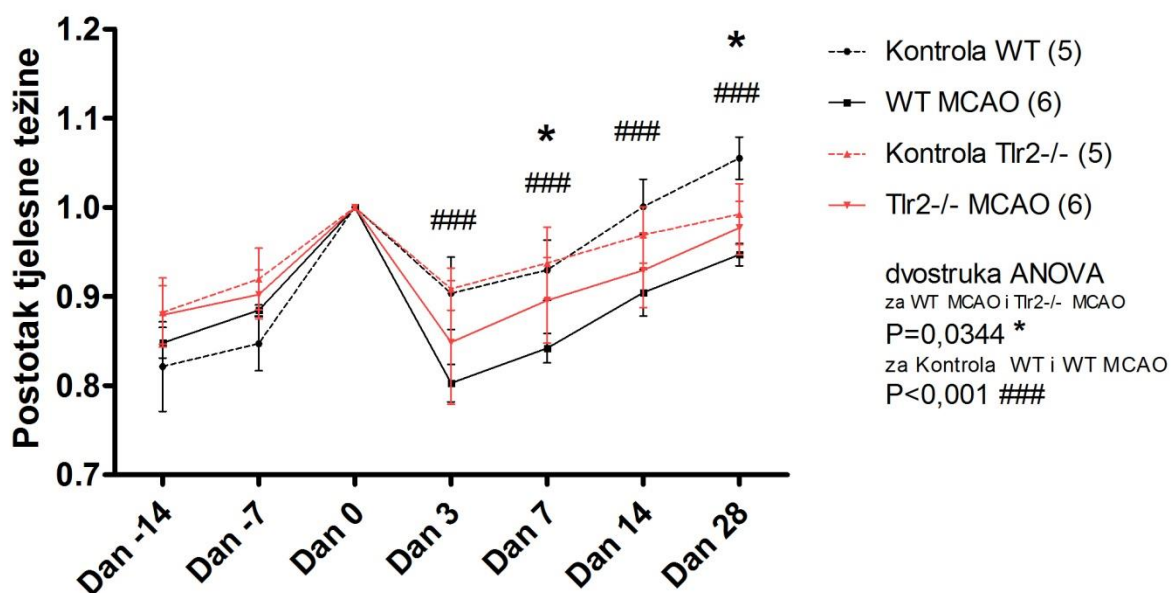
Prosječne tjelesne težine miševa u Danu 0 Tlr2^{-/-} i WT genotipa zadovoljavale su uvjet normalne raspodjele i nisu se statistički značajno razlikovale (24,67g, $SD=\pm 2,534g$ za WT; 24,12 g, $SD=\pm 1,081g$ za Tlr2^{-/-}), te je zornije bilo predložiti kretanje tjelesne težine po pojedinoj životinji tako da je vrijednost u svakoj vremenskoj točki prikazana u odnosu na tjelesnu težinu na dan samog zahvata (Dan 0).

Tijekom oporavka nakon operativnog zahvata bio je oštetan gubitak tjelesne težine uslijed općeg stresa uzrokovanog oštećenjem tkiva na vratu kod kontrolnih životinja, odnosno oštećenja tkiva na vratu i ishemije mozga kod MCAO tretiranih životinja (173).

Praćenje tjelesne težine nakon ishemijskog oštećenja (od 3. do 28. dana) uspoređivano dvostrukim ANOVA testom za ponavljana mjerenja pokazalo je statistički značajnu razliku ($P=0,0344$) između skupina Tlr2^{-/-} i WT s MCAO.

Promatrajući odnos lažno operiranih kontrola za WT i skupine s ishemijskim oštećenjem WT genotipa, uočava se statistički izrazito značajna razlika s $P<0,0001$, dok unutar skupina Tlr2^{-/-} genotipa takva razlika ne postoji (2-struka ANOVA za povezane uzorke Tlr2^{-/-} kontrola i Tlr2^{-/-} s MCAO, $P=0,0889$). Kako bi se potvrdilo da su lažno operirane kontrole predstavljale skupine koje se mogu međusobno uspoređivati, provjereno je postoji li statistička značajna razlika između kretanja tjelesne težine skupina WT i Tlr2^{-/-} bez MCAO te je razina značajnosti od $P=0,2554$ ukazala među njima takve razlike ne postoje.

Dodatnom analizom t-testom po vremenskim točkama nakon zahvata (3. do 28. dan), divlji tipovi s MCAO se u svakom trenutku statistički značajno razlikuju od svojih lažno operiranih kontrola, a 7. i 28. dana imaju statistički značajno manju tjelesnu težinu u odnosu na Tlr2^{-/-} miševe s MCAO ($P=0,027$). Kod Tlr2^{-/-} ne dolazi do takvog statistički značajnog pada kad se uspoređuju lažno operirane kontrole i životinje tretirane s MCAO, niti postoji razlika ako izravno uspoređujemo divlje tipove i Tlr2^{-/-} zahvaćene ishemijom (Slika 24., Tablica 13).



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

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

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

Najmanja tjelesna težina nakon MCAO cijelo vrijeme nakon zahvata je izmjerena kod divljih tipova s ishemijskim oštećenjem 3 dan, a najveća pak održavaju lažno operirani divlji tipovi. Izostanak razlike u tjelesnoj težini kod Tlr2-/- životinja koje su lažno operirane u odnosu na MCAO tretirane Tlr2-/- životinje govori u prilog činjenici da na njihov početni gubitak težine od 3 dana nakon MCAO u najvećoj mjeri utječe sam zahvat otvaranja pristupa lijevoj karotidnoj arteriji, a da ishemijsko oštećenje ne doprinosi značajno njihovoj kaheksiji.

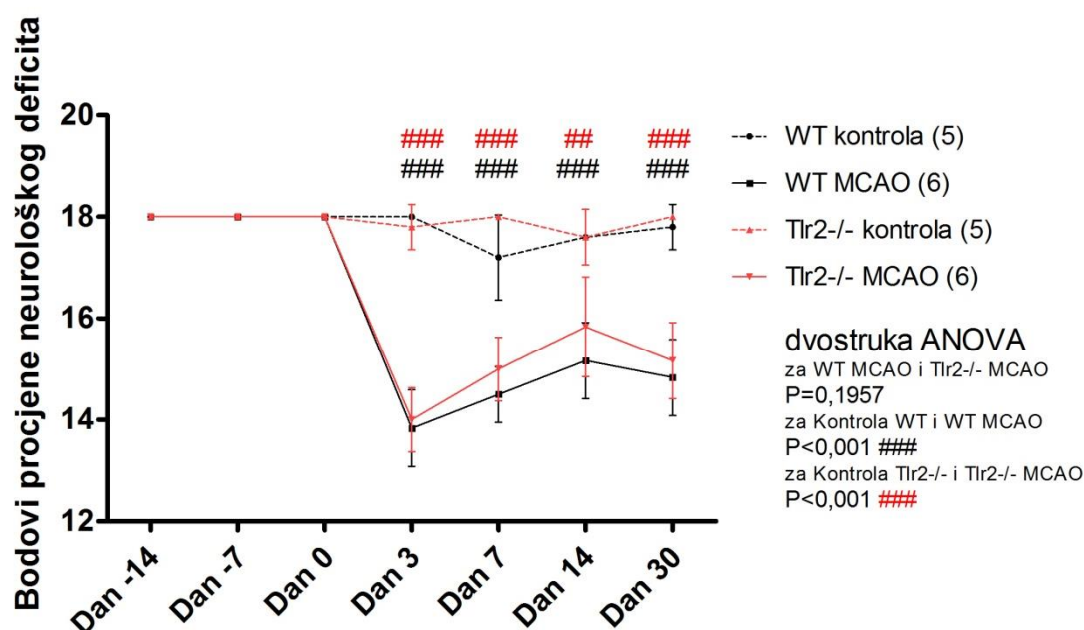
Ishemijsko oštećenje utječe na tjelesnu težinu smanjenjem sposobnosti hvatanja hrane (što je svedeno na najmanju moguću mjeru korištenjem mekane hrane u obliku kačice prvih 7 dana nakon zahvata, vidi Poglavlje 3.4.5 Postoperativna njega), ali i utjecajem na spontano kretanje, što je bilo moguće utvrditi testovima spontanog kretanja kao što su Schallertov cilindar i Y-labirint.

Pri tom se izmjerena tjelesna težina može odraziti na preostale testove ponašanja, osobito one gdje se promatraju ambulatorni parametri (broj dizanja, održavanje na rotarodu) stoga je prilikom analize tih rezultata potrebno u obzir ovdje utvrđene razlike..

5.2.2. Neurološko oštećenje nakon MCAO prisutno je kod oba genotipa

Pratećim neurološkim deficitima u dvostrukom ANOVA testu statistički značajno su identificirani miševi koji su podvrgnuti MCAO zahvatu. Njihovi bodovi neurološkog deficita (najviše 18) su se znatno smanjili u odnosu na lažno operirane kontrole neovisno o genotipu i to s razinom značajnosti $P < 0,001$, dok istim testom nije utvrđena razlika između Tlr2-/- i WT miševa s MCAO ($P = 0,1957$) (Slika 26.).

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



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

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

Neurološko oštećenje (bodovi)	WT kontrola (5)	WT MCAO (6)	P za WT	Tlr2-/- kontrola (5)	Tlr2-/- MCAO (6)	P za Tlr2-/-	P za WT MCAO vs Tlr2-/- MCAO
Dan -14	18± 0	18± 0		18± 0	18± 0		
Dan -7	18± 0	18± 0		18± 0	18± 0		
Dan 0	18± 0	18± 0		18± 0	18± 0		
Dan 3	18± 0	13,83± 0,31	<u><0,0001</u>	17,8± 0,2	14± 0,26	<u><0,0001</u>	0,6867
Dan 7	17,2± 0,37	14,5± 0,22	<u><0,0001</u>	18± 0	15± 0,26	<u><0,0001</u>	0,1739
Dan 14	17,6± 0,24	15,17± 0,31	<u>0,0002</u>	17,6± 0,24	15,83± 0,40	<u>0,0061</u>	0,2167
Dan 30	17,8± 0,2	14,83± 0,31	<u><0,0001</u>	18± 0	15,17± 0,31	<u><0,0001</u>	0,4608

Kod svih miševa s ishemijskim oštećenjem postoji trend poboljšanja do 14. dana i potom kratkog zadržavanja na istoj razini, ili čak opadanja u završnoj vremenskoj točki od 30 dana.

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

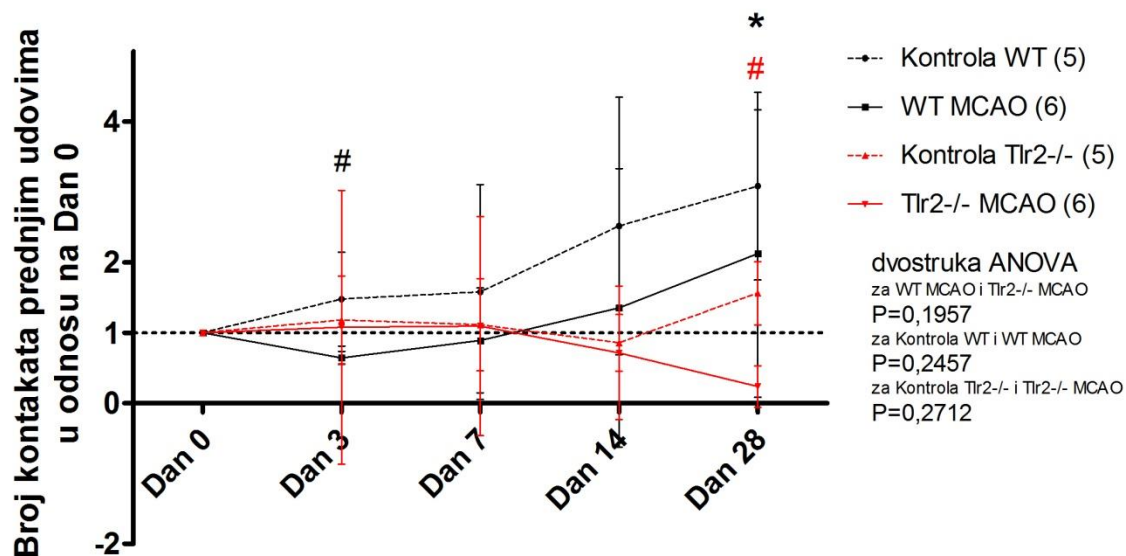
5.2.3.1. Ukupno spontano kretanje u Schallertovom cilindru pokazuje odgođeno oštećenje kod Tlr2^{-/-} u odnosu na miševe divljeg tipa

Ukupno kretanje u Schallertovom cilindru predstavljalo je zbroj svih kontakata prednjim udovima po stijenci cilindra od lijevanog akrilnog stakla (pleksiglasa) i prilikom povratka na tlo. Miševi su bili privikavani na test 2 tjedna prije zahvata, no mjerenja kretanja otpočela su od dana 0.

Ukupni broj kontakata prednjim udovima miševa u Danu 0 za početne vrijednosti Tlr2^{-/-} i WT genotipa zadovoljavao je uvjet normalne raspodjele i skupine se nisu međusobno statistički značajno razlikovale ($16,78 \pm 3,94$ za WT; $11,30 \pm 2,47$ za Tlr2^{-/-}), te je zornije bilo predložiti dinamiku ukupnog broja kontakata po pojedinoj životinji tako da je vrijednost u svakoj vremenskoj točki prikazana u odnosu na početni broj kretanja (Slika 27).

Dvostruka ANOVA za ponovljena mjerenja nije ukazala na statistički značajne razlike između pojedinih skupina nakon ishemijskog oštećenja s $P=0,1957$ između WT i Tlr2^{-/-} s MCAO, te $P=0,02457$ između skupina divljeg tipa (Kontrola WT i WT s MCAO) i $0,2712$ između skupina s onemogućenim Tlr2 genom (Kontrola Tlr2^{-/-} i Tlr2^{-/-} s MCAO).

Lahno operirani WT miševi kontinuirano postupno povećavaju broj kontakata prednjim udovima, što znači da sam zahvat otvaranja pristupa na vratu nije smanjio broj kretnji u odnosu na početne vrijednosti. Skupina WT miševa s ishemijskim oštećenjem zabilježila je statistički značajan početni pad kretnji 3. dan nakon MCAO ($P=0,0134$, t-test), što govori u prilog podležoj akutnoj postishemijskoj upali. Potom se postupno oporavljaju i prate trend svojih lahno operiranih kontrola, no nakon mjesec dana ih još ne uspijevaju dostići (Tablica 15.).



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

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

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

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

Tlr2-/- miševi s ishemijskim oštećenjem održavaju broj kontakata prednjim udovima na početnoj razini sve do blagog pada 2 tjedna nakon MCAO, a potom se u vremenskoj točki od mjesec dana po tom parametru statistički značajno razlikuju od svojih Tlr2-/- lažno operiranih kontrola (s razlikom srednjih vrijednosti od $1,33 \pm 0,23$, 95% IP=od 0,8176 do 1,837, $P=0,0002$).

U istoj se vremenskoj točki (Dan 28), poglavito zahvaljujući naglom padu ukupnog broja kretanja kod Tlr2-/- s MCAO, pojavila i statistički značajna razlika između divljeg tipa i Tlr2-/-

s MCAO gdje su miševi Tlr2^{-/-} genotipa u prosjeku imali za 189% ± 84% manje kretnji (95% IP= 1% do 376%, P=0,049)

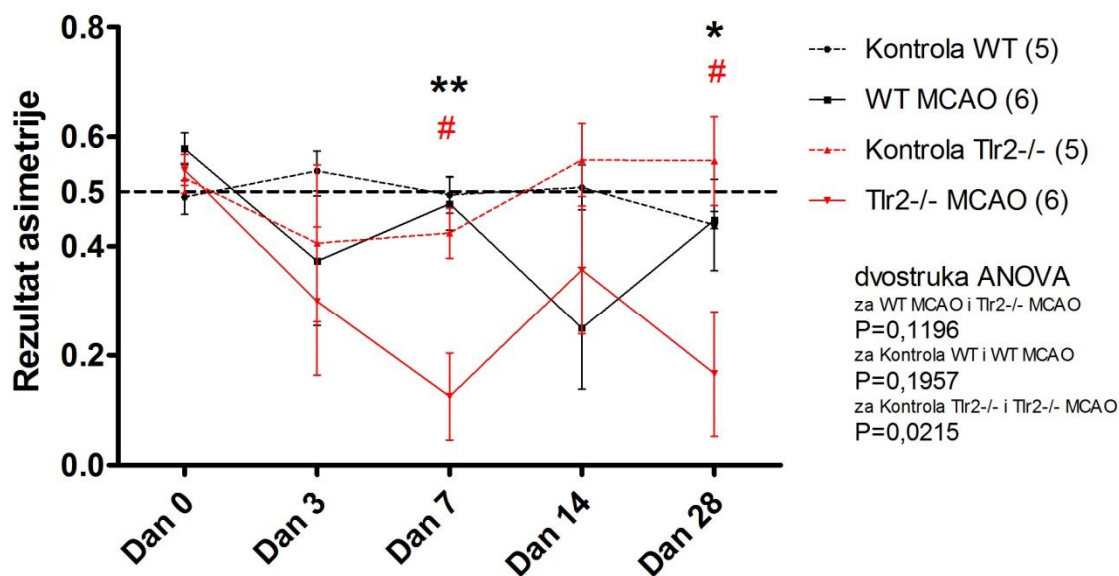
To upućuje na zaključak da ishemijsko oštećenje amplificira razlike u ukupnoj količini spontanijih kretnji između divljeg tipa i Tlr2^{-/-} do razine statističke značajnosti. Pored toga, miševi s djelatnim TLR2 (WT) razvijaju akutno motoričko oštećenje s postupnim oporavkom nakon Dana 3, dok miševi bez djelatnog TLR2 (Tlr2^{-/-}) nakon 7 dana polinju smanjivati broj svojih spontanijih kretnji te postignu najmanju vrijednost Dana 28, kad se dovoljno statistički razlikuju i od svojih lažno operiranih kontrola i od divljih tipova s MCAO.

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

Schallertov rezultat asimetrije prikazuje preferenciju životinje da koristi jedan od prednjih udova u odnosu na drugi. Testom dvostruke ANOVA-e nisu utvrđene statistički značajne razlike između pojedinih skupina (Slika 28.). No, analize unutar vremenskih točaka su pokazale kako se 7 dana nakon MCAO rezultat asimetrije statistički značajno razlikovao između divljeg tipa i Tlr2^{-/-} s MCAO s izraženijom asimetrijom uporabe prednjih udova kod miševa bez TLR2 (srednja razlika -0,35, 95% IP= od 0,15 do 0,56, P=0,0034). Istovremeno se javlja i statistički značajna razlika između skupina Tlr2^{-/-} genotipa, gdje Tlr2^{-/-} miševi s MCAO rezultatom od 0,125 značajno odstupaju od normalne vrijednosti od 0,5 i vrijednosti svojih lažno operiranih kontrola (P=0,0218).

Potom 14. dana ta razlika nakratko nestaje da bi se opet pojavila 28. dana nakon MCAO. Tada se Tlr2^{-/-} miševi s MCAO statistički značajno razlikuju slabijim korigenjem kontralateralnog uda prikazano rezultatom asimetrije i od svojih lažno operiranih kontrola (P=0,037) i od WT miševa s MCAO (P=0,0343).

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



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

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

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

Uzmu li se u obzir oba parametra dobivena promatranjem u Schallerotvom cilindru, zaključuje se kako Tlr2-/– miševi imaju općenito manje kretnji uspravljanja u odnosu na miševe divljeg tipa. To doprinosi njihovom povratu izgubljene tjelesne težine nakon zahvata i njenom održavanju.

Tlr2-/– s MCAO imaju statistički značajno izraženiju asimetriju prilikom uporabe prednjih udova u odnosu na divlje tipove u subakutnoj fazi, 7. dana nakon zahvata, a potom ta razlika nakratko nestaje te se ponovno pojavljuje 28. dana.

U kroničnoj fazi uočljiva je jasna asimetrija korigiranja udova kod Tlr2-/- životinja tretiranih s MCAO u odnosu na njihove kontrole istog genotipa, za razliku od miševa divljeg tipa kod kojih postoji tendencija asimetričnom korigiranju prednjih udova kod životinja s ishemijskim oštećenjem, ali ona nikada ne prelazi razinu statističke značajnosti u usporedbi s njihovim lažno operiranim kontrolama.

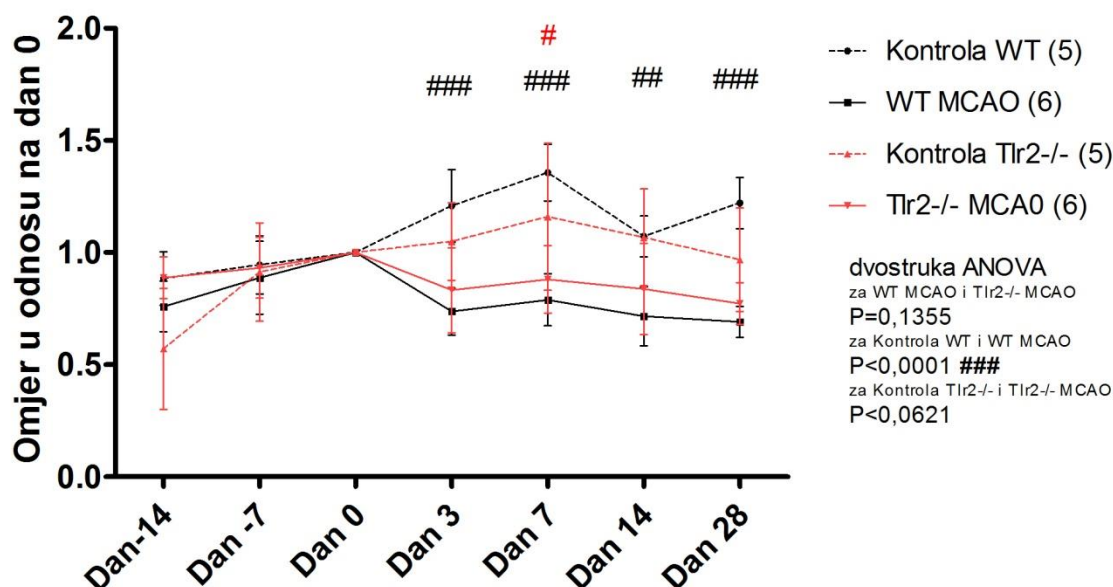
Dok ukupni broj spontanog kretanja pokazuje opću razinu aktivnosti, rezultat asimetrije je specifičan za identifikaciju neurološkog simptoma koji je ekvivalent hemiparezi.

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

Dok se u Schallertovom cilindru promatrala spontana aktivnost, ubrzavajući rotarodom promatrala se prinudna motorna koordinacija i ravnoteža.

Kontrole divljih tipova nastavljaju napredovati u svojim rezultatima nakon zahvata 3. dan na 121% i 7. dan 136% u odnosu na početne vrijednosti ustanovljene na Dan 0. Stoga otvaranje pristupa na vratu samo po sebi nije uzrokovalo raniji prekid testa kod divljih tipova. Divlji tipovi s ishemijskim oštećenjem, unatoč svojoj niskoj tjelesnoj težini koja im olakšava kretanje, pokazuju najslabije održavanje na rotarodu u odnosu na preostale ispitivane skupine s naglim padom trajanja testa na 74% početne vrijednosti 3. dan poslije operacije. Potom se njihov prosječni rezultat poboljšava (78%) i stabilizira na 70% vlastitih početnih vrijednosti iz Dana 0 (Slika 30., Tablica 17.).

Na, analize unutar vremenskih točaka su pokazale kako se 7 dana nakon MCAO rezultat asimetrije statistički značajno razlikovao između divljeg tipa i Tlr2-/- s MCAO s izraženijom asimetrijom uporabe prednjih udova kod miševa bez TLR2 (srednja razlika -0,35, 95% IP= od 0,15 do 0,56, $P=0,0034$). Istovremeno se javlja i statistički značajna razlika između skupina Tlr2-/- genotipa, gdje Tlr2-/- miševi s MCAO rezultatom od 0,125 značajno odstupaju od normalne vrijednosti od 0,5 i vrijednosti svojih lažno operiranih kontrola ($P=0,0218$). Potom 14. dana ta razlika nakratko nestaje da bi se opet pojavila 28. dana nakon MCAO. Tad se Tlr2-/- miševi s MCAO statistički značajno razlikuju slabijim korigiranjem kontralateralnog uda prikazano rezultatom asimetrije i od svojih lažno operiranih kontrola ($P=0,037$) i od WT miševa s MCAO ($P=0,0343$). Divlji tipovi ne pokazuju razliku u rezultatu asimetrije nakon MCAO u odnosu na svoje lažno operirane kontrole ni u jednoj vremenskoj točki (Slika 29).



