UTJECAJ HLAPLJIVIH ANESTETIKA NA SASTAV I DISTRIBUCIJU LIPIDNIH

Tot, Ozana Katarina

Doctoral thesis / Disertacija

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:584740

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Ozana Katarina Tot

UTJECAJ HLAPLJIVIH ANESTETIKA NA SASTAV I DISTRIBUCIJU LIPIDNIH SPLAVI STANIČNIH MEMBRANA

Doktorska disertacija

Osijek, 2013

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Ozana Katarina Tot

UTJECAJ HLAPLJIVIH ANESTETIKA NA SASTAV I DISTRIBUCIJU LIPIDNIH SPLAVI STANIČNIH MEMBRANA

Doktorska disertacija

Osijek, 2013

Mentor rada:

Prof. dr. sc. Marija Heffer

Voditelj Katedre za medicinsku biologiju na Medicinskom fakultetu u Osijeku

Rad ima 119 listova

PREDGOVOR RADU

Istraživanje provedeno pri izradi ovog doktorskog rada dio je znanstvenog istraživačkog projekta na Katedri za Medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku pod nazivom: „Uloga lipidnih splava i glukonjugata u razvoju i regeneraciji živčanog sustava“ (219-0061194-2158), voditelj prof. dr. sc. M. Heffer, koje financira Ministarstvo znanosti, obrazovanja i sporta.

ZAHVALA

Ovaj doktorski rad želja je skupine liječnika i istraživača da spoje klinički vidljivo s znanstvenim činjenicama. Također, ovo istraživanje je još jedan dokaz o potrebi suradnje znanstvenika i kliničara na putu dostizanja rješenja i objašnjenja onoga što nam je još nepoznato.

Zahvaljujem za kolegijalnost i pomoć svim kolegicama i kolegama iz Laboratorija za neurobiologiju: Barbari , Marti, Katarini, Stefanu i Ivanu.

Također zahvaljujem na stručnoj pomoći kolegama iz Splita koji su nas naučili raditi studije praćenja ponašanja životinja: profesoru Damiru Sapunaru i profesorici Liviji Puljak. Profesoru Ronaldu L. Shnaaru (Johns Hopkins University) zahvaljujem na korisnim savjetima i podršci.

Važno je napomenutu kako je kroz protekli niz godina svatko dao iskren doprinos svoga znanja i vremena pa je nemoguće izdvojiti pojedinca. Stoga svima koje nisam spomenula zahvaljujem na podršci, savjetima, razumijevanju i uloženom slobodnom vremenu.

Mojoj mentorici, hvala što je u trenucima kada mi se činilo da sam u bezizlaznoj situacija našla riječi podrške i put do brzog i uspješnog riješenja.

I na kraju najveći poticaj i podršku zahvaljujem svojoj mami i obitelji Jukić, koji su mi bili dobar primjer da ako postoji dobra volja i čvrsta odluka u životu nema teškog i nemogućeg.

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA III

1. UVOD 1
1. 2. Hlapljivi anestetici 2
1. 2. 1. Mogući mehanizmi djelovanja hlapljivih anestetika 3
1. 2. 2. Farmakokinetika hlapljivih anestetika 4
1. 3. Dosadašnje spoznaje o učinku sevoflurana 5
1. 4. Dosadašnje spoznaje o učinku Izoflurana 6
1. 5. Lipidne splavi 8
1. 6. Gangliozidi 9
1. 7. Miševi *B4galnt1* s isključenim genom za sintezu kompleksnih gangliozida 12
1. 7. 1. Miševi tretirani demijelinizacijskim spojevima 13
2. HIPOTEZA 14
3. CILJ ISTRAŽIVANJA 18
4. ISPITANICI, METODE I MATERIJALI 19
4. 1. Pokusne životinje 19
4. 1. 1. Uvijeti uzgoja životinja 19
4. 1. 2. Uvjeti prilikom izvođenja pokusa 19
4. 1. 3. Postupak anestezije 20
4. 1. 4. Ispitivanje refleksa 21
4. 1. 5. Protokol hranjenja C57BL/6 miševa kuprizonom 22
4. 2. Mjerenje orijentacije u prostoru 22
4. 2. 1. Mjerenje stiska prednjih nogu 22
4. 2. 2. Mjerenje refleksa ispružanja stražnjih nogu 23
4. 3. Mjerenje lokomotorne aktivnosti u otvorenom polju 23
4. 3. 1. Mjerenje održavanja na rotirajućoj osovini 24
4. 4. Protokol izvođenja testova kratkoročnog pamćenja 26
4. 4. 1. Modificirani Lashley III labirint 26
4. 4. 2. Mjerenje pasivnog izbjegavanja 27
4. 5. Priprema tkiva za imunohistokemijsku analizu i imunohistokemijska analiza 28
4. 6. Statistika 31
5. REZULTATI 32
5. 1. Rezultati Razlike u vremenu indukcije u anesteziju i buđenja iz anestezije 33