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

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

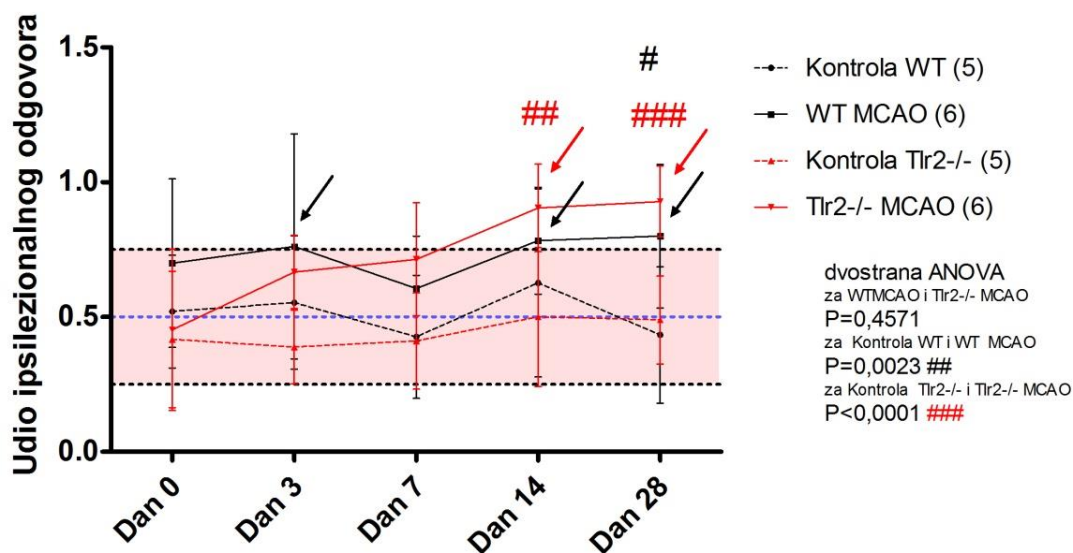
Vrijeme	Kontrola WT (5)	WT MCAO (6)	P za WT	Kontrola Tlr2-/-(5)	Tlr2-/-(6)	P za Tlr2-/-	P za WT MCAO vs Tlr2-/-(MCAO)
Dan -14	0,884± 0,048	0,759± 0,046		0,570± 0,121	0,888± 0,038		
Dan -7	0,945± 0,053	0,888± 0,066		0,913± 0,098	0,932± 0,056		
Dan 0	1	1		1	1		
Dan 3	1,208± 0,066	0,737± 0,043	0,0001	1,049±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

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

operirani miševi Tlr2^{-/-} genotipa sporije oporavljaju od zahvata u odnosu na svoje lažno operirane kontrole divljeg tipa, no bez identificirane statistički značajne razlike. To ukazuje na znatno opterećenje samog zahvata, sa i bez ishemije, na sposobnost životinja Tlr2^{-/-} genotipa da se održavaju na rotarodu, dok je kod životinja divljeg tipa utjecaj ishemijskog opterećenja onaj koji je presudan za performanse na rotarodu. Ishemijsko opterećenje samo po sebi slabije pogađa Tlr2^{-/-} miševe u pogledu održavanja na ubrzavajućem rotarodu, te se značajno olakšuje tek 7. dana što je odgođeno u odnosu na miševe divljeg tipa koji se značajno lošije održavaju u testu već 3. dana nakon MCAO. Tlr2^{-/-} miševi s MCAO su u svakoj vremenskoj točki postizali bolje rezultate od svojih kontrola divljeg tipa s MCAO, no ni u jednom trenutku ta razlika nije statistički značajna.

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

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



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

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

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

Dvostranim ANOVA testom za ponovljena mjerenja statistički izrazito značajna razlika pokazala se samo pri usporedbi Tlr2-/- miševa s MCAO i njihovim lažno operiranim kontrolama ($P < 0,0001$), dok takva razlika nije nađena između skupina divljeg tipa ($P = 0,0023$), niti u usporedbi WT i Tlr2-/- miševa s MCAO ($P = 0,4571$).

Kontrolne skupine lažno operiranih miševa za oba genotipa ni u jednoj vremenskoj točki nisu prelazile raspon standardne devijacije od 25% do 75%. Kako bi se pojedini rezultat razmatrao kao statistički značajno različit, on prvo mora prelaziti navedene granice, a tek ga se potom uspoređivalo s prosječnom vrijednosti i varijancom kontrolne skupine.

Skupina WT miševa s MCAO je 3. dan nakon zahvata prosječnom vrijednosti testa od 76,2% prešla rub zone SD-a (od 25% do 75%). Potom je u subakutnoj vremenskoj točki od 7. dana rezultat nakratko ušao u normalni raspon sa 60,6% da bi ponovno porastao u kroničnim vremenskim točkama od 14. dana na 78,3% i 80% 28. dana nakon zahvata (Slika 38, Tablica 18.). Obzirom na varijancu kontrolne skupine, WT s MCAO se statistički značajno razlikuju od lažno operiranih WT miševa samo 28. dana s prosječnom razlikom od 37% (95% IP= 72% do 9,8%, $P = 0,0452$).

Kod Tlr2-/- miševa s MCAO akutna reakcija 3. dana nije bila tako izrazita kao kod divljeg tipa, te je sa 66,7% ostala unutar zone SD-a. Sedmi dan je nastupilo blago povećanje na 71,4%, da bi tek u kroničnim vremenskim točkama izašla iz zone SD-a sa 90,5% 14. dana i 92,8% 28. dana, te pri tom u oba slučaja premažila vrijednosti divljih tipova s MCAO.

U iste se dvije vremenske točke ta skupina statistički značajno razlikovala od svojih lažno operiranih kontrola Tlr2-/- genotipa tako da je udio ipsilezionalnog odgovora bio u prosjeku

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

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

Lažno operirani miševi oba genotipa uklanjali su naljepnice u prosjeku unutar prvih 10 sekundi od kontaktiranja, kao što je bio slučaj prilikom mjerenja za početne vrijednosti kod skupina koje su kasnije bile podvrgnute ishemijskom oštećenju.

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

U istoj vremenskoj točki od 3 dana, Tlr2-/- životinje također reagiraju produljenjem latencije u odnosu na vlastite lažno operirane kontrole za u prosjeku 49 sekundi (95% IP=13,82" do 84,21", $P<0,001$), no je još uvijek statistički značajno kraće u odnosu na WT skupinu s MCAO i to u prosjeku za 54,2 sekunde (95% IP= 87,72" do 20,6", $P<0,001$).

To navodi na zaključak da su aspekti akutne upale koji djeluju na reakciju na podražaj dodira manje izraženi kod miševa bez TLR2.

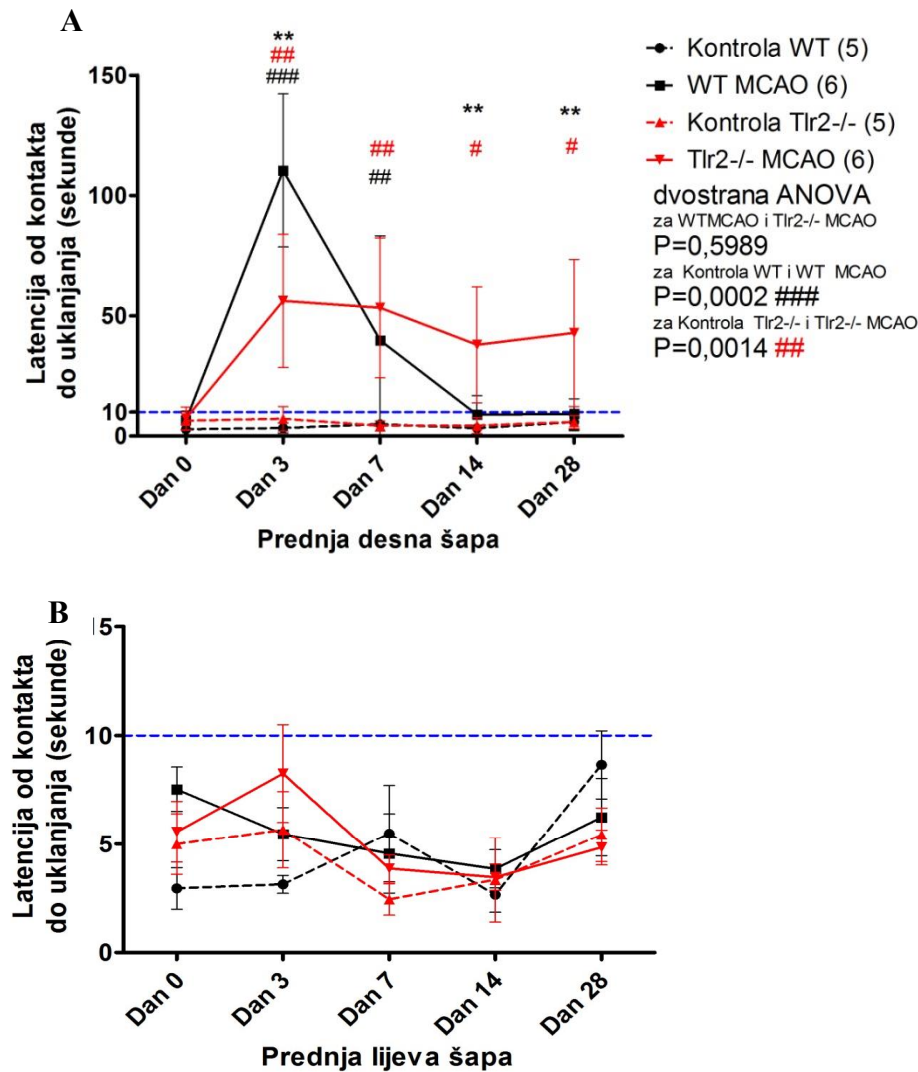
U subakutnoj vremenskoj točki od 7 dana kod skupine WT s MCAO uočen je pad latencije u odnosu na prethodno mjerenje, no ona je još uvijek statistički značajno dulja u odnosu na lažno operirane kontrole i to u prosjeku za 34,93 sekunde (95%IP= -0,27" do 70,1", $<0,01$).

U istoj vremenskoj točki Tlr2-/- miševi s MCAO zadržavaju otprilike isto vrijeme latencije kao i 3. dana i dalje se statistički izrazito značajno razlikuju od svojih lažno operiranih kontrola za u prosjeku 49 sekundi (95%IP= 13,92" do 84,31", $IP<0,001$).

Uspoređuju li se skupine miševa s MCAO različitih genotipa, u ovoj vremenskoj točki ne postoji statistički značajna razlika.

No trend opadanja latencije se i dalje nastavlja kod WT miševa s MCAO te razlika u odnosu na odgovarajuće kontrole 14. dan iznosi u prosjeku 5,3 sekundi, odnosno 3,3 sekunde 28. dana i nije statistički značajna.

Tlr2-/- miševi s MCAO pak održavaju statistički značajnu razliku u odnosu na vlastite kontrole i nadalje 14. dana u prosjeku 33,58 sekundi dulje (95% IP= -1,6" do 68,8", $P<0,05$), te je potom 28. dana ponovno povećavaju u prosjeku 37 sekundi dulje (95% IP= 1,8" do 72,2", $P<0,01$).



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

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

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

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

Takvi rezultati govore u prilog slabijem početnom oštećenju osjeta dodira, no njegovom duljem perzistiranju bez TLR2, uključujući i detektirano pogoršanje u kroničnoj fazi mjesec dana nakon ishemije.

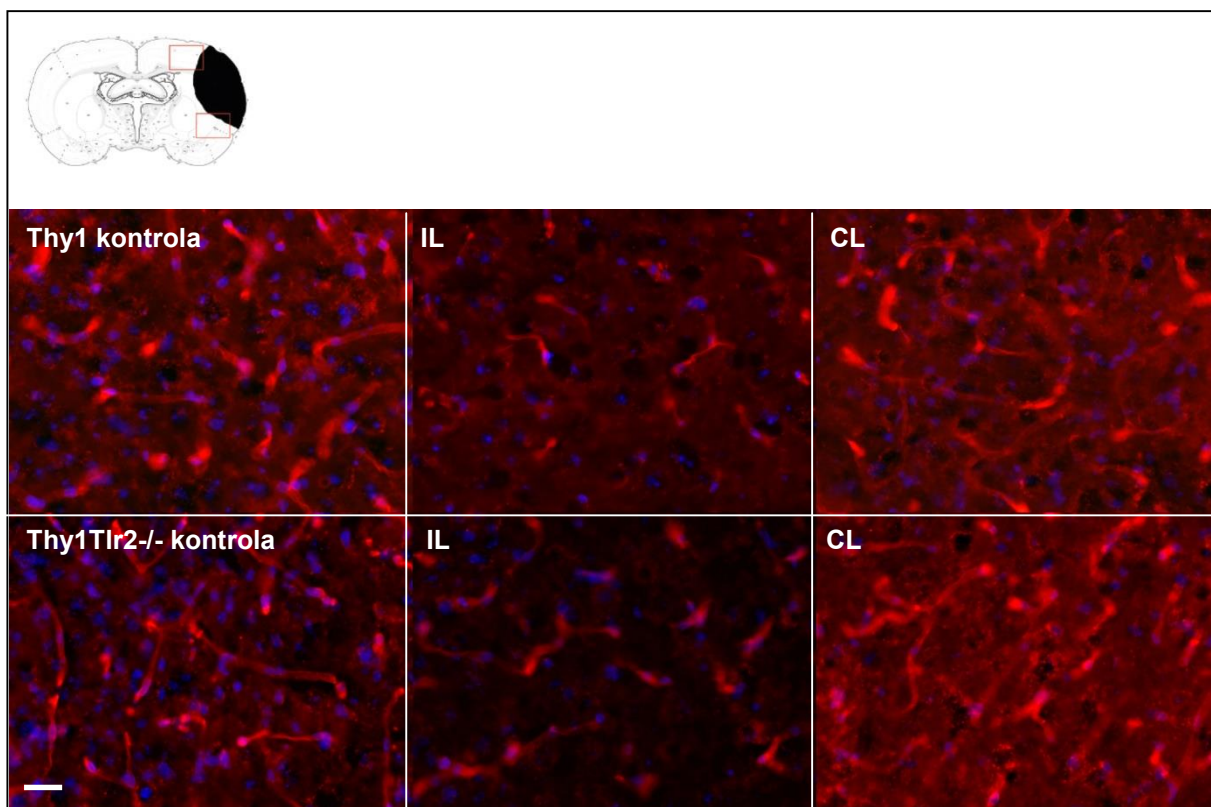
Promatrajući lijevu prednju nogu koja je ipsilezionalni ud te je inervirana zdravim kontralateralnim korteksom, ne nalazi se statistički značajnih razlika i vremena latencije ostaju unutar prosječnih početnih 10 sekundi (Slika 32.B).

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

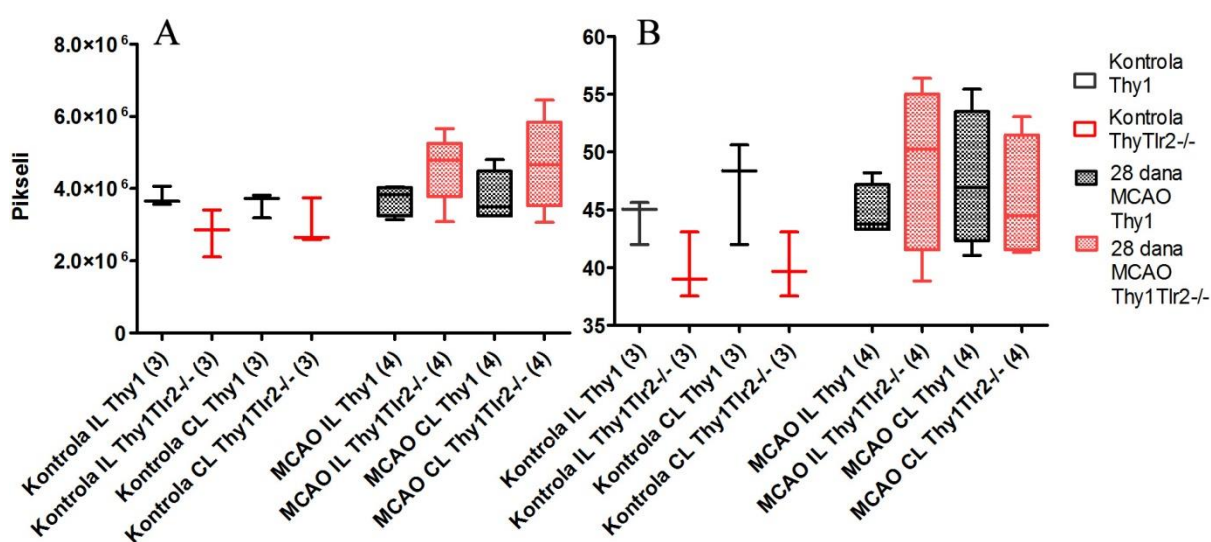
Obzirom da je izražaj TLR2 induciran u endotelnim stanicama u uvjetima upale, pristupilo se analizi krvnih žila moždane kore (102). Za mjerenje utjecaja nedostatka TLR2 u uspostavljanju funkcionalne i zrele mikrocirkulacije nakon ishemijskog oštećenja u perilezionalnom području odabrana je kronična vremenska točka od 28 dana nakon MCAO (174).

Bojanje lektinom iz rajčice za krvne žile dalo je uvid u parametre mikrocirkulacije ishemijske moždane kore u odnosu na zdrave kontrole za oba genotipa (Slika 32.). Korigirani su rezovi tkiva Thy1 i Thy1Tlr2-/- miševa koji su kasnije posluhili za bojanje neurona i njihovih nastavaka, te se time smanjio broj životinja potrebnih za pokuse.

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



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



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

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

Površina (pikseli)	Thy1			Thy1Tlr2-/-			Thy1 vs Thy1Tlr2- /-
		P s IL 0	P IL28		P s IL0	P IL28	
Kontrola IL	3,76*10 ⁶ ± 154445	0,5	/ CL28	2,79*10 ⁶ ± 377788	0,5	/ CL28	0,0759
Kontrola CL	3,58*10 ⁶ ± 195936			2,99*10 ⁶ ± 375720			0,2412
MCAO IL	3,67*10 ⁶ ± 182844	0,7857	0,2213	4,57*10 ⁶ ± 419877	0,0714	0,8551	0,0841
MCAO CL	3,79*10 ⁶ ± 304422	0,7857		4,68*10 ⁶ ± 571255	0,0714		0,2056
Promjer (pikseli)							
		P s IL 0	P IL28		P s IL0	P IL28	
Kontrola IL	44,22± 1,128	0,5	/ CL28	39,88± 1,660	1	/ CL28	0,2
Kontrola CL	47± 2,587			40,10± 1,616			0,2
MCAO IL	44,75± 1,165	1	0,4402	48,93± 3,674	0,2286	0,4853	0,3195
MCAO CL	47,59± 2,976	0,4		45,84± 2,687	0,2286		0,6788

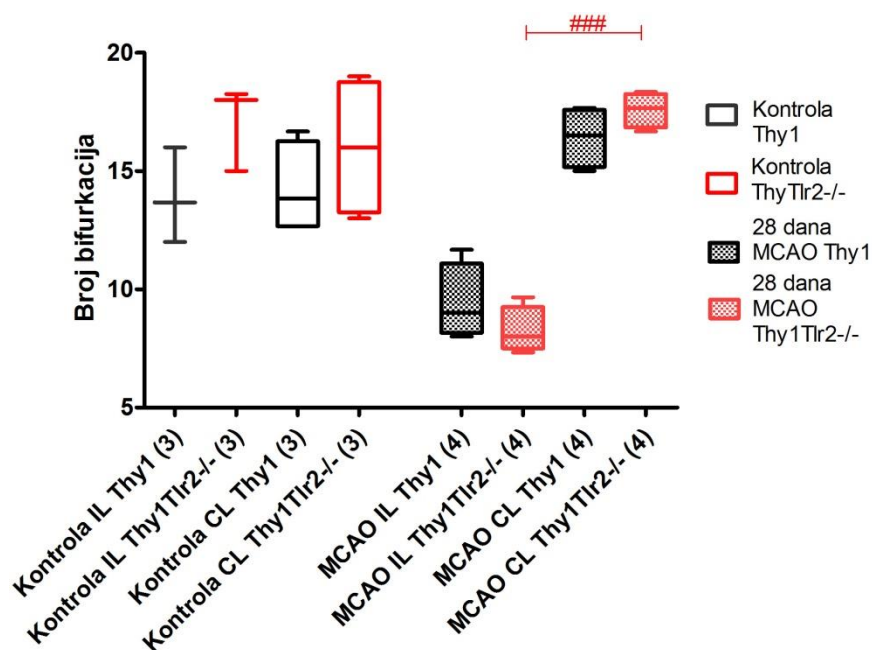
Prosječan broj granjanja krvnih žila (bifurkacija) po vidnom polju je kod Thy1 ukupno za obje hemisfere iznosio je 14,10 (SD=±1,813), odnosno 16,46 (SD=±2,4) kod ThyTlr2-/- miševa te nisu postojale statistički značajne razlike početnog stanja uspoređivano dvostranim t-testom za nezavisne uzroke (P=0,0592) (Slika 34., Tablica 21.).

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

U skupini Thy1 miševa s MCAO mjesec dana nakon ishemije broj bifurkacija se smanjio u ipsilateralnoj hemisferi te je iznosio 9,4 (SD=±2,31), dok je u kontralateralnoj hemisferi lagano porastao na 16,42 (SD=±3). T- testom za vezane uzorke utvrđena je statistički značajna razlika obliku smanjenog broja bifurkacija zahvaćene hemisfere u odnosu na nezahvaćenu kod Thy1 miševa mjesec dana nakon MCAO (P=0,0129).

Thy1Tlr2-/- miševi s MCAO su u istoj vremenskoj točki imali izraženiji pad broja bifurkacija u hemisferi zahvaćenoj ishemijom na prosječnu vrijednost od 8,25 (SD=±1,2).

Kontralateralna (desna) hemisfera je pokazala lagani porast broja bifurkacija s prosjekom od 17,6 (SD=±1,75), sličan reakciji kontralateralne hemisfere kod WT skupine. Zahvaljujući tom kontralateralnom porastu, a ipsilateralanom padu broja bifurkacija kod ThyTlr2^{-/-} miševa postoji statistički značajno manji broj bifurkacija u ipsilateralnom korteksu u odnosu na kontralateralni s prosječnom razlikom od 9,33 (95% IP= od 8,034 do 10,63, P<0,0002). Uzimajući u obzir Bonferronijevu korekciju za multiplicitet, u ovom se testu samo ta razlika pokazala kao statistički značajna.



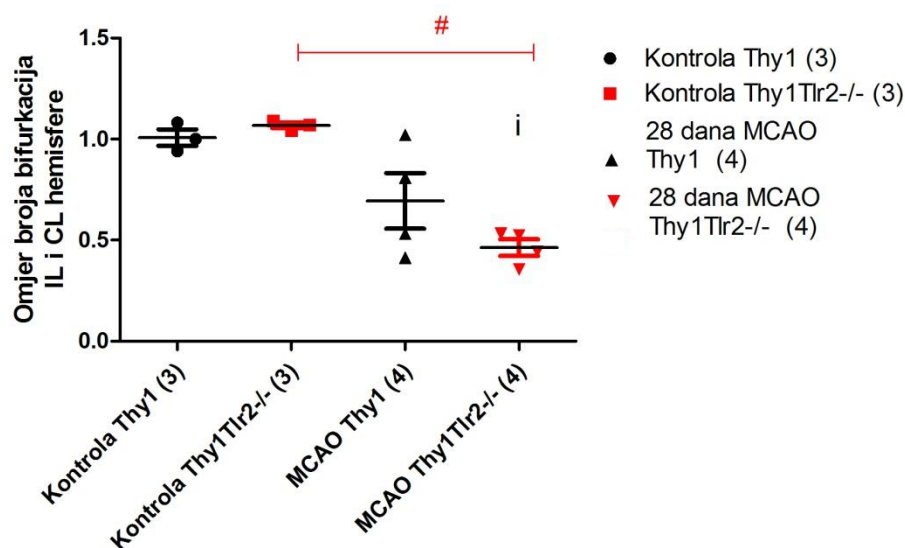
Slika 34. Broj bifurkacija krvnih žila u kori mozga kontrolnih miševa bez ishemije (Kontrola IL Thy1 i Kontrola IL Thy1Tlr2^{-/-}, Kontrola CL Thy1 i Kontrola CL Thy1Tlr2^{-/-}) te ipsilezionalnih (MCAO IL Thy1, MCAO IL Thy1Tlr2^{-/-}) i kontralezionalnih kora mozga (MCAO CL Thy1, MCAO CL Thy1Tlr2^{-/-})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

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

Broj bifurkacija	Thy1			Thy1Tlr2 ^{-/-}			Thy1 vs Thy1Tlr2 ^{-/-}
			P IL28		P s IL0	P IL28	
Kontrola IL	13,89± 1,160	1	/ CL28	17,08± 1,044	0,8845	/ CL28	0,2
Kontrola CL	14,25± 0,9754			16± 1,472			0,3094
MCAO IL	9,417± 0,7979	0,0571	<u>0,0129</u>	8,250± 0,4977	0,0571	<u>0,0002</u>	0,2610
MCAO CL	16,42± 0,6437	0,2286		17,58± 0,3696	1		0,1671

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

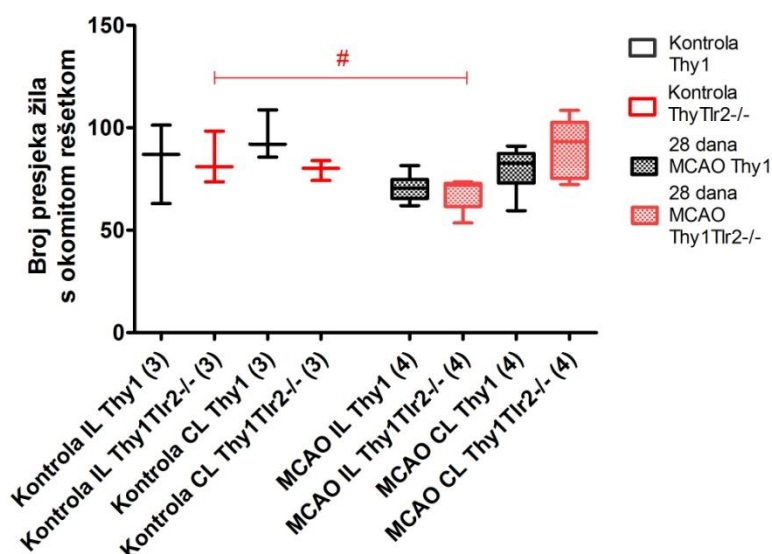
Zahvaljujući ipsilateralnom padu, a kontralateralnom porastu broja bifurkacija, njihov omjer je mjesec dana nakon MCAO kod Thy1 miševa u prosjeku iznosio 69% (SD=± 27%), odnosno 46% (SD=±8%) kod Thy1Tlr2-/- miševa. K tome je taj omjer kod Thy1Tlr2-/- skupine statistički značajno niži od odgovarajuće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



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

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

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



Slika 36. Broj presjeka krvnih žila s okomitom rešetkom u kori mozga kontrolnih životinja bez ishemije (Kontrola IL Thy1, Kontrola IL Thy1Tlr2-/-, Kontrola CL Thy1 i Kontrola CLThy1Tlr2-/-) te ipsilezionalnih (MCAO IL Thy1, MCAO IL Thy1Tlr2-/-) i kontralezionalnih moždanih kora (MCAO CL Thy1, MCAO CL Thy1Tlr2-/-) 28 dana nakon MCAO. Crveno su označene skupine s onemogućenim TLR2.

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

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

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

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

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

Kod Thy1 divljeg tipa za *Tlr2* postoji statistički značajno manji broj presjeka u ipsilateralnoj hemisferi nakon mjesec dana u usporedbi s kontrolom. Prosječno je iznosio $70,80 \pm 2,423$.

Broj presjeka za Thy1Tlr2-/- miševe je mjesec dana nakon ishemije u ipsilateralnoj hemisferi iznosio $68,18 \pm 3,723$, je također bio statistički značajno smanjen u odnosu na kontrolu.

Prilikom usporedbe kontralateralne i ipsilateralne hemisfere mjesec dana nakon ishemije ne postoji statistički značajna razlika za oba genotipa.

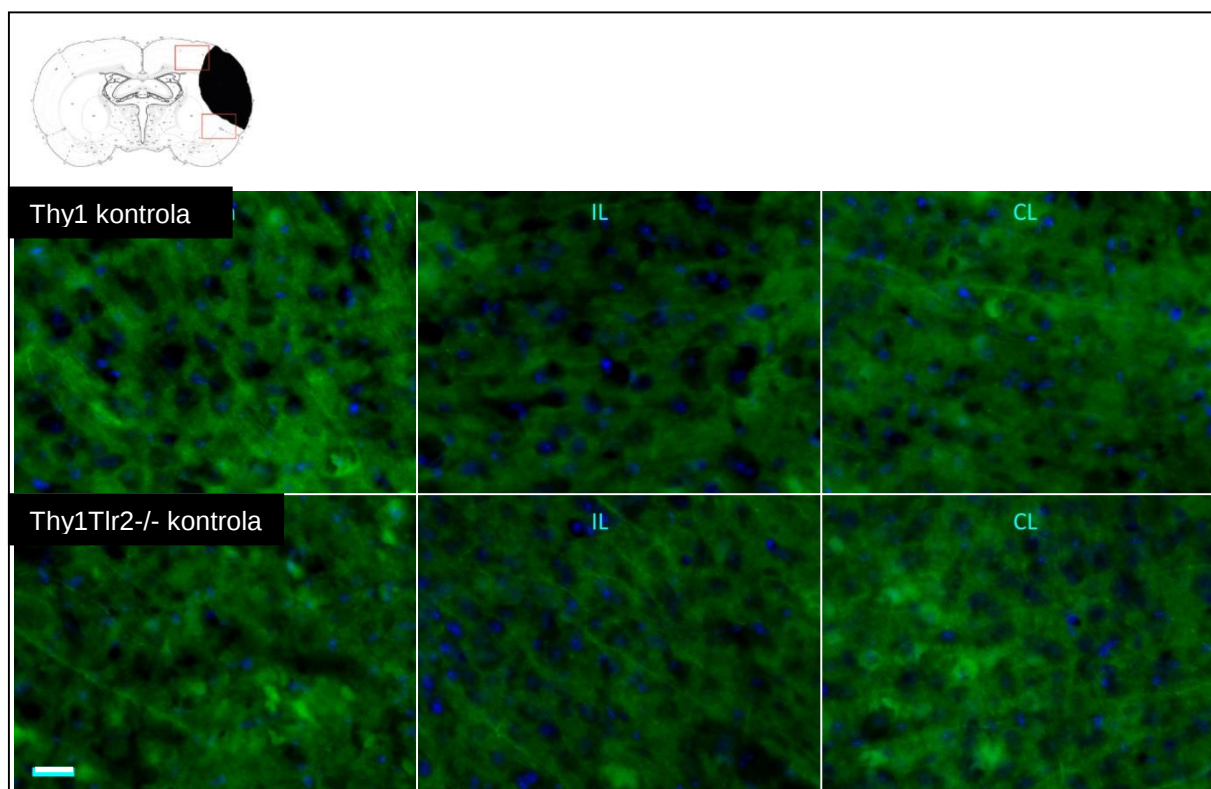
Kontralateralne hemisfere su održale svoj broj presjeka i mjesec dana nakon ishemije kod oba genotipa.

Takav rezultat ukazuje na smanjenje izvijuganosti krvnih žila nakon ishemije kod miševa koji ne posjeduju TLR2. Kako je izvijuganost pokazatelj novih krvnih žila, te obzirom da je broj bifurkacija kod Thy1Tlr2-/- miševa manji, moguće je zaključiti kako su kod miševa koji posjeduju TLR2 nakon mjesec dana žile već sazrele i razgranale se, dok se kod životinja kojima nedostaje TLR2 taj proces sporije odvija.

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

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

Mjerila se optička gustoća ipsilateralne i kontralateralne hemisfere kontrolnih životinja te Thy1 i Thy1Tlr2^{-/-} životinja 1 mjesec nakon MCAO (Slika 37.), te su analizirani omjeri IOD-a za YFP ipsilateralne i kontralateralne hemisfere po životinji.

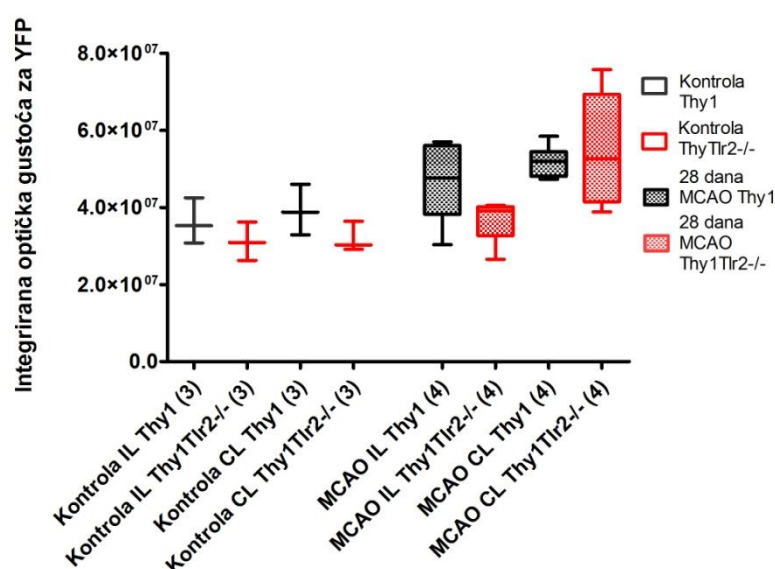


Slika 37. Reprezentativne mikrofotografije fluorescencije žute fluorescentne bjelančevine (YFP, zeleno) i DAPI bojanja staničnih jezgara (plavo), kod lažno operiranih kontrola za Thy1 (Thy1 kontrola) i Thy1Tlr2^{-/-} miševe (Thy1Tlr2^{-/-} kontrola), te njihove odgovarajuće ipsilateralne (IL) i kontralateralne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

Poljetna prosječna vrijednost IOD-a za YFP je bila nešto niža kod Thy1Tlr2^{-/-} miševa (3,1*10⁷ ipsilateralno; 3,2*10⁷ kontralateralno) u odnosu na Thy1 skupinu (3,6*10⁷ ipsilateralno; 3,9*10⁷ kontralateralno). Obzirom da te skupine sadrže po 3 uzorka, u njihovim se daljnjim statističkim usporedbama koristio neparametrijski Mann-Whitney test.

Mjesec dana nakon ishemijskog oštećenja analiziralo se konačno stabilno stanje neuronske mreže uspostavljeno nakon završenog razdoblja akutnih i subakutnih intenzivnih zbivanja upale i pregradnje (nicanje i uklanjanje aksona) (174).

Dok je kod divljeg tipa uočeno blago i simetrično povećanje IOD-a YFP-a u kroničnoj vremenoj točki od 28 dana (4,7*10⁷ ipsilateralno; 5,2*10⁷ kontralateralno), kod miševa bez funkcionalnog TLR2 navedeni parametar ostaje na početnoj razini u ipsilateralnoj hemisferi (3,6*10⁷ ipsilateralno), dok se u kontralateralnoj hemisferi povećava i iznad razina uočenih kod miševa divljeg tipa (5,5*10⁷ kontralateralno), no nisu pronađene statistički značajne razlike (Slika 38.).

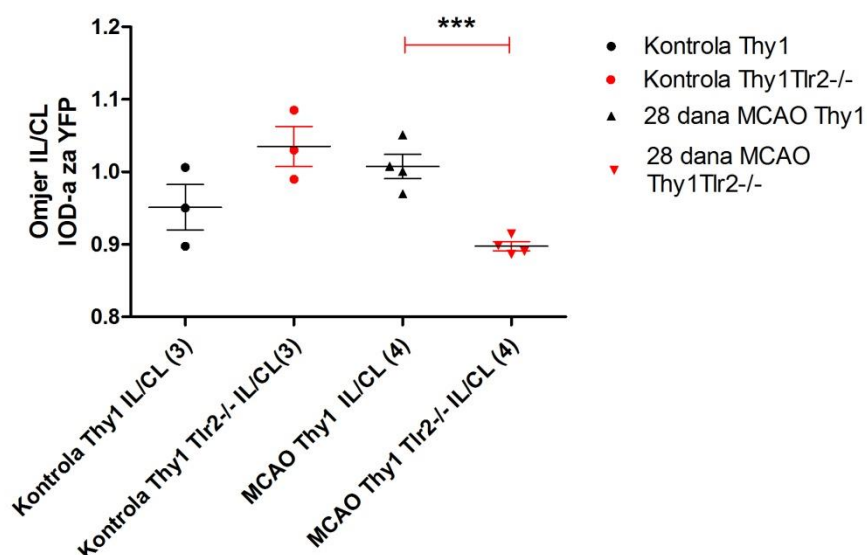


Slika 38. Izmjerene vrijednosti IOD-a za YFP u kori mozga kontrolnih životinja bez ishemije (Kontrola Thy1 IL/CL i Kontrola Thy1Tlr2^{-/-} IL/CL) te životinja tretiranih s MCAO (MCAO Thy1 IL/CL, MCAO Thy1Tlr2^{-/-} IL/CL) 28 dana nakon ishemijskog oštećenja. Crveno su označene skupine s onemogućenim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

Kako bi se istražila navedena asimetrija hemisfera uočena kod Tlr2^{-/-}, u međusobni su omjer stavljeni parovi prosječnih vrijednosti za pojedinu životinju.

Dobiveni omjer IOD-a YFP-a kore mozga ipsilateralne (IL) i kontralateralne (CL) hemisfere se statistički izrazito značajno razlikovao između Thy1 i Thy1Tlr2^{-/-} životinja 1 mjesec nakon MCAO, gdje je omjer u odsustvu TLR2 bio niži u prosjeku za 11% (95% IP=6,6% do 15,4%, P=0,0008. T-test za nesparene uzorke) (Slika 39., Tablica 24).

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



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

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

Omeri IOD-a za YFP	Thy1	P Thy1	Thy1Tlr2-/-	P Thy1 Tlr2-/-	P Thy1 vs Ty1Tlr2-/-
Kontrola	0,9513± 0,0313	0,2286	1,035± 0,0276	0,0571	0,2
MCAO (28 dana)	1,007± 0,0168		0,8974± 0,0161		0,0008

5.5. Izražaj gena uključenih u signalni put TLR2

Kako bi se istražio izražaj mRNA gena uključenih u signalni put TLR2 u akutnoj, subakutnoj i kroničnoj fazi oporavka od MCAO, izolirane su moždane polutke miševa neposredno prije, 72 sata, 1 tjedan te mjesec dana nakon ishemijskog oštećenja. Pomoću TaqMan® testova za izražaj gena kvantitativnim real-time PCR-om reverzne transkriptaze istražene su razine mRNA kod *Tlr2*^{-/-} i WT miševa.

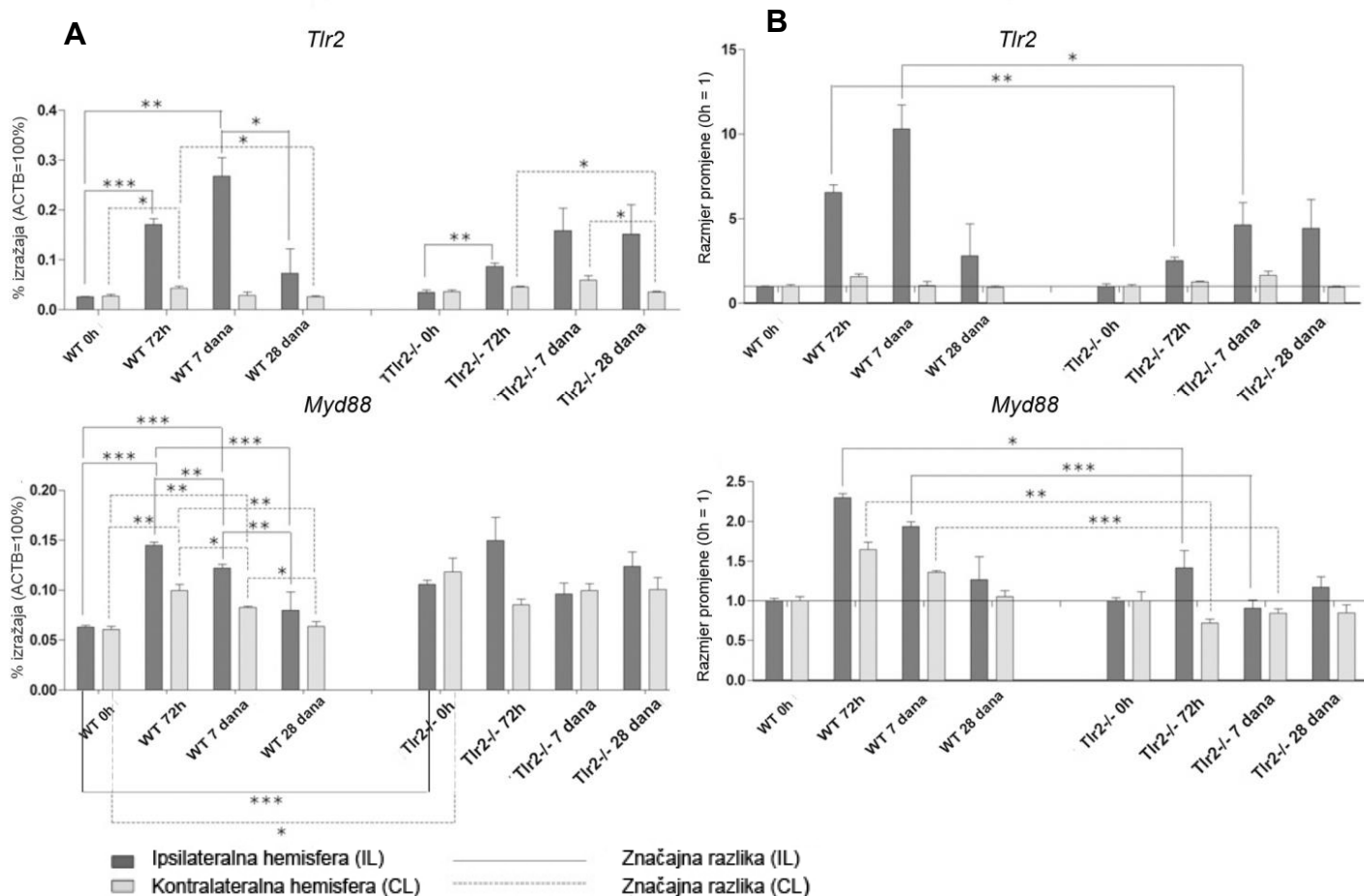
5.5.1. Sporiji porast izražaja *Tlr2* nakon ishemijskog oštećenja kod *Tlr2*^{-/-} u odnosu na miševe divljeg tipa

Kako bi se procijenio izražaj TLR2 kao receptora koji započinje signalnu kaskadu, kod *Tlr2*^{-/-} miševa koristila se skraćena mRNA za *Tlr2*. Koristio se dio mRNA gena *Tlr2* koji nije bio zahvaćen tijekom postupka stvaranja *Tlr2*^{-/-} onemogućenog miša (knock-out), kako bi se iste polietnice mogle koristiti za kvantitativni PCR kod oba genotipa (WT, *Tlr2*^{-/-}). Na takav način bilo je moguće pratiti razinu izražaja *Tlr2* te u kakvom je odnosu obzirom na prisutnost/odsutstvo bjelančevine TLR2.

Izražaj skraćene *Tlr2* mRNA *Tlr2* 72 sata nakon MCAO se značajno povećao u svim ispitivanim uzorcima, osim u kontralateralnoj hemisferi *Tlr2*^{-/-} miševa (Slika 40.). Visoke razine skraćene *Tlr2* mRNA bile su prisutne i tjedan dana nakon MCAO te su se potom značajno smanjile u vremenskoj točki od mjesec dana u svim uzorcima osim u ipsilateralnoj hemisferi *Tlr2*^{-/-} gdje su bile prisutne i nadalje.

Uspoređujući WT i *Tlr2*^{-/-} miševe, uočen je znatno viši izražaj skraćene mRNA *Tlr2*, nego li kod *Tlr2*^{-/-} 72 sata i 7 dana nakon ishemijskog oštećenja.

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



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

Gen *Myd88* kodira adaptor koji je potreban za započinjanje signalnog puta TLR2. Kod divljih tipova izražaj *Myd88* na razini mRNA je bio povećan u obje moždane hemisfere, pokazujući najvišu razinu 72h nakon MCAO, a potom se postupno smanjivao na razine kontrole 1 mjesec nakon MCAO. *Tlr2*^{-/-} miševi nisu pokazali značajnu promjenu u izražaju *Myd88* mRNA ni u jednoj hemisferi (Slika 40.).

Poljetna razina *Myd88* kod *Tlr2*^{-/-} koja se koristila kao kontrola bila je znatno viša od poljetne razine kod divljeg tipa.

Kod miševa koji imaju funkcionalan TLR2, izražaj *Myd88* je potaknut u ranim fazama oporavka nakon ishemije. Ukoliko TLR2 nije prisutan, poljetno postoji obilniji rezervoar *Myd88* mRNA, no sam odgovor na ishemijsku leziju nije značajan.

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

Kako bi se istražio izražaj gena uključenih u signalni put TLR2, uz mRNA *Tlr2* i *MyD88*, određivale su se razine mRNA gena *Irak1*, *Irak4*, *Ikbkb*, *Irak3*, *Tollip*, *Nfkb1* i *Nfkb1* (Slika 41.).

Izražaj mRNA *Irak1* gena se smanjio 72 sata nakon ishemije kod oba genotipa i potom se postupno vratio na početne kontrolne vrijednosti mjesec dana nakon MCAO. Kontralateralna hemisfera nije pokazivala promjene u izražaju mRNA za *Irak1* kod miševa divljeg tipa.

Kao i za *Myd88*, Tlr2^{-/-} miševi imali su povećanu bazalnu razinu mRNA za *Irak1* te je pad izražaja 72 sata nakon MCAO bio izraženiji u odnosu na WT miševe.

Irak1 je stoga utišan tijekom rane faze oporavka, a neaktivni Tlr2 povećava njegovu bazalnu razinu i dovodi do strmijeg pada uslijed postishemijskog utišavanja.

Izražaj mRNA *Irak4* gena se povisio u ipsilateralnim hemisferama kod oba genotipa nakon ishemijske lezije. Kontralateralna hemisfera kod divljeg tipa nije pokazivala promjene, dok je u kontralateralnoj hemisferi Tlr2^{-/-} miševa nastupilo utišavanje *Irak4*.

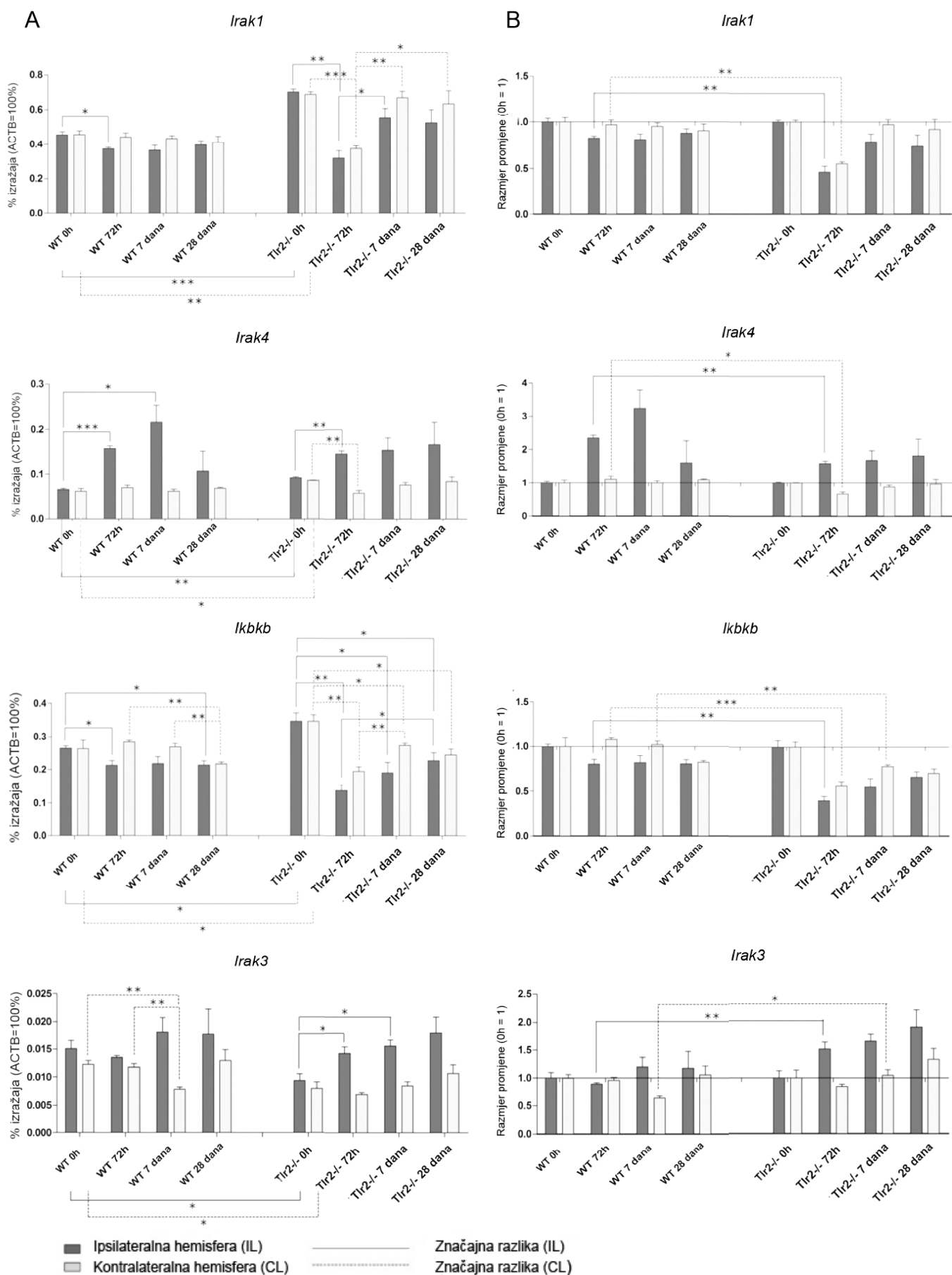
Tlr2^{-/-} miševi su imali, kao i za *Myd88* i *Irak1*, značajno veći rezervoar *Irak4* mRNA, no i znatno slabiji ekspresijski odgovor za *Irak4* u obje hemisfere 72 sata nakon MCAO.

Stoga je opravdan zaključak kako je izražaj *Irak4* mRNA pojačan nakon MCAO, dok neaktivan *Tlr2* povećava početnu razinu mRNA za *Irak4*, te k tome njegovo pojačavanje nakon ishemijskog oštećenja nije izrazito kao kod divljeg tipa.

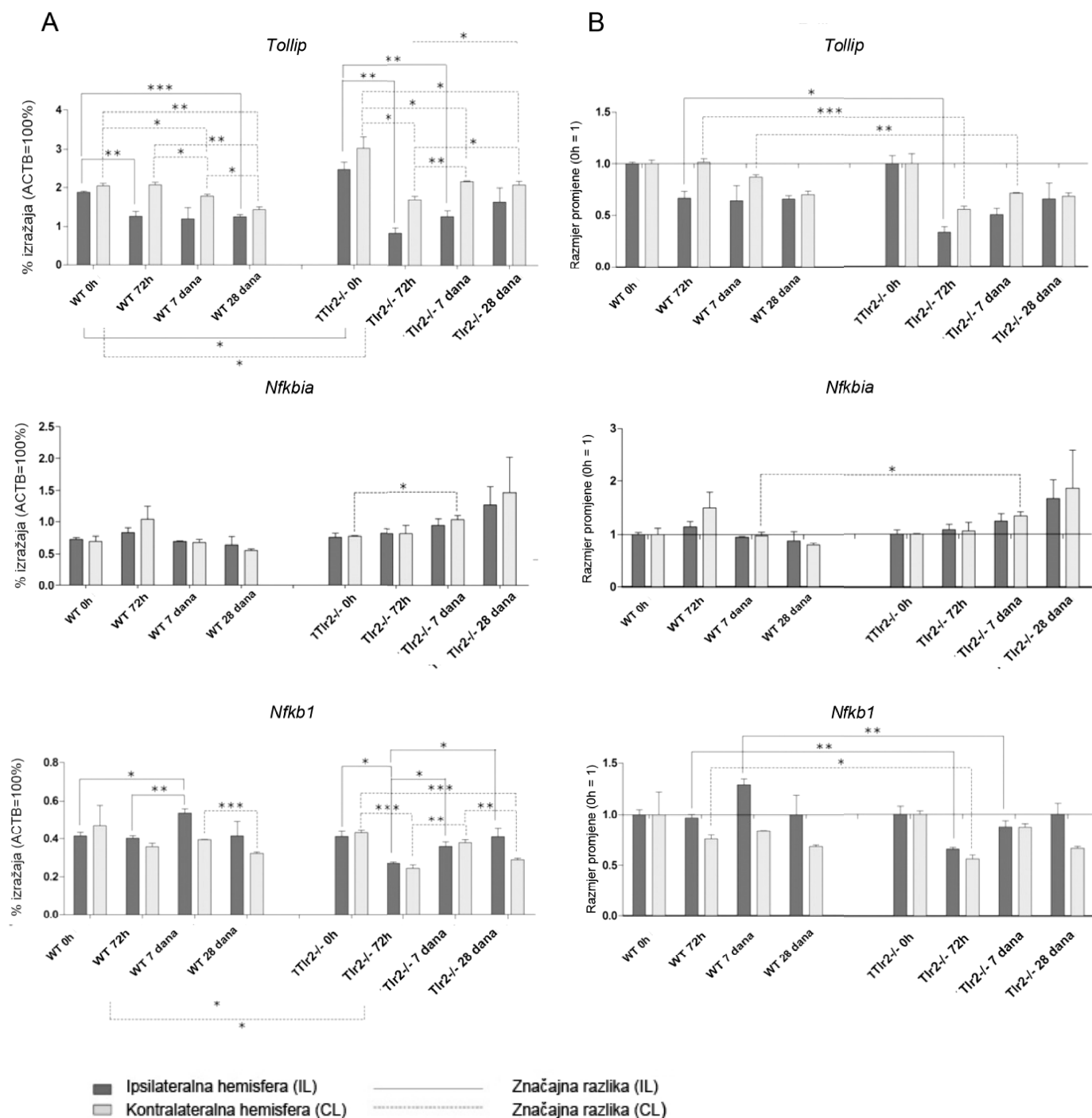
Ikbkb se smatra aktivatorom signalnog puta TLR2 jer njegov inhibitor inhibira *Nfkb1*. Izražaj *Ikbkb* se smanjio 72 sata nakon ishemije kod oba genotipa, no kod Tlr2^{-/-} su se kasnije postupno povećavale, dok je kod divljeg tipa gen ostao utišan.

Prema tome, *Ikbk* je utišan tijekom kronične faze oporavka, a u slučaju nedostatka funkcionalnog TLR2 postoji konstitutivno pojačani izražaj te izrazitije utišavanje nakon ishemije.

Kod Tlr2^{-/-} je povećana početna razina mRNA *Ikbkb*, ali je i pad izražaja znatniji u vremenskoj točki od 72 sata.



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



Slika 42. Razine izražaja mRNA za *Tollip*, *Nfkb1a* i *Nfkb1*. Podaci su prikazani na 2 načina: A) razine mRNA svakog gena su prikazane kao postotak u odnosu na razine izražaja endogene kontrole (*Actb*) i B) podaci svake hemisfere u određenoj vremenskoj točki su normalizirani na vrijednosti kontrole (kontrola = 1). Razlike među hemisferama su bile statistički značajne ako je $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) i $p < 0,005$ (***).

Izražaj mRNA za *Irak3* se nije promijenio u ipsilateralnoj hemisferi WT miševa. U kontralateralnoj hemisferi se *Irak3* utigao do tjedan dana nakon ishemije. Kod *Tlr2*^{-/-} miševa kontralateralna hemisfera nije pokazala nikakvih promjena, dok je u ipsilateralnoj hemisferi došlo do povećanog izražaja do tjedan dana nakon ishemije.

Početna razina mRNA za *Irak3* je kod Tlr2^{-/-} bila niža u odnosu na razine kod divljeg tipa, a izražaj je bio pojačan u ipsilateralnoj hemisferi 72 sata, odnosno u kontralateralnoj hemisferi 7 dana nakon MCAO.

Nedostatak funkcionalnog *Tlr2* dovodi do smanjenja konstitutivnog izražaja mRNA za *Irak3*, a reaktivnog pojačavanja nakon MCAO. Kod divljeg tipa dolazi do utižavanja gena za *Irak3* u kroničnoj fazi nakon ishemije.

Izražaj mRNA za *Tollip* smanjio se u obje hemisfere WT miševa, osobito mjesec dana nakon MCAO kad postiže i najnižu razinu (Slika 43). Kod Tlr2^{-/-} miševa je izražaj mRNA za *Tollip* utižen u obje hemisfere 72 sata nakon ishemije, te se potom postupno povećavao do početne razine.

U usporedbi s divljim tipom, kod Tlr2^{-/-} miševa se pokazalo izrazitije utižavanje gena za *Tollip* 72 sata nakon MCAO u obje hemisfere, te tjedan dana nakon MCAO u kontralateralnoj hemisferi. Početna razina izražaja *Tollip* gena bila je povećana kod Tlr2^{-/-} miševa.

Stoga se može zaključiti kako je *Tollip* utižen nakon ishemijske lezije. Neaktivni Tlr2 dovodi do povećanog rezervoara mRNA za *Tollip*, te uslijed nastupa ishemije dolazi to znatnog utižavanja njegovog izražaja.

Izražaj mRNA za *Nfkb1* se nije promijenio u obje hemisfere divljeg tipa, ni kod ipsilateralne hemisfere Tlr2^{-/-} miševa, no u njihovoj se kontralateralnoj hemisferi povisio tjedan dana nakon ishemijske lezije te je pri tom taj porast bio statistički značajan u usporedbi s odgovarajućim vrijednostima divljeg tipa (Slika 42.).

Regulacija *Nfkb1* se nije znatno promijenila nakon MCAO, no postoji trend povećanja u kontralateralnoj hemisferi Tlr2^{-/-} miševa tijekom kronične faze oporavka.

Izražaj mRNA za *Nfkb1* se povećao u ipsilateralnoj hemisferi WT miševa tjedan dana nakon MCAO, a smanjio nakon mjesec dana (Slika 42).

Kod Tlr2^{-/-} miševa izražaj *Nfkb1* se smanjio u obje hemisfere 72 sata nakon MCAO te potom postupno vratio na početnu razinu u vremenskoj točki od mjesec dana.

Tlr2^{-/-} miševi imaju značajno niže razine mRNA za *Nfkb1* u obje hemisfere 72 sata, te u ipsilateralnoj hemisferi tjedan dana nakon ishemijske lezije.

Odgovor na ishemiju u regulaciji *Nfkb1* bio je vidljiv samo u kroničnoj fazi oporavka. Neaktivan *Tlr2* nije doveo do pojačavanja izražaja *Nfkb1*, već naprotiv, njegove su razine izražaja bile znatno niže u usporedbi s WT skupinom.

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

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

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

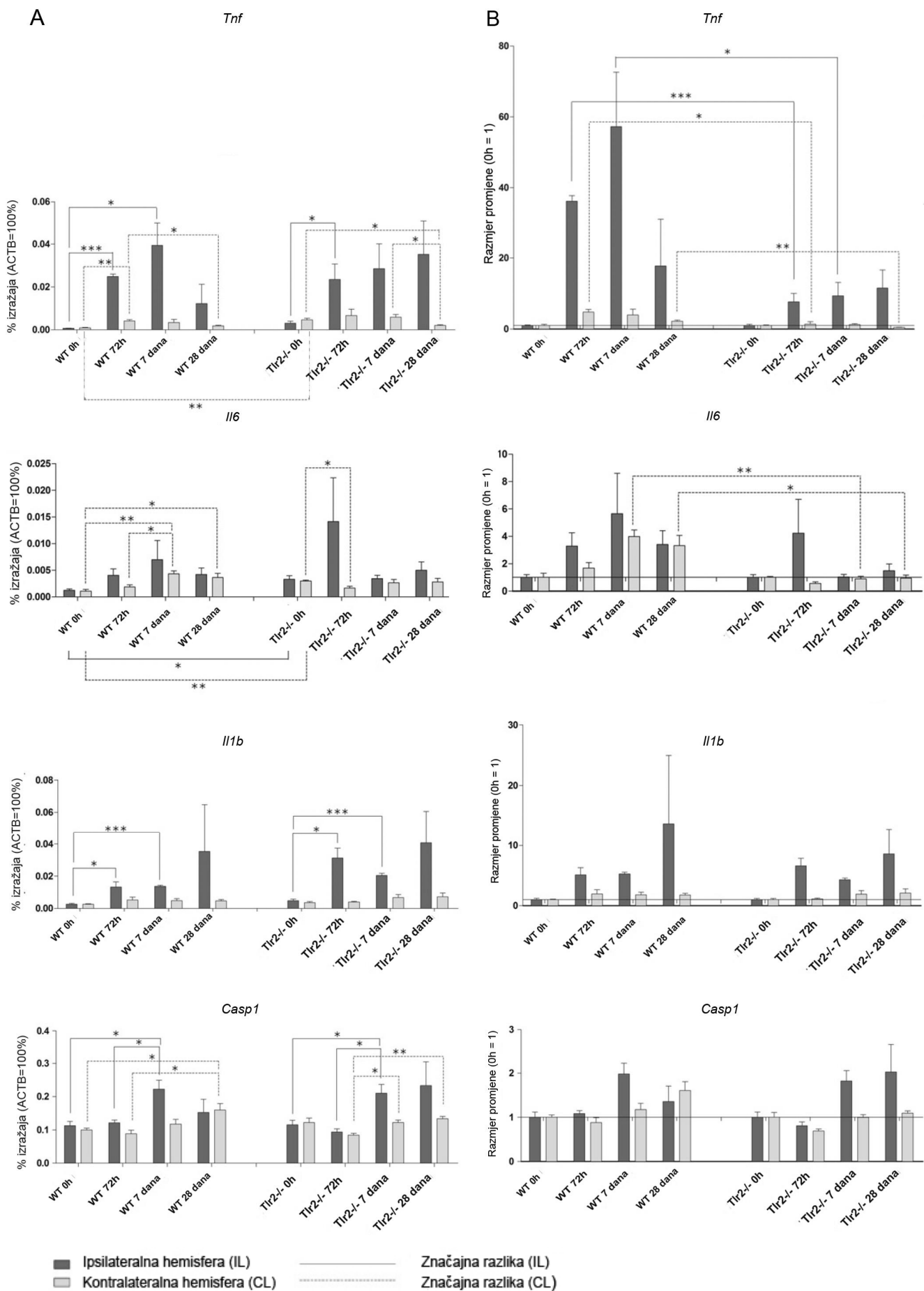
Tlr2^{-/-} skupina je u usporedbi s WT pokazala značajno manje povećanje izražaja mRNA za *Tnf* u obje hemisfere 72 sata nakon MCAO. Pri tom je početna razina mRNA za *Tnf* bila povećana kod *Tlr2*^{-/-} miševa.

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

Izražaj mRNA za *Il6* nije se promijenio u ipsilateralnoj hemisferi oba genotipa nakon MCAO. U kontralateralnoj hemisferi divljeg tipa pojačao se u vremenskoj točki od 7 dana i ostao na toj razini do kronične vremenske točke od mjesec dana. Kod *Tlr2*^{-/-} miševa je nastupilo utišavanje *Il6* u kontralateralnoj hemisferi 72 sata nakon MCAO.

Kod *Tlr2*^{-/-} miševa početno postoji znatno veća količina mRNA za *Il6*, a nakon MCAO ne dolazi do porasta u kontralateralnoj hemisferi te su razine znatno niže u vremenskim točkama 7 i 28. dana.

Nakon MCAO došlo je do pojačanog izražaja mRNA za *Il1b* u ipsilateralnim hemisferama oba genotipa, dok kontralateralna hemisfera nije pokazivala promjene. *Casp1* se pojačao u obje hemisfere oba genotipa, te kao i kod *Il1b* nije uočena razlika u regulaciji tog gena nakon MCAO.



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

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

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

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

Kod *Tlr2*^{-/-} je došlo do značajnog povećanja izražaja *Casp8* u obje hemisfere postižući vrhunac 7 dana nakon MCAO. U usporedbi s WT skupinom, u vremenskoj točki od tjedan dana *Tlr2*^{-/-} miševi imaju značajno veći izražaj *Casp8* u obje hemisfere, dok u vremenskoj točki od mjesec dana u kontralateralnoj hemisferi imaju značajno manji izražaj istog gena.

Početna razina *Casp8* kod *Tlr2*^{-/-} je značajno povećana kod *Tlr2*^{-/-} miševa.

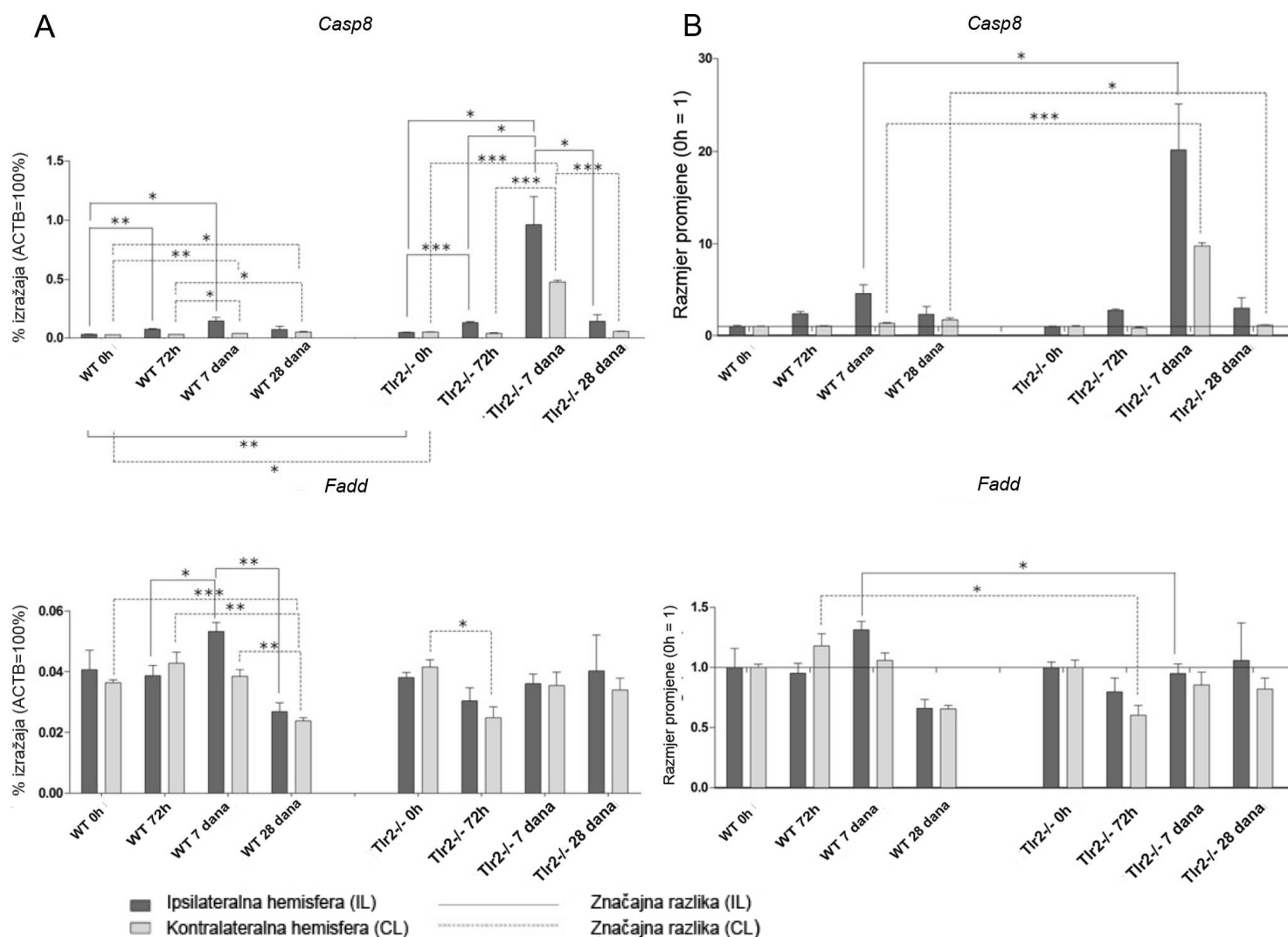
Neaktivan *Tlr2* dovodi do povećanog rezervoara *Casp8* u mirovanju, ali i do značajnog povećanja izražaja u subakutnoj fazi oporavka.

Izražaj mRNA za *Fadd* se značajno povećao kod WT u ipsilateralnoj hemisferi tjedan dana nakon MCAO i potom je značajno utišan u vremenskoj točki od mjesec dana. U kontralateralnoj hemisferi divljeg tipa, *Fadd* se znatno utišao nakon mjesec dana.

Kod *Tlr2*^{-/-} miševa nije bilo promjene u izražaju *Fadd* u ipsilateralnoj hemisferi, ali je 72 sata nakon MCAO u kontralateralnoj hemisferi nastupilo značajno utišavanje.

U usporedbi s WT, *Tlr2*^{-/-} miševi su imali značajno niže razine mRNA za *Fadd* u ipsilateralnoj hemisferi tjedan dana, te u kontralateralnoj hemisferi 72 sata nakon MCAO.

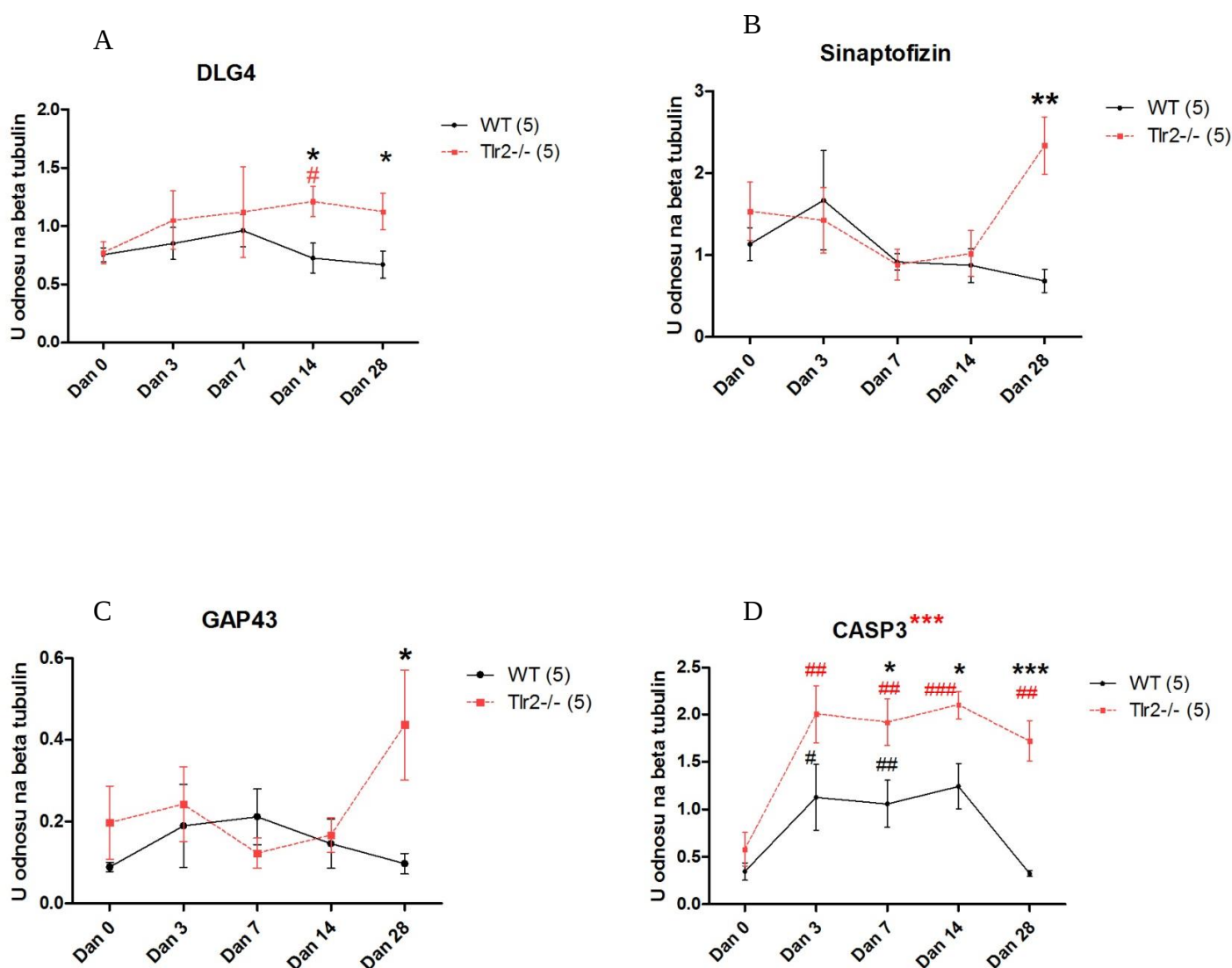
Dok je tjedan dana nakon MCAO izražaj mRNA za *Fadd* pojačan, kod *Tlr2*^{-/-} miševa nije bilo prisutno takvo pojačanje.



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

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

Bjelančevine sinaptogeneze (DLG4, sinaptofizin), aksonogeneze (GAP43) i neuralnog stresa (CASP3) se razlikuju u izražaju kod WT i Tlr2^{-/-} miševa mjereno Western blotom (Slika 46.).



Slika 45. Izražaj bjelančevina DGL4(A), sinaptofizina (B), GAP43 (C) i CASP3 (D) u ipsilateralnoj moždanoj kori ispitivano Western blotom u odnosu na bjelančevinu održavanja stanice beta-tubulin u vremenskoj točki 0 za početne vrijednosti te 3, 7, 14 i 28 dana nakon ishemijskog oštećenja. Crtkanoo je označena skupina s onemogućenim TLR2.

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

Kod analize izražaja bjelančevine DLG4 (omjer količine u odnosu na α -tubulin), koja predstavlja postsinaptičku sastavnicu sinapse, nisu postojale razlike u početnim vrijednostima između genotipa, obzirom da je tad prosječna vrijednost kod WT iznosila $0,75 \pm 0,06$, a kod Tlr2-/- skupine $0,77 \pm 0,09$ (Tablica 25).

Treći dan nakon MCAO dolazi do blagog porasta količine DLG4 na prosječnu vrijednost od $0,85 \pm 0,14$ kod WT skupine, odnosno nešto intenzivnijeg porasta na $1,05 \pm 0,25$ kod Tlr2-/-. 7. dan porast izražaja bjelančevine DLG se i dalje nastavlja povećavati polagano na $0,96 \pm 0,14$ kod divljih tipova, a kod Tlr2-/- miševa u većoj mjeri na $1,12 \pm 0,39$.

Dva tjedna nakon ishemijskog oštećenja kod WT skupine miševa započinje trend opadanja količine DLG4 na $0,73 \pm 0,13$, dok kod skupine bez funkcionalnog TLR2 vrijednost DLG4 i dalje nastavlja blago rasti na $1,21 \pm 0,13$ te je prosječna razlika srednjih vrijednosti $0,4847 \pm 0,1836$, što je s 95% intervalom pouzdanosti od 0,9 do 0,7 statistički značajno s $P=0,0269$.

Uspoređuje li se taj rezultat s početnim vrijednostima kontrolne Tlr2-/- skupine ($0,77 \pm 0,09$), razlika je s prosječnom razlikom srednjih vrijednosti od $0,4388 \pm 0,16$ također statistički značajna s $P=0,0251$ (95% IP= 0,8 do 0,07).

Srednja vrijednost količine bjelančevine DLG4 kod WT skupine nastavila je padati u odnosu na 7. dan te je u vremenskoj točki 28. dana iznosila $0,67$ (SEM= $\pm 0,117$), dok je kod Tlr2-/- ta vrijednost također počela opadati u odnosu na maksimalnu vrijednost 14. dana, ali je i dalje sa srednjom vrijednosti $1,125$ (SEM= $\pm 0,1548$) bila viša od vrijednosti divljih tipova. S razlikom srednjih vrijednosti od $0,46 \pm 0,19$ i 95% IP od 0,9054 do 0,006, ta je razlika statistički značajna s $P=0,0475$.

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

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

Analizirajući izražaj sinaptofizina, bjelančevine koja predstavlja presinaptičku sastavnicu sinapse uočeno je da postoji poljetna razlika kod netretiranih životinja WT ($1,13 \pm 0,2$) i Tlr2^{-/-} ($1,54 \pm 0,35$) skupina, no ona nije statistički značajna (Tablica 26.). Dinamika izražaja na razini bjelančevine kod sinaptofizina u IL hemisferi kod divljih tipova pokazuje porast u akutnoj vremenskoj točki od 3 dana na $1,67 \pm 0,6$, dok kod Tlr2^{-/-} miševa polinje opadati na $1,42 \pm 0,4$. Nakon tog poljetnog porasta, količina sinaptofizina kod divljeg tipa trajno opada dostižući najmanju vrijednost mjesec dana nakon MCAO s prosječnom vrijednosti $0,68 \pm 0,14$. U skupini bez funkcionalnog TLR2 nastavlja se pad s minimumom u subakutnoj vremenskoj točki od 7 dana na srednju vrijednost od $0,88 \pm 0,19$, nakon toga 14 dan raste blago ($1,02 \pm 0,28$) a potom i dramatično na $2,34 \pm 0,35$ gdje se od divljih tipova statistički značajno razlikuje s $P=0,0055$ (srednja razlika $-1,7 \pm 0,4$, 95%IP = od -2,6 do -0,67).

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

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

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

Slično je opaženo mjereći izražaj bjelančevine GAP43, odgovorne za razvoj aksona i pokazatelja restrukturiranja neurona.

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

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

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

U akutnoj vremenskoj točki od 3 dana nakon MCAO polinje porast izražaja GAP43 bjelančevine kod oba genotipa, no kod Tlr2^{-/-} miševa taj je porast manjeg nagiba.

Subakutno, tjedan dana nakon ishemije, GAP43 dostiže svoju maksimalnu količinu kod divljih tipova ($0,21 \pm 0,07$) te u kroničnom razdoblju opada i 28. dan dostiže vrijednost tek nešto višu od početne ($0,097 \pm 0,025$).

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

Potom u subakutnoj vremenskoj točki količina GAP43 bjelančevine opada na najmanju razinu izmjerenu kod Tlr2^{-/-} životinja ($0,12 \pm 0,04$). U tom je trenutku kod divljih tipova količina GAP43 bjelančevine najviša.

Drugi porast količine biljega GAP43 kod Tlr2^{-/-} miševa javlja se u kroničnoj vremenskoj točki od mjesec dana ($0,44 \pm 0,14$) te predstavlja statistički značajno veću količinu navedene bjelančevine u odnosu na WT skupinu (razlika srednjih vrijednosti = $-0,34 \pm 0,14$, 95% IP=od $-0,66$ do $-0,022$, $P=0,0390$)

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

CASP3 je bjelančevina za koju se smatralo da je izražena samo u apoptotičkim stanicama, no nedavna istraživanja pokazuju kako posjeduje i neapoptotičku regulatornu funkciju u neurogenezi i sinaptičkoj aktivnosti (175).

Početne vrijednosti bile su neznatno više kod Tlr2^{-/-} miševa ($0,58 \pm 0,18$) u odnosu na WT ($0,34 \pm 0,09$) (Tablica 28.).

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

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

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

Tlr2^{-/-} miševi intenzivnije reagiraju na ishemijsku leziju četverostruko povećavajući količinu CASP3 u akutnoj vremenskoj točki 3. dana ($2,0 \pm 0,3$). Pri tom se statistički značajno razlikuje od svojih početnih vrijednosti ($P=0,0038$). Potom dinamika izražaja CASP3 bjelančevine prati dinamiku detektiranu kod divljih tipova tako da ostaje povišena i 7. i 14. dan nakon ishemijske lezije. Pri tome je razina CASP3 statistički značajno povišena kod Tlr2^{-/-} u usporedbi s miševima WT skupine ($P=0,0396$), ali ponovno i vrijednosti vlastitih lažno operiranih kontrola ($P=0,0023$).

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

U kroničnoj fazi oporavka dolazi do resolucije i kod Tlr2^{-/-} miševa u pogledu količine CASP3, no ona opada blaže nego li kod miševa koji imaju funkcionalan TLR2. Dok se kod WT skupine vrijednosti CASP3 detektirane Western blotom vraćaju na početne, kod miševa bez funkcionalnog TLR2 razina se spušta na vrijednost koja je i dalje trostruko veća od kontrola te se statistički izrazito značajno razlikuje i od početnih vrijednosti za vlastiti genotip ($P=0,0033$), ali i u usporedbi s WT skupinom izloženoj MCAO ($P=0,002$).

Takav rezultat pokazuje snažniji izražaj CASP3 na razini bjelančevine u mirovanju, ali osobito nakon MCAO kod Tlr2^{-/-} miševa u odnosu na WT koji sadrže TLR2, što dovodi do zaključka kako putevi neovisni o TLR2 koji su u njegovom odsudstvu pojačani, ranije dovode do pojačanog uključivanja proapoptotičkih čimbenika te takvi signalni putevi perzistiraju duže nego li u prisutstvu funkcionalnog TLR2.

5.7. GAP43 i CASP3 su biljezi neuralnog stresa

Obzirom da je kod Tlr2^{-/-} miševa uočena deregulacija signalnog puta TLR2 i oštećenje funkcije urođene imunosti posredovane TLR2, rezultati dosadašnjih funkcionalnih i molekularnih usporedbi Tlr2^{-/-} skupina s miševima koji imaju djelatan TLR2 ukazuju na značajne parametre s potencijalom da se koriste kao biljezi za aktivnost upale i regeneracije, odnosno detekciju imunološki posredovanog neuralnog stresa koji predstavlja šansu za daljnje pogoršanje ili oporavak. Ti bi biljezi u budućnosti omogućili standardizirano praćenje tolerancije na ishemijsko oštećenje uslijed reprogramiranja bilo kojeg dijela imunološkog odgovora koji se izvršava putem TLR2.

Kako bi neki od navedenih pokazatelja predstavljali dobre kandidate za biomarkere, potrebno je da su snažno pojačani ili, s druge strane, snažno utišani tijekom oporavka od ishemijskog oštećenja, te da postoji jednostavan i neinvazivni način njihovog praćenja.

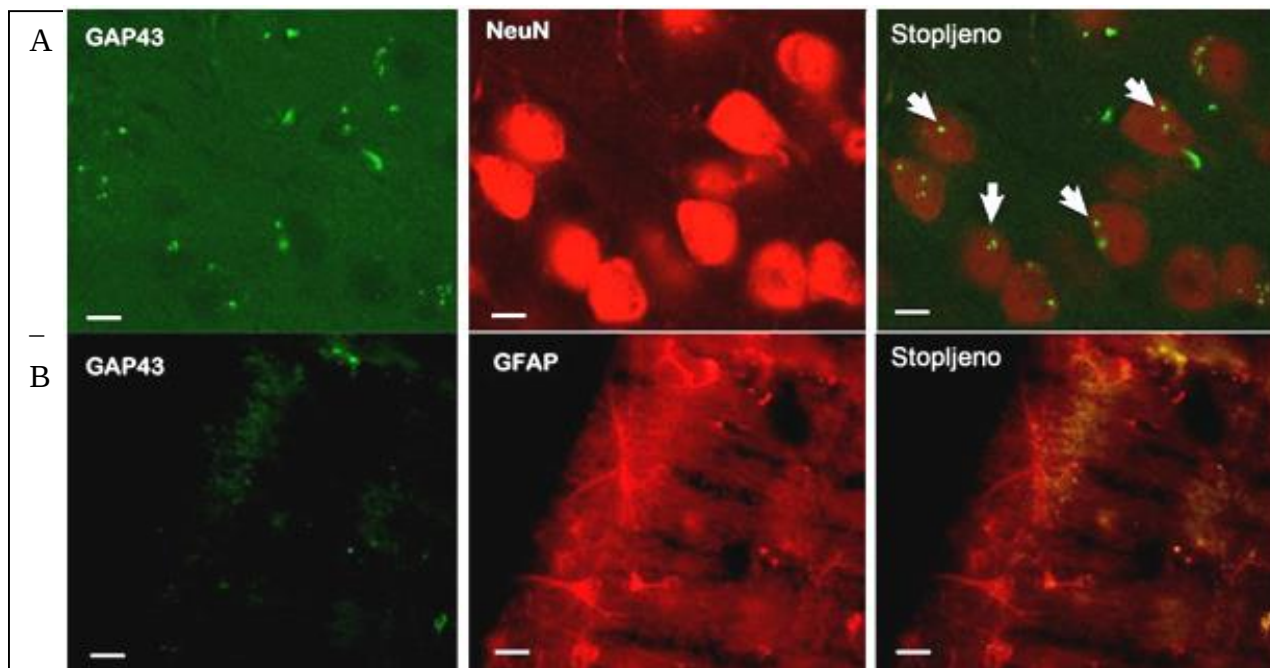
Od čimbenika koji pokazuju oporavak neuralne mreže, kao značajna bjelanjčevina identificiran je GAP43 koji radi svojeg izražaja tijekom razvoja aksona integrira neurogenezu i sinaptičku plastičnost na razini arborizacije novopotaknutih stanica.

Kako je najintenzivniji odgovor na razini bjelanjčevina u usporedbi Tlr2^{-/-} i WT miševa nađen promatrajući dinamiku izražaja CASP3 nakon ishemijskog oštećenja, kao drugi biljeg odabran je biljeg CASP3 koji svojom dominantno proapoptotičkom funkcijom predstavlja destruktivni krak na postishemijskoj prevagi.

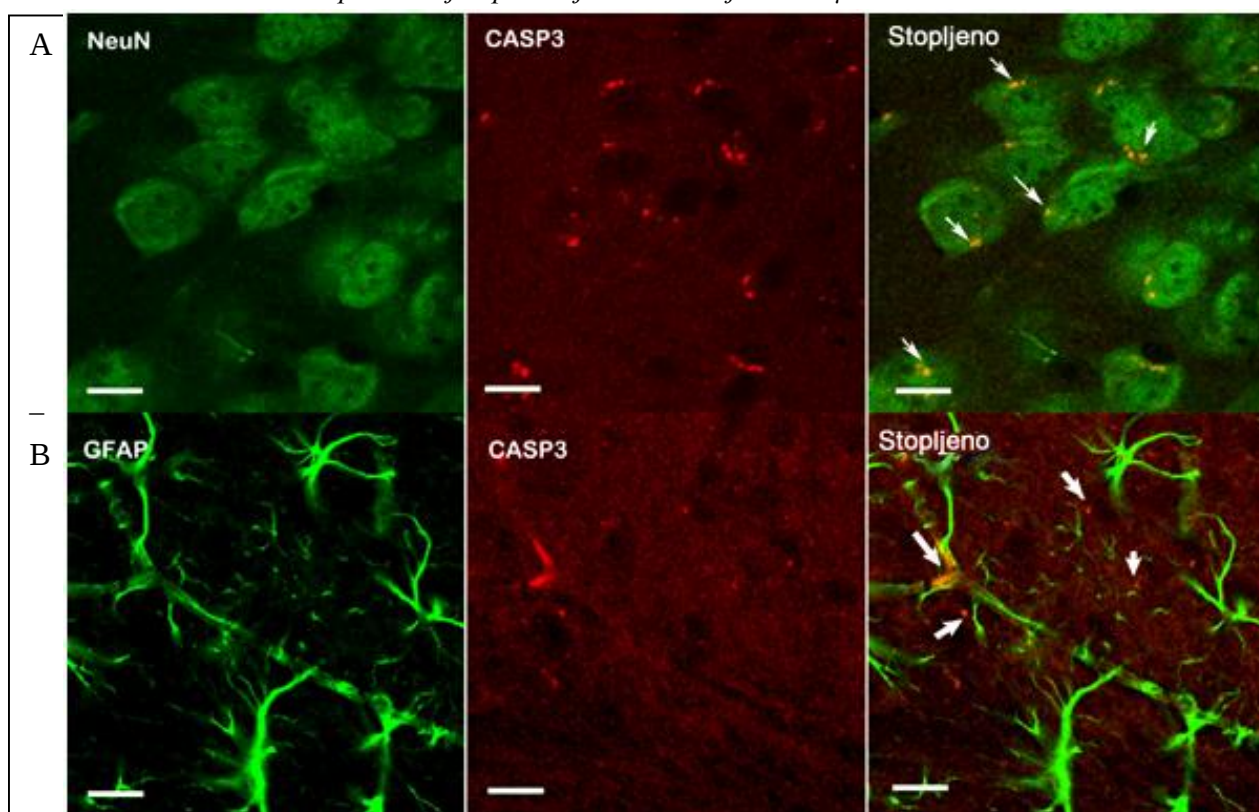
Stoga se pristupilo analizi njihove unutarstanične zastupljenosti prije i nakon ishemijskog oštećenja i nalaženju metodološkog pristupa za njihovu *in vivo* detekciju.

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

Kako bi se odredilo koje su stanice sadržavale GAP43 i CASP3, provela se dvostruka imunohistokemija za biljege astrocita i neurona na tkivu mišjeg mozga zahvaćenom ishemijom. Dvostruka imunohistokemija s GAP43 i NeuN protutijelima otkrila je da je GAP43 prisutan isključivo u neuronima (Slika 46., A.). Na temelju bojenja s GAP43 i GFAP (glijalna fibrilarna kisela bjelanjčevina, biljeg astrocita) nije nađena prisutnost GAP43 u astrocitima (Slika 46., B.). Biljeg CASP3 nađen je također primarno u neuronima, dok je istovremeno bio prisutan i u astrocitima, no u manjoj mjeri (Slika 47., A i B).



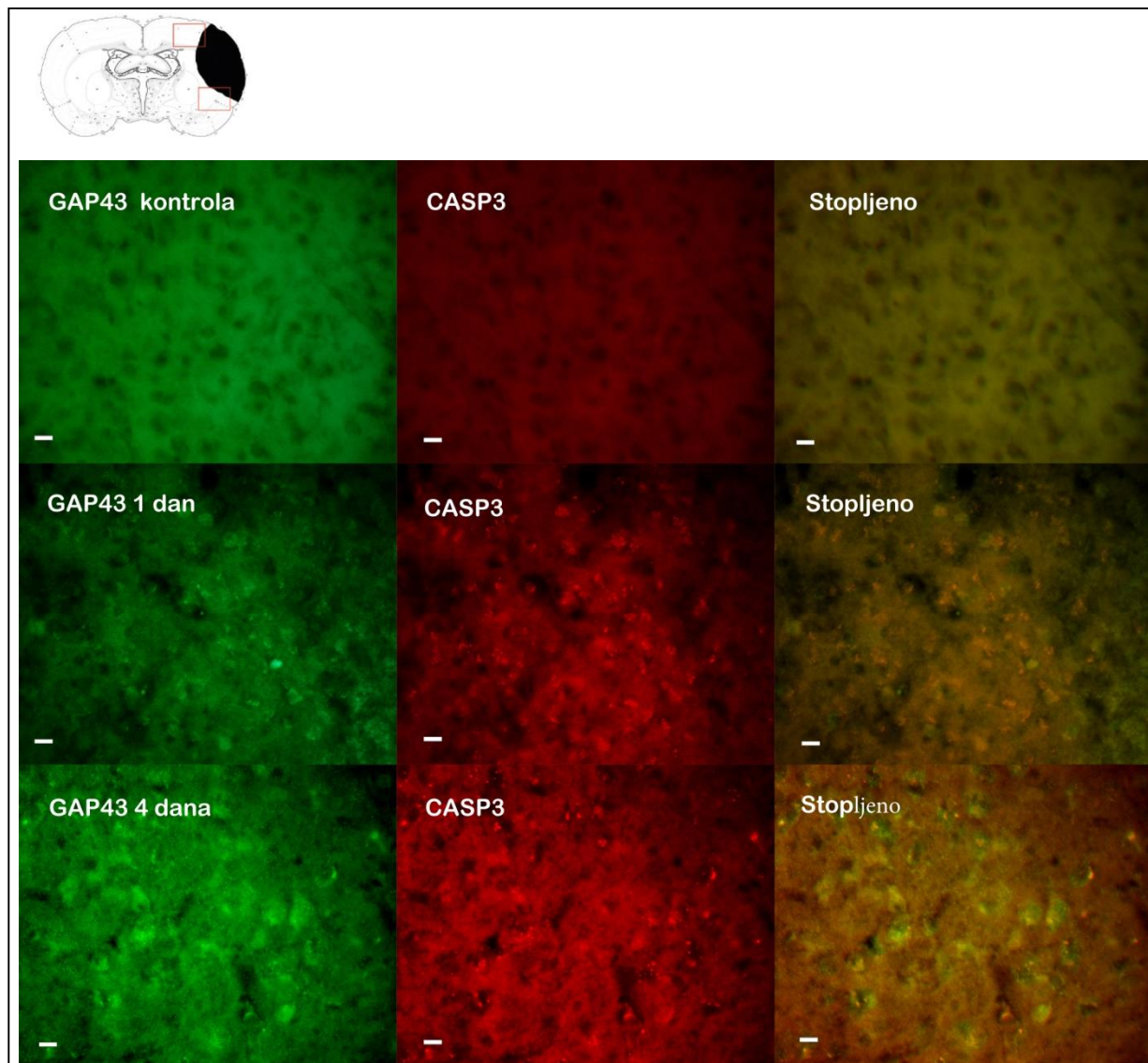
Slika 46. A) Imunohistokemija u kori mišjeg mozga oko oštećenja prikazuje signal GFP-a čiji je izražaj potaknut promotorom Gap43 gena (zeleno) pokazuje kolokalizaciju s biljgom neurona, NeuN-om (crveno). B) Imunohistokemija u perilezionalnoj kori mišjeg mozga prikazuje signal GFP-a (zeleno) i signal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



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

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

Imunohistokemija je pokazala da već jedan dan nakon MCAO, te još naglaženije 4 dana nakon ishemijskog oštećenja, izražaji GAP43 i CASP3 značajno rastu (t-test $P < 0,0001$) (Slika 48.).



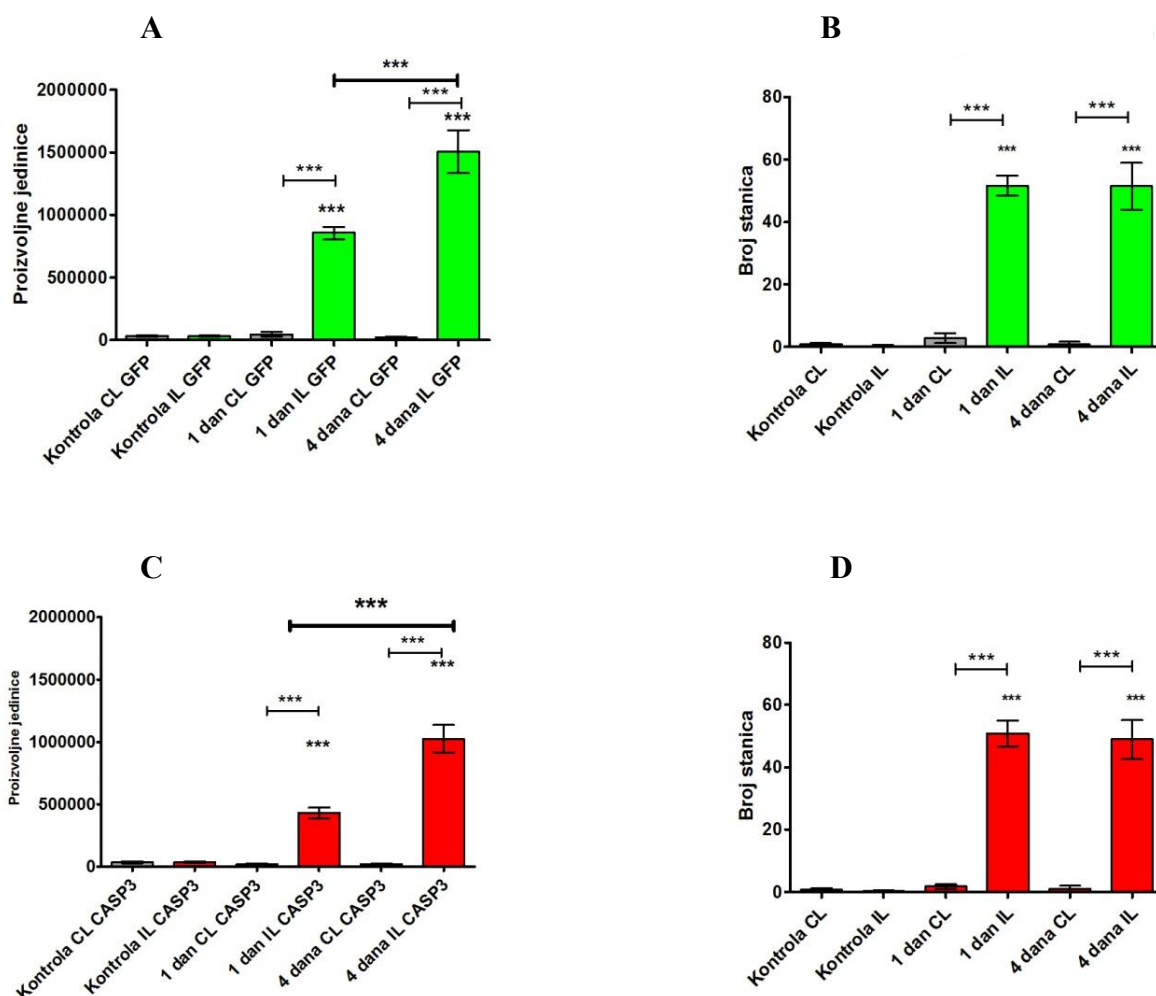
Slika 48. Imunohistokemija signala GFP-a (zeleno) potaknuta promotorom gena *Gap43* i biljega *CASP3* (crveno) kod lažno operiranih *GAP43-luc/gfp* kontrola te 1 i 4 dana nakon ishemijskog oštećenja u ipsilateralnoj kori. Jasno je vidljivo povećanje intenziteta signala za *GAP43* i *CASP3*. Crveni pravokutnici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

Metoda integrirane optičke gustoće pokazala je da se izražaj biljega *GAP43* povećao 27 puta 1. dan nakon ishemijske lezije, dok je 4 dana nakon MCAO povećanje iznosilo 47 puta, što je u skladu s rezultatima kvantifikacije metodom Western blota.

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

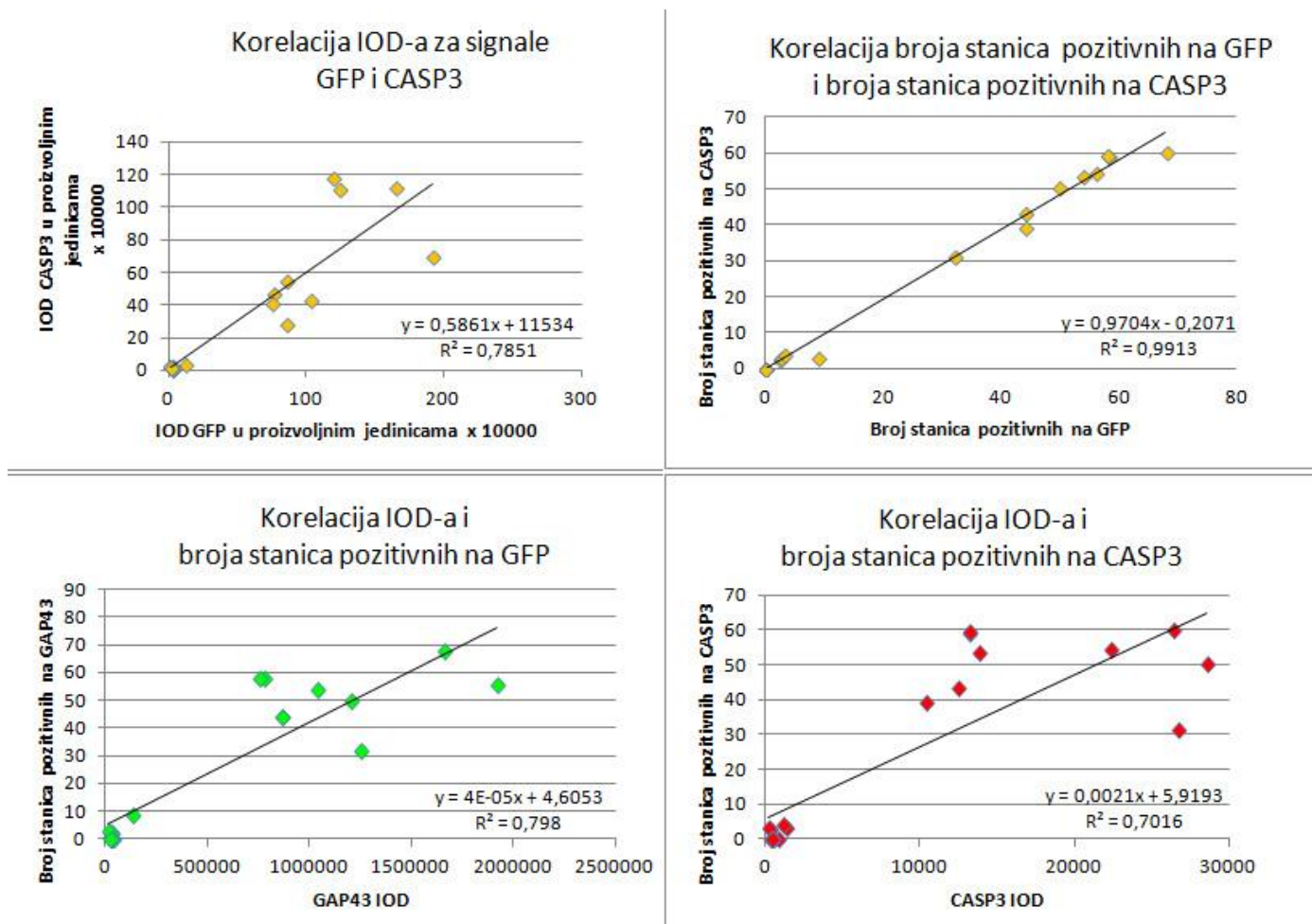
Integrirana optička gustoća za biljeg CASP3 prvi se dan povećala 24 puta, a 4. dan nakon ishemijskog oštećenja čak 42 puta u odnosu na kontrolu.

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



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

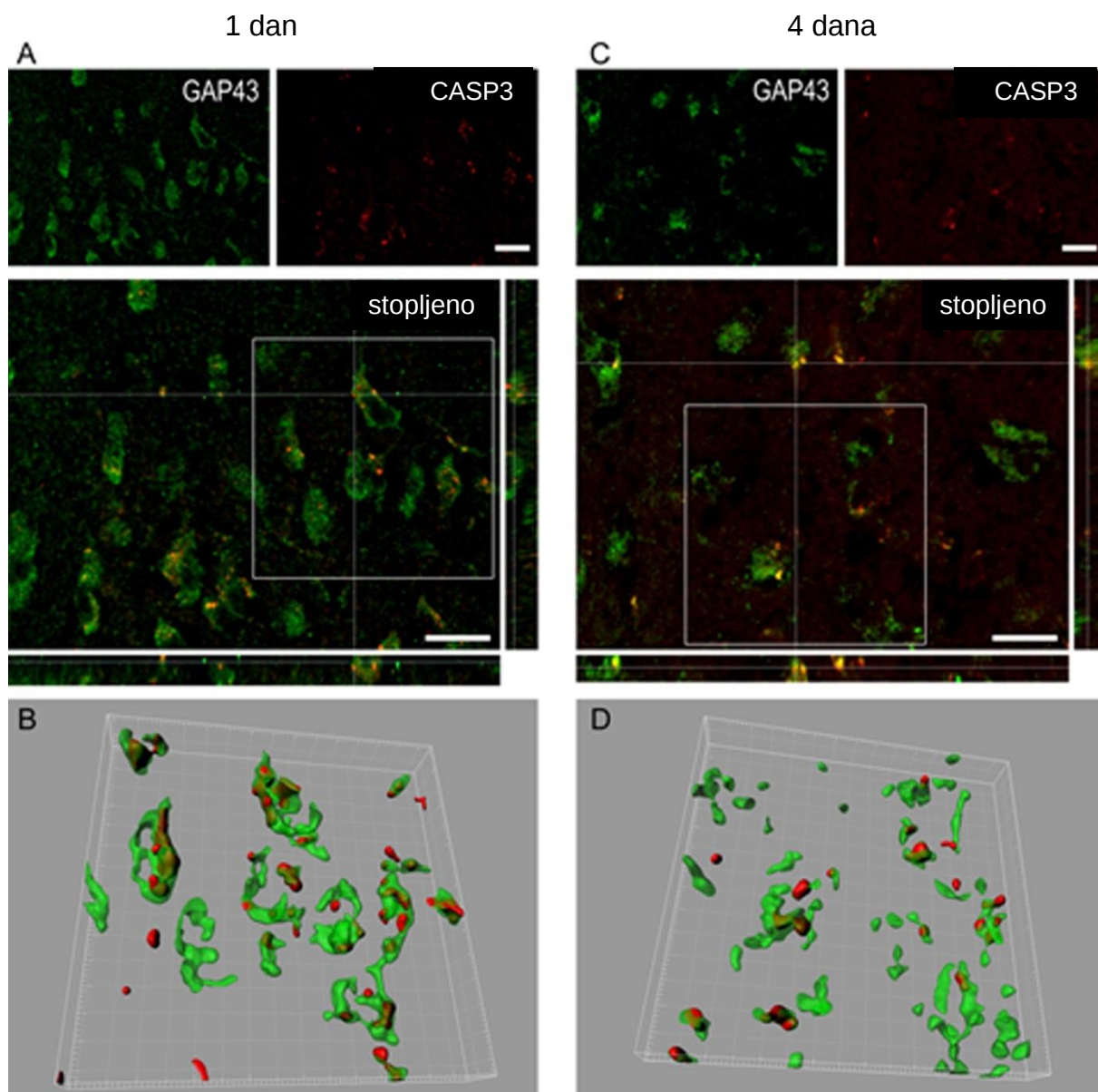
Povećanje signala biljega GAP43 nakon MCAO je koreliralo s intenzitetom signala biljega CASP3 mjereno integriranom optičkom gustoćom ($R^2 = 0.79$, Slika 51., A). Još je snažnija korelacija broja stanica pozitivnih na GAP43 i CASP3 ($R^2 = 0.99$, Slika 51., B).



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

Stavljajući IOD signala za GFP i broj stanica pozitivnih na GFP u odnos linearne korelacije dobila se snažnija korelacija ($R^2 = 0,80$) nego li uspoređujući IOD signala za CASP3 i broj stanica pozitivnih na CASP ($R^2 = 0,70$) što govori u prilog različitosti izražavanja CASP3 po stanici, dok je GFP uglavnom konstantno izražen u pojedinoj stanici (Slika 51, C i D).

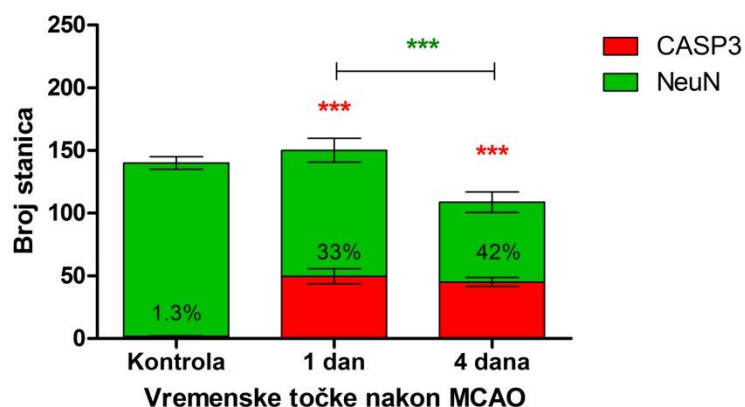
Kolokalizacija signala potvrđena je i uporabom konfokalnog mikroskopa te 3D rekonstrukcijom koristeći program Imaris® (Slika 51).



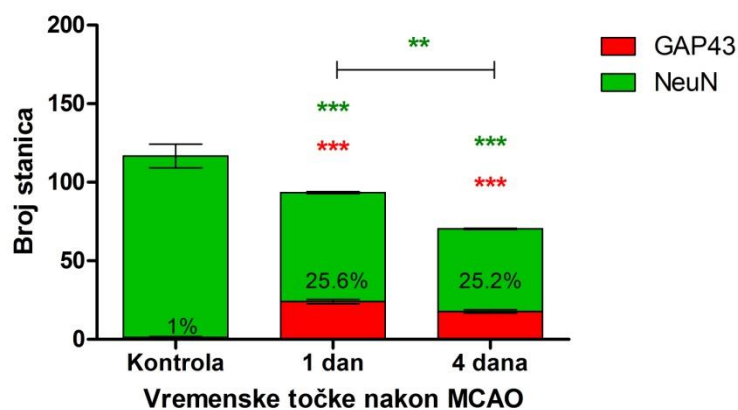
Slika 51. Prikaz signala GFP-a potaknutog promotorom gena za Gap43 (zeleno, GAP43) i CASP3 (crveno, CASP3) na konfokalnom mikroskopu. Stapanje slika crvenog i zelenog kanala (stopljeno u A i C) te 3D rekonstrukcija uz pomoć programa Imaris® 1. (B) i 4. dan (D) nakon ishemije.

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

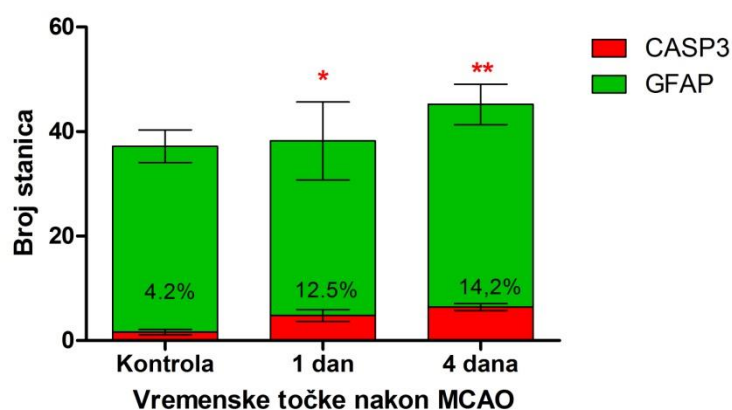
Biljeg astrocita, GFAP je kolokalizirao s CASP3 u 4% stanica u zdravom mozgu te u 13% i 14% stanica 1. i 4. dan nakon MCAO, navedenim redom (Slika 54.). Kao što je ranije navedeno, u astrocitima nije nađen izražaj GAP43, ni prije, ni nakon ishemijske lezije.



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



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



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

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

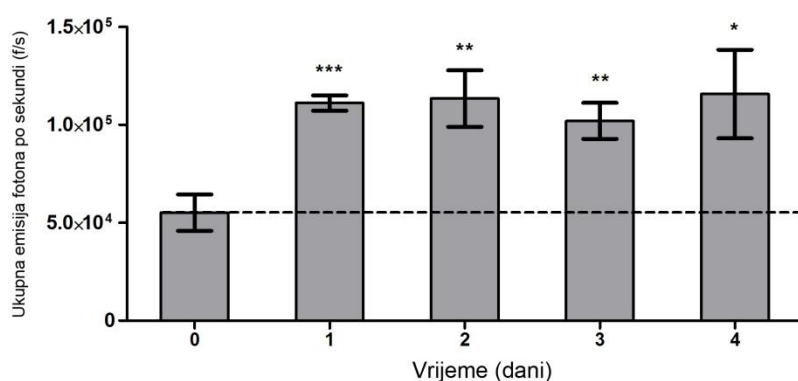
Kako bi se potvrdio ranije uspostavljeni protokol za praćenje izražaja gena *Gap43*, korigen je bioluminiscentni segment reporterskog sustava, luciferaza, čija se prisutnost na razini gena potvrđuje genotipizacijom PCR-om (127).

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

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

Već se 24 sata nakon ishemijskog oštećenja signal udvostručio te je bio statistički značajan u odnosu na početne vrijednosti (111200 ± 3921 f/s, $P < 0,0001$).

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



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

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

luciferina uvjetovana prethodnim unutarstaničnim reakcijama cijepanja od dodatnog spoja ili reakcijama sinteze od više manjih molekula(128).

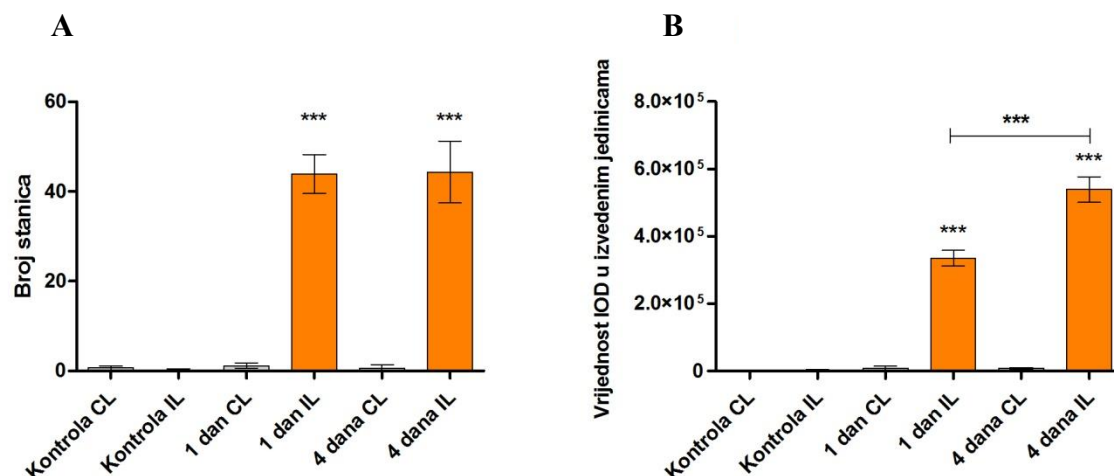
5.7.4. GAP43 i CASP3 su značajno kolokalizirani nakon ishemijskog oštećenja

Kvantifikacija broja stanica koje su istovremeno pozitivne na CASP3 i GAP43 pokazala je da njihov broj statistički značajno veći u odnosu na kontrole, obzirom da su u zdravom mozgu rijetko uočene (1-2 po vidnom polju) (Slika 56).

Već prvog dana nakon ishemije njihov je broj porastao na $43,9 \pm 4,4$ i 4. dana ostaje na toj razini $44,3 \pm 6,9$. Obzirom da je tijekom mikroskopiranja primjećeno kako je signal za CASP3 neravnomjerno raspoređen u svim stanicama u kojima je prisutan (za razliku od GFP-a koji uniformno boji cijeli neuron), bilo je potrebno provjeriti intenzitet izražaja CASP3 mjerenjem integrirane optičke gustoće.

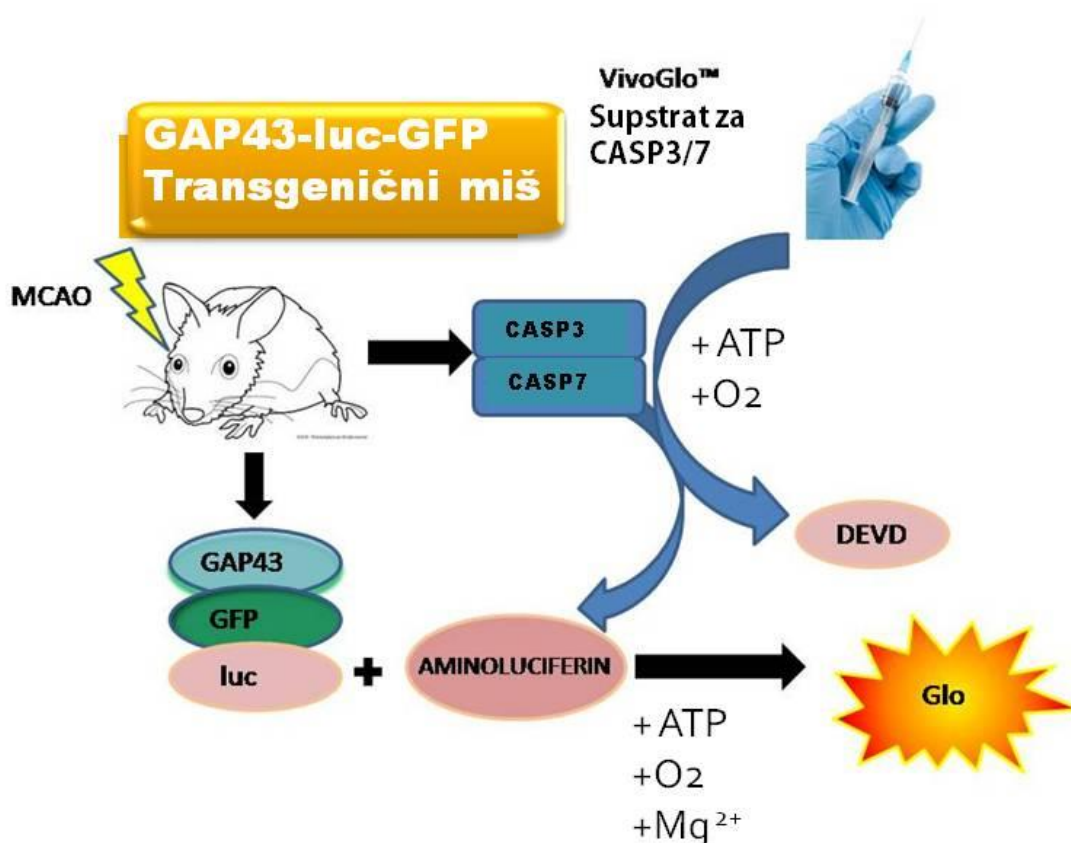
Mjerenje IOD-a pokazalo je povećanje signala koji se preklapa (CASP3 i GAP43) u odnosu na početne vrijednosti (ispilateralno 3.100 ± 1200 , kontralateralno 3.500 ± 1.200) već 24 sata nakon ishemijskog oštećenja (336.000 ± 22.000). Signal se prvog dana povećao i u kontralateralnoj hemisferi, ali na samo 9.200 ± 5.800 . Nakon prvog povećanja od 1000 puta, signal se 4. dana još jednom udvostručio (540.000 ± 38.000).

Stoga iako između 1. i 4. dana nije došlo do povećanog broja stanica koje pokazuju kolokalizaciju GAP43 i CASP3, može se zaključiti kako 4. dan dolazi do unutarstaničnog povećanja signala u stanicama koje su aktivirane u akutnoj fazi.



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

Uzimajući u obzir da je aktivna CASP3 cistein-aspartat proteaza, to je njeno svojstvo iskoristivo u vidu cijepanja malih biomolekula koje potom postaju biološki aktivne. Razvijen je tržišno dostupan supstrat natrijeva sol Z-DEVD-aminoluciferina (VivoGlo[®] Caspase-3/7 Substrate, Promega, Wisconsin, USA), koji nakon cijepanja s aktiviranom CASP3/7 oslobađa samostalan pentamer DEVD (D-Cist-Z-Asp-Glu-Val-Asp) i aminoluciferin. Na taj je način moguće pratiti izražaj CASP3/7 u svim viabilnim stanicama koje istovremeno izražavaju luciferin (Slika 57). Dok je CASP7 snažno zastupljena tijekom upale u stanicama mikroglije, CASP3 je dominantiji efektor kaskade kaspaza u neuronima te se signal dobiven na taj način u kulturama stanica ili *in vivo* može većinom pripisati CASP3 (177, 178).

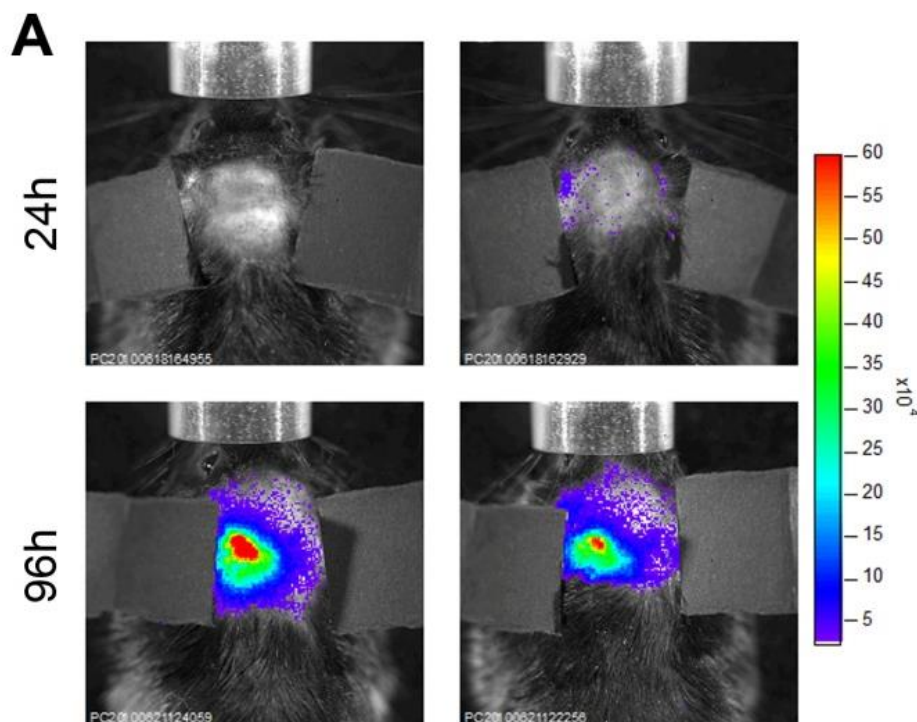


Slika 57. Shematski prikaz strategije pokusa sa VivoGlo™ supstratom. Nakon intraperitonealne injekcije dolazi do apsorpcije otopine cirkulaciju i njezine distribucije u mozak obzirom da prolazi krvno moždanu barijeru. Nakon ishemijskog oštećenja opsežna aktivacija CASP3 iz prokaspaze cijepa DEVD pentamer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

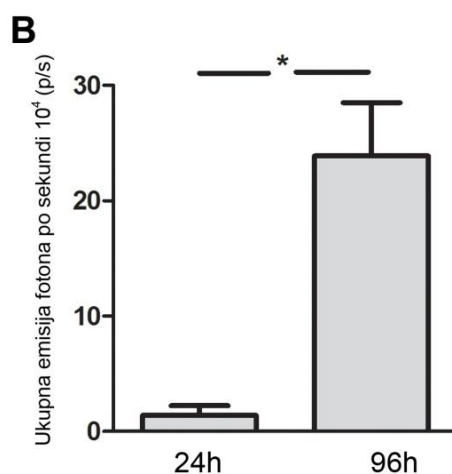
Koristeći 4 miša iz prethodnog pokusa u kojima se klasičnim D-luciferinom pokazalo da izražavaju luciferazu potaknutu Gap43 promotorom, pristupilo se primjeni Z-DEVD aminoluciferina nakon što je izašlo prethodno postignuti signal (2 sata nakon snimanja).

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

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



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



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

6. RASPRAVA

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

Postupak prolazne okluzije srednje moždane arterije (MCAO) intraluminalnim filamentom je prema literaturi najčešći model izazivanja ishemijskog oštećenja obzirom na svoju malu invazivnost (nije potrebna kraniotomija) i visoku reproducibilnost.

Na, unatoč svim naporima za standardizaciju ishemijskog oštećenja, mjerenje njegov volumen postoji relativno visoka standardna devijacija koja je prihvaćena prilikom standardizacije modela od 40% veličine samog oštećenja. Osim toga, nisu sve moždane strukture jednako zahvaćene kod svih miševa, te je potrebno potvrditi regionalnu raspodjelu ishemije nekom od metoda *in vivo* oslikavanja dobre prostorne razlučivosti, koje su često nedostupne za male glodavce.

Usprkos nabrojenim nedostacima, MCAO još uvijek prednjači pred svojim alternativama ukoliko je polje interesa molekularna analiza perilezionalnog korteksa unilateralnog hemijskog oštećenja.

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

Prilikom izolacije tkiva za Western blot u akutnim vremenskim točkama bojanje TTC-om može poslužiti kao orijentacija za prisutnost lezije, ali ne i za njenu kvantifikaciju. U kasnijim vremenskim točkama TTC nije koristan orijentir, već tome služi prisutstvo ožiljka ili morfološkog defekta zahvaćene hemisfere.

Bojanje krezil violetom je iznimno koristan i jednostavan postupak koji se može provesti za sve uzorke namijenjene histološkim bojanjima, te osim utvrđivanja same prisutnosti oštećenja, ono omogućuje i njegovu kvantifikaciju.

Obzirom na veliku učestalost hidrocefalusa kod korigiranog soja, progirenje studije MR oslikavanjem *in vivo* dalo bi presudan doprinos utvrđivanju početnog stanja za životinje u ispitivanju te omogućilo isključivanje onih s hidrocefalusom te identifikaciju onih s povećanjem likvorskih prostora nakon postupka MCAO.

Navedenim modelom, nakon uvodnog razdoblja uvježbavanja, postiže se zadovoljavajuće preživljenje s iznimnom smrtnošću unutar 24 sata od zahvata, osobito ukoliko se radi o modelu s reperfuzijom koji je korišten u izradi ovog doktorata.

6.2. Odgođeni nastup senzo-motornih simptoma neurološkog oštećenja kod *Tlr2*^{-/-} miševa u odnosu na miševe divljeg tipa

Testovi ponašanja predstavljaju najizravniju mjeru utjecaja neurološkog oštećenja na osjet i motoričke funkcije, kao i oporavka navedenih funkcija u razdoblju nakon MCAO kod miševa. Međunarodni konzorcij za ispitivanje fenotipova miševa dosad nije utvrdio osobitosti *Tlr2*^{-/-} u odnosu na C57Bl/6, no razvidno je iz ranijih istraživanja (179), a i ovog provedenog u sklopu doktorata, kako postoje molekularne osnove za razlike u fiziološkim zbivanjima kod *Tlr2*^{-/-} i miševa divljeg tipa osobito na temelju rezultata različitih izražaja gena uključenih u signalni put TLR2 (116).

Linjenica da se ne radi o uvjetovanom isključivanju gena (*engl. conditional knock out*) kojim bi se pojedini gen proizvoljno isključio nakon što je njegova dotadašnja funkcija bila normalna i tijekom razvoja i tijekom odrasle dobi, ostavlja mogućnost utjecaja trajnog isključivanja *Tlr2*^{-/-} gena na početno stanje miševa koji ga ne posjeduju, ali i na njihovo ponašanje u odrasloj dobi te starenju.

Stoga je bilo potrebno sva ispitivanja ponašanja provoditi s dovoljnim brojem lažno operiranih miševa *Tlr2*^{-/-} genotipa kao kontrola koje bi ukazale na unaprijed postojeće razlike između njih i miševa divljeg tipa.

Takve su se blage, ali uočljive unaprijed postojeće razlike pokazale u tjelesnoj težini i njenim promjenama mjesec dana nakon lažnog zahvata, odnosno u dobi od 4 mjeseca kad lažno operirani miševi divljeg tipa nastavljaju više dobivati na težini, u usporedbi sa svojim *Tlr2*^{-/-} parovima. *Tlr2*^{-/-} miševi u dobi od 4 mjeseca pokazuju i blago smanjenje količine kretanja što se očituje 28.dana ispitivanja nakon zahvata u ukupnom broju kretnji u Schallertovom cilindru te duljini održavanja na ubrzavajućem rotarodu. Kako navedene razlike nisu statistički značajne na korištenoj veličini uzorka, sve bi statistički značajne razlike nastale nakon MCAO ukazivale na presudan utjecaj manjka TLR2 isključivo nakon ishemijskog oštećenja.

Neurološki deficit se pokazao kao osjetljiva mjera za prisutnost ishemijskog oštećenja, ali nije bio dovoljno osjetljiv da na ispitivanoj veličini uzorka prikaže značajne promjene u odnosu na genotip, kao što je uočeno kod ranije provedenih istraživanja (121).

Osjetljivost neurološkog deficita ovisi o subjektivnom pristupu zasljepljenog ispitaiva te zbog svog kratkog trajanja i malog opsega promatranja zahtjeva primjenu dodatnih testova

ponašanja. Ukoliko bi se mjera neurološkog deficita kod miševa htjela koristiti kao jedini alat promatranja ponašanja nakon MCAO, bilo bi potrebno produžiti vrijeme promatranja te uvesti dodatne kategorije kao što su prisutnost epileptičkih napadaja, prisutnost nakostriježene dlake, nedostatak samotimarenja, oblik uški i slično. Test korigen u ovom radu pokazao se kao tek brza orijentacija o stanju životinje koji može razlučiti je li životinja pretrpjela ishemiju mozga, je li dosegla humanu krajnju točku ili kod ispitivanog miša ne postoji nikakvih vidljivih neuroloških simptoma.

Promatrajući i grube parametre motoričke aktivnosti pomoću rotaroda i Schallertovog cilindra uočava se odgođen razvitak motoričkog oporavka kod kod Tlr2^{-/-} miševa s MCAO, koji se pri tom i nastavlja u kroničnu fazu oporavka.

Dok miševi divljeg tipa brzo razvijaju poremećaj osjeta naglo nakon ishemijskog oporavka te se oporavljaju od istog unutar tjedan dana, poremećaj osjeta mjeren bilateralnom taktilnom stimulacijom od Tlr2^{-/-} miševa je u početku mnogo blaži, polagano se razvija dosežući najveću vrijednost tek 7 dana nakon MCAO i potom se ne oporavlja, već se nastavlja u preklapanju s motoričkim poremećajem.

Test obostranog podraživanja dodirnom se pokazao dovoljno specifičnim za uočavanje izoliranog senzornog deficita, iako je postojala bojazan kako li ne ostati maskiran izrazitim poremećajima motorike nakon MCAO.

Takvi rezultati s blažim i odgođenim nastupom oporavka koje se potom nastavlja pojačavati u kroničnu fazu, ukazuju na potrebu da se istraže tkivni supstrati opaženih zbivanja pomoću prikaza kapilarne i neuralne mreže te biljega sinapsi.

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

Obzirom na opseg mikrocirkulacije i veličinu krvnih žila kod Tlr2^{-/-} i WT miševa može se zaključiti kako opća dostupnost hranjivih tvari mjesec dana nakon ishemijskog oporavka nije umanjena kod Tlr2^{-/-} te time ne predstavlja ograničavajući čimbenik u oporavku neuralne mreže. No, nađene su promjene u parametrima mikrocirkulacije koje ukazuju na sporije sazrijevanje novonastalih krvnih žila te manji broj njihovih grananja. Ranija istraživanja pokazuju da je TLR2 prisutan na endotelnim stanicama, te se može pretpostaviti kako bi signalni put TLR2 mogao utjecati na stvaranje čimbenika angiogeneze (npr. čimbenik rasta krvnih žila iz endotela, *engl. vascular endothelial growth factor*, VEGF) (93). Pored proučavanja utjecaja TLR-ova na angiogenezu, ukazuje se potreba za ispitivanjem mikrovaskularne mreže i u akutnim i subakutnim vremenskim točkama nakon ishemije gdje

bi se potencijalno mogle uoiti razlike u njenom opsegu kod Tlr2-/- ĥivotinja u odnosu na WT.

6.4. Asimetrija neuralne mreŹe u podlozi neuroloŹkih simptoma

Promatrajui neuralnu mreŹu pomoiu YFP-a potaknutog Thy1 promotorom u kroniinoj vremenskoj toiki od 28 dana nakon ishemijskog oġeena, kod miġeva divljeg tipa nije uoena razlika u optiikoj gustoii izmeiu zahvaene i nezahvaene moġdane polutke, dok je zahvaljujui blagom porastu IOD-a u nezahvaenoj polutki te blagom padu IOD-a u zahvaenoj polutki kod ĥivotinja bez TLR2 nastupila asimetrija sastavnica neuralne mreŹe. Takav nalaz odraava prezistenciju neuroloġkih simptoma kod Tlr2-/- miġeva koji su pak mnogo izraeniji od samog histoloġkog supstrata. Stoga je bilo potrebno analizirati dodatne parametre poput utjecaja TLR2 na apoptotski put koji utjei e poglavito na brojnost neurona, te utjecaja TLR2 na izrahaaj bjelanl'evina sinapsi.

6.5. TLR2 dijeli signalni put s drugim receptorima upale

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

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

Obzirom da se kod Tlr2-/- bazalne razine mRNA za TLR2 nisu promijenile, moze se zakljuiti kako u samom signalnom putu ne postoji potreba za nadoknadom neaktivnog receptora putem njegovog pojaanog izrahaaja.

Dinamika izrahaaja *Tlr2* je ranije opisana kod miġeva s funkcionalnim TLR2 putem *in vivo* oslikavanja bioluminiscencije luciferazom potaknutom *Tlr2* promotorom transgeniinih *Tlr2-luc/gfp* miġeva (62).

U ovom istraivanju potvrena je identilna dinamika izrahaaja Tlr2 s akutnim porastom unutar 72 sata i maksimalnom vrijednoiu tjedan dana nakon ishemije.

No, pratei izrahaaj *Tlr2* kod Tlr2-/- miġeva nakon ishemijskog oġeena nije uoena kompenzacija kroz snaġnije prepisivanje *Tlr2*, vei upravo suprotno, odgovor izrahaajem *Tlr2* bio je niĥi.

To je dovelo do zakljuika da izrahaaj *Tlr2* ne ovisi o prisutstvu djelatne bjelanl'evine TLR2, vei o samom signalnom putu TLR2.

Receptori nalik na Toll (TLR-ovi) su općenito odgovorni za složenu signalnu mrežu urođene imunosti, te međusobno ispreplitanje signalnih putova različitih TLR-ova određuje razmjer i vrstu imunološkog odgovora.

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

Upravo iz tog razloga isključivanje *Tlr2* gena nije u potpunosti dokinulo njegov signalni put te je ostala očuvana pozitivna povratna sprema puta ovisnog o *Tlr2* i njegovog izražaja.

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

Iako su bazalne razine skręene mRNA *Tlr2* kod *Tlr2*^{-/-} miševa ostale iste, izražaj mnogih ispitanih gena signalnog puta TLR2 izmijenio je svoju bazalnu razinu kod *Tlr2*^{-/-}, uključujući i: *MyD88*, *Irak1*, *Irak4*, *Ikkkb*, *Irak3*, *Tollip*, *Tnf*, *Il6* i *Casp8*.

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

Stoga se uoćene razlike u fenotipu prilikom analize *Tlr2*^{-/-} nakon MCAO moraju razmatrati uzimajući u obzir navedena ogranićenja usporedbe (116, 117, 181).

6.6. Adapterska bjelanćevina MyD 88 nadoknađuje manjak TLR2

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

Izražaj *Myd88* se povećao kod miševa divljeg tipa nakon ishemijskog oštećenja, no taj odgovor nije uoćen kod *Tlr2*^{-/-} miševa. Pri tom je i razina *Myd88* kod *Tlr2*^{-/-} miševa bila bazalno povećana.

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

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

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

Od gena odabranih za ispitivanje razine mRNA samo je *Nfkb1a* ostao nepromijenjenog izražaja kod oba genotipa nakon ishemijskog oštećenja. Promjena je izostala i za *Il-6*, no samo u ipsilateralnoj hemisferi oba genotipa.

Ovim se testom nisu pokazale promjene za *Nfkb1a* i *Il-6* u akutnim vremenskim točkama, što je u suprotnosti s ranijim istraživanjima (117, 185).

Geni čiji je izražaj mRNA bio smanjen nakon MCAO uključivali su *Irak1*, *Tollip* i *Ikbkb*, a pri tom su isti kod Tlr2^{-/-} miševa bilo još više utižani, odnosno smanjenog izražaja.

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

Preostali geni imali su pojačani izražaj nakon MCAO, a to je uključivalo pozitivne regulatore signalnog puta ovisnog o TLR2 (*Irak4*, *Nfkb1*), citokine (*Tnf*, *Il1b* i njegov aktivator *Casp1*) te inhibitor apptoze *Casp8*. Za sve je navedene gene odgovor na ishemiju kod Tlr2^{-/-} miševa bio smanjen u usporedbi s divljim tipom, osim za *Casp8*, gdje je razina mRNA *Casp8* više porasla kod Tlr2^{-/-} nego li kod WT nakon MCAO.

Prijašnja istraživanja akutnog odgovora nakon MCAO su pokazala da su *Tlr2* i povezani geni uključeni u upalni i apoptotički odgovor pojačanog izražaja sve do 96 sati nakon reperfuzije (116, 117, 181).

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

Većina analiziranih gena je pokazala veći odgovor na razini mRNA, a najznačajniji odgovor vidi se tjedan dana nakon MCAO u usporedbi sa svim drugim vremenskim točkama.

U kroničnoj vremenskoj točki od mjesec dana posebno su bili naglašeni izražaji gena za *Casp8* i *Tnf*.

Ako se *Tnf* predstavlja kao ključni predstavnik upalnog zbivanja, ovi rezultati potvrđuju da upalni odgovor prati intenzitet signalnog puta TLR2 do u kroničnu fazu nakon MCAO (62).

Stoga, u slučaju kad TLR2 nije funkcionalan (Tlr2^{-/-}), postojalo je jasno smanjenje odgovora u izražaju *Tnf*-a što ukazuje kako su mozgovi miševa Tlr2^{-/-} genotipa imali manje upale u usporedbi sa svojim kontrolama divljeg tipa (189).

Također, prijašnja istraživanja su pokazala smanjeni volumen ishemijskog oštećenja kod Tlr2^{-/-} u ranoj fazi nakon ishemije (116, 121). Stoga smanjen upalni odgovor kod Tlr2^{-/-} može uzrokovati smanjeni volumen ishemijskog oštećenja ili slijediti iz njega.

6.8. Manjak TLR2 dovodi do povećanja CASP8

Nasuprot tom smanjenju izražaja mRNA predstavnika upale (*Tnf*), *Casp8* je, kao predstavnik apoptoze, pokazao veći izražaj kod Tlr2^{-/-} u usporedbi s WT, osobito tijekom kronične faze oporavka.

Novije analize Tlr2^{-/-} miševa potvrđuju da iako su akutna ishemijska oštećenja (24-72h) bila manja nego li kod WT miševa, infarcirani volumeni su bili veći 7 dana nakon MCAO, kao i apoptoza neurona bez TLR2 (121).

Iako se smatra da manjak TLR2 uzrokuje manju upalu, što dovodi do povećanog izražaja *Casp8*, pojačane apoptoze u odgođenim vremenskim točkama te kasnijeg posljedičnog povećanja volumena oštećenja, moguća su i druga objašnjenja uzročno posljedične povezanosti navedenih događaja. Primjerice, izravan utjecaj manjka TLR2 na apoptozu i/ili odgoda u nastupu oštećenja.

Prikazani podaci, zajedno s ranijim istraživanjima naglašavaju kako optimalan i vremenski određen imunološki odgovor utječe na apoptozu te je nužan kako bi ograničio oštećenje neurona nakon moždanog udara.

6.9. Manjak TLR2 povećava izražaj biljega sinapsi i neuralnog stresa

Promatrajući razine bjelančevina koje su biljezi sinapsi, aksona i neuralnog stresa, pokazalo se kako je unatoč manjoj gustoći i neuralne mreže u korteksu ipsilezionalne hemisfere, količina sinaptičkih bjelančevina u kroničnoj vremenskoj točki od 28 dana značajno veća kod Tlr2^{-/-} miševa. Takav bi nalaz trebalo istražiti na razini morfometrije neurona kod Tlr2^{-/-} miševa prije i nakon ishemijskog oštećenja te bi samo rezultati na razini pojedinih stanica mogli objasniti radi li se o povećanom broju sinapsi po pojedinom ogranku neurona ili su ogranci brojniji i kraći i te ne sadrže mnogo citoskeleta na čiju pregradnju utječe GAP43.

Promatrajući GAP43 biljeg, pokazalo se kako on kod miševa divljeg tipa na razini bjelačevine uistinu prati dinamiku izražaja prikazanu bioluminiscencijom u prethodnim istraživanjima (127), no ona je kod Tlr2^{-/-} izmijenjena s naglim povećanjem mjesec dana nakon ishemijskog oštećenja.

No, istovremeno je prisutna i statistički značajno veća količina CASP3 koja, između ostalog, odražava i put CASP8 za čiju mRNA je u pokusu real time rtPCR-a identificirano kako se povećava kod Tlr2^{-/-} miševa nakon ishemijskog oštećenja (190).

Obzirom da manjak TLR2 utjele najintenzivnije upravo na CASP3, ta bi bjelančevina mogla posluhiti kao pokazatelj neuralnog stresa ukoliko se uspostavi model u kojem le se selektivno mo i prikazati populacija neurona, a to je upravo model transgeni n ih Gap43-luc/gfp mi geva.

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

Osnovna zbivanja po nastupu ishemijskog ote enja uklju uju aktivaciju molekularnih putova povezanih s upalom i regeneracijom tkiva(121).

Kod odraslih sisavaca nakon ozljede mo dane kore dolazi do odgovora pomo u pupanja aksona, pri emu je GAP43 najintenzivnije izra ena bjelančevina koja promi e rast (138, 145, 191, 192). Kod glodavaca s MCAO, GAP43 je prisutan tijekom rane faze u hri gu ishemijskog ote enja, a potom u penumbri(192). To upu je na ranu ulogu bjelančevine GAP43 u spa gavanju i regeneraciji tkiva. Kod trajne okluzije MCA, kad je ote enje uslijed izostanka reperfuzije ve e, GAP43 ne postoji u njenom hri gu, no izra haj mu je pove an dose h i svoj maksimum 7 dana nakon ishemije (193).

Rasvjetljavanje uloge GAP43 je napredovalo nedavnim otkri em kako je GAP43 prisutan i na postsinapti lkoj membrani te mo e predstavljati supstrat za CASP3(143, 144). Postsinapti lka lokacija bjelančevine GAP43 premjestila je te h i e u razumijevanju njegove uloge s mehani lke elongacije stani n ih nastavaka prema slo enijem pode gavanju unutarstani n ih mre a potrebnih za oporavak tkiva.

Idu i va an korak u rasvjetljavanju uloge bjelančevine GAP43 i CASP3 nastupio je u trenutku kad se pokazalo da CASP3 mo e djelovati na 56 razli itih supstrata u neuronu, te je, neovisno o GAP43, uklju ena u puteve povezane s kontrolom sastavnica citoskeleta neurona (npr. aktin, MAP2, Dbn i kalmodulin) (152).

To je dodalo novu dimenziju razumijevanju regeneracije nakon ishemijskog ote enja: stani na smrt je blisko povezana s produljavanjem novih stani n ih nastavaka i finim pode gavanjem novostvorenih me l stani n ih veza. Integriraju i navedene nove spoznaje, pretpostavljeno je kako su CASP3 i GAP43 uklju eni u zajedni lki put tijekom ranog odgovora nakon ishemijskog ote enja.

Rezultati ovog istra hivanja su pokazali kako se i GAP43 i CASP3 brzo i znakovito pove avaju u tkivu nakon MCAO te da su ta pove anja u pozitivnoj linearnoj koleraciji. Obzirom da je upala u sredi njem h i v anom sustavu vrlo slo eno, jedinstveno i te gko reproducibilno zbivanje, bilo je potrebno svesti varijabilnost na najmanju mogu u mjeru.

Neinvazivno praćenje bioluminiscencijom omogućilo je ponovne procjene lokalizacije i kvantifikacije staničnog signala na istim životinjama.

Pojavljeni signal za GAP43 i CASP3 dobiven bioluminiscencijom je detaljno poduprt metodama imunohistokemije. Analiza je pokazala da povećanje intenziteta signala za GAP43 i CASP3 nije nastupilo uslijed povećanja broja stanica koje izražavaju obje bjelancevine.

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

Sličen je rezultat dobiven analizom kolokalizacije koja je pokazala da GAP43 prikazuje relativno visok izražaj u odnosu na CASP3, mjeri prisutnost njegove reporterske bjelancevine GFP-a prvi dan nakon MCAO.

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

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

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

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

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

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

6.12. Odrednice za buduća istraživanja urođene imunosti nakon moždanog udara

6.12.1. Nedostaci provedenog znanstvenog istraživanja

Metoda izazivanja ishemijskog oštećenja putem MCAO kao standardizirani postupak ipak u sebi sadrži varijabilnost zahvaćenih područja mozga koja ponekad osim moždane kore uključuju hipokampus, amigdale i strijatum u različitoj mjeri. Takva odstupanja možda odražavaju moždani udar prisutan kod životjeka, no otežavaju usporedbu prilikom provođenja testova ponašanja.

Stoga je potrebno, pored kontrole protoka kroz teritorij MCA pomoću MCAO, uvesti metode in vivo oslikavanja lezije visoke prostorne razlučivosti koja bi omogućila specifične zaključke testova ponašanja, ali i koregistraciju s drugim modalitetima in vivo oslikavanja koji ne podržavaju takvu razlučivost.

Primjena TTC bojanja ograničena je samo na prva 3 dana nakon ishemijskog oštećenja, nakon čega radi dolaska živih upalnih stanica na mjesto ishemije prestaje postojati ograđena granica koja do tad dijeli tkivo bez aktivnih dehidrogenaza čiji je TTC supstrat.

Stoga je potrebno sve uzorke mišjih mozgova pripremljene za imunohistokemiju analizirati pomoću bojanja krezil violetom. To nije bilo moguće na svim uzorcima u ovom istraživanju jer se tkivo mozga za određivanje razina bjelancevina i mRNA usitnjuje odmah po izolaciji.

Obzirom da TLR2 posreduje u upali koja može biti izazvana egzogenim limbenicima, svaka epidemija zaraze u životinjskoj nastambi se odražava na njegovu aktivaciju. Kako bi se izbjegli takvi izvanjski utjecaji na rezultate, bilo je potrebno istovremeno imati dovoljan broj kontrolnih životinja koje bi služile kao pokazatelj promjena u okolišu. Kako to nije uvijek moguće radi ograničenog broja životinja, poboljšanje uvjeta u životinjskoj nastambi predstavljalo bi ključni limbenik daljnjeg proučavanja imunoloških zbivanja kod miševa.

Procjena neurološkog statusa prema Garcii se nije pokazala dovoljno osjetljivom za uočavanje senzo-motoričkih simptoma koji su utvrđeni drugim testovima. Ukoliko bi se provodila kao samostalna metoda bihevioralne procjene neurološkog oštećenja bez dodatnog progrediranja promatranja s parametrima izgleda i dugotrajnijeg promatranja koje bi uočilo eventualne epileptičke napade, te, mogla bi polučiti velik broj lažno negativnih rezultata.

Broj životinja uključenih u ispitivanje testova ponašanja onemogućavao je provođenje ispitivanja anksioznosti, emocionalnosti i radnog pamćenja (Y-labirint, otvoreno polje), obzirom da ona zahtijevaju u slučaju miša kao eksperimentalne životinje najmanje 15 miševa po ispitivanoj skupini kako bi se donijeli valjani zaključci (194).

Prikaz neuralne mreže omogućuje uvid u sveukupnu količinu tijela neurona i njihovih nastavaka, no za preciznije utvrđivanje aksonalnog urastanja bilo bi potrebno koristiti specifične biljege aksona te po mogućnosti mjeriti njihovo urastanje iz kontralateralne hemisfere što se postiže stereotaksijskom injekcijom biljega koji anterogradno putuju aksonima, kao što su dekstran amini obilježeni nekom od fluorescentnih proba.

U pokusu brojanja GAP43 pozitivnih stanica korišten je GFP kao neizravni fluorescentni reporter za prisutnost bjelančevine GAP43. Kako god, GFP se nakuplja u stanici i sporije razgrađuje od samog GAP43 te dobiveni signal ne mora u potpunosti odražavati trenutni, već ukupni izražaj GAP43 u životu svake pojedine stanice. Stoga bi preciznije bilo mjeriti GAP43 na histološkim rezovima protutijelima specifičnim za navedenu bjelančevinu, a GFP koristiti samo kao orijentir za stanice u kojima očekujemo signal.

6.12.2. Odrednice za buduća istraživanja

U skladu s navedenim nedostacima provedenog istraživanja, daljnja istraživanja na polju urođene imunosti koja uključuju izazivanje ishemijskog oštećenja pomoću MCAO, trebala bi sadržavati neko od *in vivo* oslikavanja visoke prostorne razlučivosti, kao što su to magnetna rezonancija i mikro-kompjuterizirana tomografija kako bi se omogućilo razlikovanje životinja kojima su zahvaćene različite regije mozga.

Unaprjeđenje uvjeta u životinjskoj nastambi do razine slobodne za specifične patogene (*engl. Specific Pathogen Free, SPF*) isključivalo bi utjecaj vanjskih aktivatora receptora urođene imunosti, te bi bio potreban manji broj životinja kao kontrola, a k tome bi se povisilo i preživljenje životinja nakon MCAO obzirom da ne bi bile opterećene pratećom infekcijom (195).

Uključivanje većeg broja miševa u skupine za ispitivanje ponašanja presudno je za stjecanje zaključaka o njihovom radnom pamćenju, anksioznosti i emocionalnosti koja mogu također biti pod utjecajem signalnog puta TLR-ova. Stoga je za buduća ispitivanja, osim probira životinja sa zahvaćenim regijama amigdale i hipokampusa za navedene pokuse, potrebno formirati dovoljno velike skupine za ispitivanja poput Y-labirinta i otvorenog polja.

Prilikom posredne analize izrađaja gena od interesa putem sustava reporterske bjelančevine GFP-a, potrebno je uzeti u obzir njeno dugo vrijeme poluživota te ga usporediti sa signalnom dobivenim specifičnim protutijelima za bjelančevinu od interesa. U suprotnom bi dobivene rezultate moglo biti teško tumačiti samo na temelju unutarstaničnog nakupljanja GFP-a.

Obzirom na korisnost primjene prosubstrata za luciferazu u obliku Z-DEVD-aminoluciferina za orijentaciju u upalnim zbivanjima nakon ishemijskog oštećenja kod GAP43-luc/gfp miševa, daljnji bi smjer istraživanja svakako uključivao primjenu istog postupka kod životinja koje imaju isključen Tlr2 gen, odnosno na križanom soju između *Gap43/luc/GFP* i *Tlr2*^{-/-} miševa.

Kako se bioluminiscencija pokazala iznimno jednostavnom i brzom metodom za praćenje izrađaja gena od interesa, njena buduća primjena uključuje:

- stvaranje novih transgeničnih životinja po pitanju gena od interesa;
- stvaranje novih transgeničnih životinja s novim ciljnim enzimima;
- praćenje dinamike izrađaja nakon drugih oblika neuroloških oštećenja;
- stvaranje i razvoj novih prosubstrata i supstrata za ciljne bioluminiscentne enzime;
- razvoj novih pristupa u oslikavanju bioluminiscencije.

Kao metoda probira budućih ciljnih molekula u istraživanju moždanog udara idealnom se pokazala tehnologiju DNA mikročipa koja omogućuje praćenje diferencijalnog izrađaja na tisuće gena. Tako je, primjerice, dobiven uvid u pojačavanje i utišavanje izrađaja pojedinih gena po vremenskim točkama nakon ishemijskog oštećenja: 30 minuta unutar nastupa ishemije bili su pojačani geni neposrednog ranog odgovora (*engl. immediate early genes*), geni transkripcijskih faktora i bjelančevina toplinskog šoka (*engl. heat shock proteins*, HSPs). Slijedilo je pojačavanje gena upale (primjerice limbenika aktivacije trombocita, *engl. platelet-activating factor*, PAF; limbenika nekroze tumora- α , *engl. tumor necrosis factor- α* , TNF- α ; i interleukin 1- β , IL-1 β), apoptoze, citoskeleta i metabolizma s vrhuncem između 4-24 sata. Neurotropni limbenici su pokazali odgođeno pojačavanje s početkom od 24h i trajanje do 7 dana nakon ishemije. Utišani su bili geni ionskih kanala i receptora za neurotransmitere unutar 8-24 sata, a potom su geni sinaptičkih bjelančevina bili utišani 3-7 dana nakon MCAO (196).

Rezultati dobiveni tehnologijom oligonukleotidnih mikročipova imaju svoja ograničenja prilikom longitudinalnog praćenja izrađaja gena u više vremenskih točaka, poglavito jer se

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

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

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

6.12.3. Translacijska vrijednost istraživanja

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

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

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

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

7. ZAKLJUČAK

7.1. OPĆI ZAKLJUČAK

Djelovanje TLR2 nakon ishemijskog oštećenja mišjeg mozga potiče funkcionalni oporavak i ranu reaktivnu sinaptogenezu. Kod miševa divljeg tipa (C57Bl/6) u odnosu na miševe s onemogućenim *Tlr2* genom, nastup oštećenja je raniji i opsewniji, no i sam oporavak započinje bez odgode prisutne kod *Tlr2*^{-/-} miševa, dok se kod *Tlr2*^{-/-} oporavak odgađa i trajanje oštećenja se produljuje.

7.2. SPECIFIČNI ZAKLJUČCI

- I. Funkcionalni oporavak kod *Tlr2*^{-/-} miševa nastupa kasnije i njegovo se trajanje produljuje u odnosu na miševe divljeg tipa. To navodi na zaključak kako je TLR2 važan za dinamiku upale, intenzivirajući je i dovodeći do njene brže resolucije.
- II. Reaktivna sinaptogeneza je povećana u kroničnom stadiju oporavka (28 dana) nakon ishemijskog oštećenja u mišjem mozgu kod *Tlr2*^{-/-} miševa u odnosu na miševe divljeg tipa. To navodi na zaključak da urođena imunost ima ulogu u procesu sinaptogeneze u kroničnoj fazi oporavka nakon moždanog udara.
- III. Gustoća neuralne mreže u kori zahvaćene polutke mišjeg mozga nakon MCAO u kroničnom stadiju oporavka (28 dana) nakon ishemijskog oštećenja je smanjena kod miševa s onemogućenim *Tlr2* genom u odnosu na miševe divljeg tipa.
- IV. Usporeno je sazrijevanje krvnih žila te je smanjen broj njihovih grananja u kori zahvaćene polutke mišjeg mozga nakon MCAO u kroničnom stadiju oporavka (28 dana) nakon ishemijskog oštećenja kod miševa s onemogućenim *Tlr2* genom u odnosu na miševe divljeg tipa.
- V. GAP43 i CASP3, zbog svoje izraženosti u oštećenom moždanom tkivu, predstavljaju biološke odrednice intenziteta upalnih zbivanja nakon ishemijskog oštećenja.

8. KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU

ULOGA TLR2 U MODULACIJI SINAPTIČKE PLASTIČNOSTI I OPORAVKA POSLIJE ISHEMIJSKOG OŠTEĆENJA MIJEĖGA MOZGA

Dunja Gorup, 2016.

Osnovne odrednice postishemijske upale su signalni putovi urođene imunosti, od kojih su se najzastupljenijim pokazali putovi ovisni o TLR2 izraženim na stanicama mikroglije.

S ciljem određivanja djelovanja TLR2 na funkcionalni oporavak i reaktivnu sinaptogenezu, provedeno je istraživanje na modelu ishemijskog oštećenja mišjeg mozga s onemogućenim *Tlr2* genom (*Tlr2*^{-/-}) pomoću okluzije središnje moždane arterije (*engl. Medial Cerebral Artery Occlusion*, MCAO) što je omogućilo promatranje postishemijskih zbivanja na razini izražaja mRNA, bjelančevina i struktura tkiva te njihovog odraza na neurološke simptome.

Funkcionalno oštećenje mjereno testovima ponašanja kod *Tlr2*^{-/-} miševa nastupa kasnije i u blažem obliku, te se njihov oporavak produljuje u odnosu na miševe divljeg tipa (*engl. Wild Type*, WT). Metodom qPCR-a uvrštene su promjene količine izražaja gena signalnog puta TLR2: *MyD88*, *FADD* i *Casp8*.

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

Gustoća neuralne mreže bila je smanjena kod *Tlr2*^{-/-} miševa u odnosu na WT kontrole, kao i broj grananja krvnih žila sa sporijim sazrijevanjem mikrovaskularne mreže.

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

9. KRATKI SADRŽAJ NA ENGLISKOM JEZIKU - SUMMARY

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

Dunja Gorup, 2016

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

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

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

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

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

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

10. POPIS LITERATURE

1. World Health Organisation. *Cerebrovascular Disorders (Offset Publications)*. 1978.
2. Donnan, G.A. et al. *Stroke*. Lancet, 2008. 371(9624): 1612-23.
3. World Health Organisation. *International Classification of Diseases (ICD)*. 1990; Dostupno na: <http://www.who.int/classifications/icd/en/>.
4. World Health Organisation, C.f.D.C. *Atlas of Heart Disease and Stroke*. 2012.
5. Worlth Health Organisation *Deaths from stroke*. 2015; Dostupno na: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/cvd_atlas_16_death_from_stroke.pdf?ua=1.
6. Seshadri, S. et al. *The lifetime risk of stroke: estimates from the Framingham Study*. Stroke, 2006. 37(2): 345-50.
7. Feigin, V.L. et al. *Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010*. Lancet, 2014. 383(9913): 245-54.
8. Zdravstvo, H.Z.Z.J. *Izješće o umrlim osobama u Hrvatskoj u 2014. godini*. 2015; Dostupno na: http://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/umrli_20141.pdf.
9. Smajlovic, D. B. Kojic, et O. Sinanovic, *Five-year survival-after first-ever stroke*. Bosn J Basic Med Sci, 2006. 6(3): 17-22.
10. Kralj V, H.-H.V. *Javnozdravstveni značaj kardiovaskularnih bolesti*. Kardio list, 2009. 3: 73-76.
11. World Health Organisation. *Economic Costs*. 2014; Dostupno na: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/cvd_atlas_17_economics.pdf?ua=1.
12. Thrift, A.G. et al. *Global stroke statistics*. Int J Stroke, 2014. 9(1): 6-18.
13. World Health Organisation *Estimated Deaths By Cause*. 2014; Dostupno na: <https://docs.google.com/spreadsheets/d/1XiJAJiNFEdIwtqm6xaCtU96m1DfPef8ieRHN2WmOVY/edit>.
14. Menken, M. T.L. Munsat, et J.F. Toole, *The global burden of disease study: implications for neurology*. Arch Neurol, 2000. 57(3): 418-20.
15. Rothwell, P.M. *The high cost of not funding stroke research: a comparison with heart disease and cancer*. Lancet, 2001. 357(9268): 1612-6.
16. Tracey, J.A. et al. *Mapping behavioral landscapes for animal movement: a finite mixture modeling approach*. Ecol Appl, 2013. 23(3): 654-69.
17. Stroke Therapy Academic Industry, R. *Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development*. Stroke, 1999. 30(12): 2752-8.
18. Macrae, I.M. *New models of focal cerebral ischaemia*. Br. J. clin. Pharmac. 1992. 34: 302-308.
19. Casals, J.B. et al. *The use of animal models for stroke research: a review*. Comp Med, 2011. 61(4): 305-13.
20. Garosi, L.S. et J.F. McConnell, *Ischaemic stroke in dogs and humans: a comparative review*. J Small Anim Pract, 2005. 46(11): 521-9.
21. Bacigaluppi, M. G. Comi, et D.M. Hermann, *Animal models of ischemic stroke. Part two: modeling cerebral ischemia*. Open Neurol J, 2010. 4: 34-8.
22. Daniel I Slater, S.C.G. Tonya Marie Cook, Kristen L Burnham. *Middle Cerebral Artery Stroke*. Medscape 2015; Dostupno na: <http://emedicine.medscape.com/article/323120-overview>.
23. Yuan, F. et al. *Optimizing suture middle cerebral artery occlusion model in C57BL/6 mice circumvents posterior communicating artery dysplasia*. J Neurotrauma, 2012. 29(7): 1499-505.
24. Flecknell, P. *Replacement, reduction and refinement*. ALTEX, 2002. 19(2): 73-8.
25. Belayev, L. et al. *Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model*. Stroke, 1996. 27(9): 1616-22; discussion 1623.
26. Koizumi J, Y.Y. Nakazawa T, Ooneda G. *Experimental studies of ischemic brain edema, I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area*. Jpn J Stroke, 1986. 8: 1-8.

27. Grotta, J.C. et A.V. Alexandrov, *tPA-associated reperfusion after acute stroke demonstrated by SPECT*. Stroke, 1998. 29(2): 429-32.
28. Tamura, A. et al. *Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion*. J Cereb Blood Flow Metab, 1981. 1(1): 53-60.
29. Watson, B.D. et al. *Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis*. Ann Neurol, 1985. 17(5): 497-504.
30. Durukan, A. et T. Tatlisumak, *Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia*. Pharmacol Biochem Behav, 2007. 87(1): 179-97.
31. Aronowski, J. R. Strong, et J.C. Grotta, *Reperfusion injury: demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats*. J Cereb Blood Flow Metab, 1997. 17(10): 1048-56.
32. Doccol Corporation, D. *Doccol MCAO Sutures Reduce SD to 5% of Its Corresponding Mean Value for Infarction Volume*. 2015; Dostupno na: http://www.doccol.com/information.php?info_id=22.
33. Katsura, K. T. Kristian, et B.K. Siesjo, *Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain*. Biochem Soc Trans, 1994. 22(4): 991-6.
34. Smith, W.S. *Pathophysiology of focal cerebral ischemia: a therapeutic perspective*. J Vasc Interv Radiol, 2004. 15(1 Pt 2): S3-12.
35. Dereski, M.O. et al. *The heterogeneous temporal evolution of focal ischemic neuronal damage in the rat*. Acta Neuropathol, 1993. 85(3): 327-33.
36. Dirnagl, U. C. Iadecola, et M.A. Moskowitz, *Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view*. Trends Neurosci, 1999. 22(9): 391-7.
37. Takano, K. et al. *Glycine site antagonist attenuates infarct size in experimental focal ischemia. Postmortem and diffusion mapping studies*. Stroke, 1997. 28(6): 1255-62; discussion 1263.
38. Dijkhuizen, R.M. et al. *Correlation between tissue depolarizations and damage in focal ischemic rat brain*. Brain Res, 1999. 840(1-2): 194-205.
39. McIlvoy, L.H. *The effect of hypothermia and hyperthermia on acute brain injury*. AACN Clin Issues, 2005. 16(4): 488-500.
40. Fujimura, M. et al. *Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood-brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion*. Brain Res, 1999. 842(1): 92-100.
41. De Keyser, J. et al. *Neuroprotection in acute ischemic stroke*. Acta Neurol Belg, 2005. 105(3): 144-8.
42. Ginsberg, M.D. *Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future*. Neuropharmacology, 2008. 55(3): 363-89.
43. Candelario-Jalil, E. *Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: considerations for the development of novel neurotherapeutics*. Curr Opin Investig Drugs, 2009. 10(7): 644-54.
44. Ames, A. 3rd, et al. *Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon*. Am J Pathol, 1968. 52(2): 437-53.
45. Frank-Cannon, T.C. et al. *Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases?* Mol Neurodegener, 2009. 4: 47.
46. Kettenmann, H. et A. Verkhratsky, *Neuroglia: the 150 years after*. Trends Neurosci, 2008. 31(12): 653-9.
47. Jessen, K.R. et R. Mirsky, *Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein*. Nature, 1980. 286(5774): 736-7.
48. Rasband, M.N. *Glial Contributions to Neural Function and Disease*. Mol Cell Proteomics, 2016. 15(2): 355-61.
49. del Rio-Hortega P, P.W. *Cerebral Cicatrix: the Reaction of Neuroglia and Microglia to Brain Wounds*. Bulletin of the Johns Hopkins Hospital 1892. 41: : 278ñ303.
50. P, d.R.-H. *Microglia*, in *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*. 1937. 481ñ 534.
51. Hanisch, U.K. et H. Kettenmann, *Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain*. Nat Neurosci, 2007. 10(11): 1387-94.

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

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

107. Saitoh, S. et al. *Ligand-dependent Toll-like receptor 4 (TLR4)-oligomerization is directly linked with TLR4-signaling*. J Endotoxin Res, 2004. 10(4): 257-60.
108. Medzhitov, R. *Toll-like receptors and innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2001. 1(2): 135-45.
109. Dabbagh, K. et D.B. Lewis, *Toll-like receptors and T-helper-1/T-helper-2 responses*. Curr Opin Infect Dis, 2003. 16(3): 199-204.
110. Takeda, K. et S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity*. Int Immunol, 2005. 17(1): 1-14.
111. Kawai, T. et al. *Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes*. J Immunol, 2001. 167(10): 5887-94.
112. Marsh, B.J. *Preconditioning reprograms TLR signaling following cerebral ischemia the emergence of a neuroprotective program*, ed. S. Archive. Vol. Paper 408. 2008, Oregon.
113. Erridge, C. *Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants?* J Leukoc Biol, 2010. 87(6): 989-99.
114. Scheibner, K.A. et al. *Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2*. J Immunol, 2006. 177(2): 1272-81.
115. Funderburg, N. et al. *Human -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(47): 18631-5.
116. Lehnardt, S. et al. *Toll-like receptor 2 mediates CNS injury in focal cerebral ischemia*. J Neuroimmunol, 2007. 190(1-2): 28-33.
117. Ziegler, G. et al. *TLR2 has a detrimental role in mouse transient focal cerebral ischemia*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. 359(3): 574-9.
118. Aliprantis, A.O. et al. *The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2*. EMBO J, 2000. 19(13): 3325-36.
119. Koedel, U. et al. *Acute brain injury triggers MyD88-dependent, TLR2/4-independent inflammatory responses*. Am J Pathol, 2007. 171(1): 200-13.
120. Bohacek, I. et al. *Toll-like receptor 2 deficiency leads to delayed exacerbation of ischemic injury*. J Neuroinflammation, 2012. 9: 191.
121. Bohal'ek, I. *Uloga receptora TLR2 u odgovoru mozga nakon ishemijskoga oštećenja*. 2012, Zagreb: Sveučilište u Zagrebu.
122. Oliveira-Nascimento, L. P. Massari, et L.M. Wetzler, *The Role of TLR2 in Infection and Immunity*. Front Immunol, 2012. 3: 79.
123. Hayasaka, N. et al. *In vivo diagnostic imaging using micro-CT: sequential and comparative evaluation of rodent models for hepatic/brain ischemia and stroke*. PLoS One, 2012. 7(2): e32342.
124. Heiss, W.D. et al. *Dynamic penumbra demonstrated by sequential multitracer PET after middle cerebral artery occlusion in cats*. J Cereb Blood Flow Metab, 1994. 14(6): 892-902.
125. Seo, Y. et al. *Rodent brain imaging with SPECT/CT*. Med Phys, 2007. 34(4): 1217-20.
126. Thorek, D. et al. *Cerenkov imaging - a new modality for molecular imaging*. Am J Nucl Med Mol Imaging, 2012. 2(2): 163-73.
127. Gravel, M. Y.C. Weng, et J. Kriz, *Model system for live imaging of neuronal responses to injury and repair*. Mol Imaging, 2011. 10(6): 434-45.
128. Li, J. et al. *Cage the firefly luciferin! - a strategy for developing bioluminescent probes*. Chem Soc Rev, 2013. 42(2): 662-76.
129. Harvey, E.N. *A history of luminescence from the earliest times until 1900*, ed. T.A.P. Society. Vol. 44. 1957, Philadelphia.
130. Shimomura, O. *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*. 2012, Singapore: World Scientific Publishing.
131. Aldrich, S. *VivoGlo - Z-DEVD-Aminoluciferin*. 2015; Dostupno na: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/19504?lang=en®ion=HR>.
132. Contag, C.H. et al. *Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts*. Mol Microbiol, 1995. 18(4): 593-603.
133. Samar Basu, L.W. *Studies on Experimental Models*. 2011, New York: Humana Press.

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

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

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

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1984. godine u Zagrebu. 2008. sam diplomirala na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a 2009. obavila jednogodišnji pripravnički staž doktora u Kliničkoj bolnici Dubrava u Zagrebu te 2011. položila stručni ispit.

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

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

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

Popis publikacija:

Originalni znanstveni radovi

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

Kongresni saĥeci

- I. **Gorup D**, Bohal'ek I, Milil'eviĭ T, Pochet R, Mitrel'iĭ D, Kriĥ J, Gajoviĭ S (2015) The role of developmentally active genes in postischemic recovery. 4th Croatian Congress of Neuroscience, Split, Croatia, September 17-19, 2015, 42-43
- II. **Gorup D**, Gajoviĭ S, Rosario M (2013) The role of corticogenesis-regulating genes during brain repair and regeneration after ischemia. SNCöl3 SiNAPSA Neuroscience Conferenceöl3, Ljubljana, Slovenia, September 27-29, 2013, 57
- III. **Gorup D**, Gajoviĭ S, De Rocha M (2013) Corticogenesis controlling genes in the brain repair and regeneration after ischemic lesion in the mouse. 4th Croatian Congress of Neuroscience, Zagreb, Croatia, September 20-21 2013, 36
- IV. **Gorup D**, Bohal'ek I, Lalancette-Hebert M, Weng YC, Gajoviĭ S, Kriĥ J (2011) Influence of TLR2 on synaptic plasticity after ischemic lesion in a longitudinal study of mice brain recovery. SNCöl1 SiNAPSA Neuroscience Conferenceöl1 Central European FENS Featured Regional Meeting, Ljubljana, Slovenia, September 22-25, 2011
- V. Bohal'ek I, **Gorup D**, Lalancette-Hebert M, Weng YC, Gajoviĭ S, Kriĥ J (2009) Immune response and the modulation of post-ischemic neurogenesis. Annual Meeting of Croatian Society for Microscopy, Zagreb, Croatia, December 11, 2010
- VI. **Gorup D**, Bohal'ek I, Lalancette-Hebert M, Weng YC, Gajoviĭ S, Kriĥ J (2010) Synaptic plasticity after ischemic lesion in a longitudinal study of mice brain recovery. COST B30 - Training School Cellular Neuropathology: in vitro models Kiev, Ukraine, 3 ñ 7 June 2010
- VII. Bohal'ek I, **Gorup D**, Lalancette-Hebert M, Weng YC, Gajoviĭ S, Kriĥ J (2010) The relation between postischemic neurogenesis and TLR2 ñ a mediator of innate immune response. COST-B30 Stem Cells and Neuroregeneration, Haarlem, the Netherlands, February 5-6, 2010
- VIII. Bohal'ek I, **Gorup D**, Lalancette-Hebert M, Weng YC, Gajoviĭ S, Kriĥ J (2009) Immune response and the modulation of post-ischemic neurogenesis. 3rd Croatian Congress of Neuroscience, Zadar, Croatia, September 24-26, 2009, 50
- IX. Gajoviĭ S, Mitrel'iĭ M, Bohal'ek I, Dobrivojeviĭ M, **Gorup D**, Kapuralin K, Mavriĭ S, and Kostoviĭ -Kneĥeviĭ LJ (2009) Signal transducing adaptor molecule (STAM2) is expressed in the mouse during embryo development and in the adult brain. Microscopy Conference in Graz , Austria, August 30 ñ September 4, 2009
- X. Gajoviĭ S, Mitrel'iĭ M, Bohal'ek I, Dobrivojeviĭ M, **Gorup D**, Kapuralin K, Mavriĭ S, and Kostoviĭ -Kneĥeviĭ LJ (2009) Signal transducing adaptor molecule (STAM2) is expressed in the mouse during embryo development and in the adult brain. EMBO Young Scientists Forum, Zagreb, Croatia, June 15-17, 2009