5. 2. Rezultati testiranja orijentacije u prostoru (test ispružanja prednjih nogu) 35
5. 3. Rezultati testova ispitivanja motorike prije i poslije anestezije 35
5. 3. 1. Rezultati mjerenja Refleksa ispružanja stražnjih nogu 35
5. 3. 2. Rezultati testa snage stiska prednjih nogu 37
5. 3. 3. Rezultati testa održavanje na rotirajućoj osovini 38
5. 3. 4. Rezultati mjerenja lokomotorne aktivnosti u otvorenom polju 40
5. 4. Rezultati kognitivnih testova 44
5. 4. 1. Rezultati testa modificiranog *Lashley III* labirinta 44
5. 4. 2. Rezultati testa pasivnog izbjegavanja 46
5. 5. Rezultati imunohistokemijske analize markerima mijelina i protutjelima na gangliozide 51

6. RASPRAVA 65
7. ZAKLJUČAK 78
8. SAŽETAK 80
9. SUMMARY 82
10. LITERATURA 84
11. ŽIVOTOPIS 98

PRILOZI 102

POPIS OZNAKA I KRATICA

Aβ	amiloid-β protein
AD	Alzheimerova bolest
AMPA	α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpropionska kiselina
APP	amilod prekursorski protein
ATP	adenozin-3-fosfat
B4galnt1	Miš s isključenim genom za sintezu kompleksnih gangliozida
GABA	*γ-amino maslačna kiselina*
$GABA_A$	GABA receptor tip A
Gal	D-galaktoza
GalNAc	D-N-acetilgalaktozamin
GD1a	Neu5Acα3Galβ3GalNAcβ4(Neu5Acα3)Galβ4GlcCer
GD1b	Galβ3GalNAcβ4(Neu5Acα8Neu5Acα3)Galβ4GlcCer
GlcNAc	D-N-acetil-glukozamin
GM3	Neu5Ac*α*3Galβ*4*βGlcCer
GM3-sintaza	enzim, laktozilceramid sialiltransferaza
GM1	Galβ3GalNAcβ4(Neu5Acα3)Galβ4GlcCer
GPI-sidro	gliko-fosfatidil-inozitolsko sidro
GT1b	Neu5Acα3Galβ3GalNAcβ4(Neu5Acα8NeuAcα3) Galβ4GlcCer
HA	Hlapljivi anestetici
5HT3	Neurotransmiter, 5-hidroksitriptamin
IP3 receptor	Receptor za inozitol 1,4,5-trifosfat
JCBN	eng. *Joint Commission on Biochemical Nomenclature*
LTP	dugoročna potencijacija (eng. *Long-term potentiation*)
MAC	minimalna alveolarna koncentracija
mACh receptor	muskarinski-acetilkolinski receptor
MAPK	mitogenima aktivirana protein kinaza
MitoKATP	mitohondrijski adenozin-3-fosfat, kalij ovisni kanal
MS	Multipla skleroza
MOG	Mijelin oligodendrocit glikoprotein
NANA	N-acetilneuraminska kiselina
NMDA	N-metil-D-aspartat
PDGF	receptor čimbenika rasta trombocita

PDZ domenama	Domena postsinaptičkog zgusnuća (engl. *postsynaptic density domain*)
POCD	postoperativna kognitivna disfunkcija
Rpm	eng. *rotate per minute* (okretaja u minuti)
SŽS	središnji živčani sustav
TGF-β1	transformirajući čimbenik rasta β1
TNF- α	tumor nekrotizirajući čimbenik α
WT	miš divljeg tipa

1. UVOD

1. 1. Hlapljivi anestetici

Specifični mehanizam djelovanja hlapljivih anestetika (HA) na molekularnoj razini nije još u cijelosti poznat. Dosadašnja istraživanja pokazala su da hlapljivi anestetici svoj učinak ostvaruju djelujući na više *meta* u središnjem živčanom sustavu (SŽS). Do sada su postavljene dvije skupine teorija: proteinska teorija i lipidna teorija (1).

Unitarnu teoriju povezanosti snage hlapljivih anestetika i njihovog svojstva topljivosti u lipidima postavili su prije stotinu godina Mayer i Overton, pokušavajući objasniti jedinstveni mehanizam djelovanja svih hlapljivih anestetika. Teorija pretpostavlja da je za postizanje dostatne anestezije hlapljivim anestetikom potrebno otopiti dovoljan broj molekula istog anestetika na mjestu njegovog djelovanja (2, 3).

Druga, teorija kritičnog volumena pretpostavlja da hlapljivi anestetici u lipidnom okruženju povećavaju volumen tog dijela neuronske membrane preko kritične točke (4, 5, 6).

Treća, tekućinska teorija pretpostavlja da anestetici povećavaju pokretljivost komponenti unutar membrane te tako onemogućavaju prijenos podražaja. Ova teorija je nadopunjena teorijom odvajanja lateralne faze što podrazumijeva postojanje različitih lipidnih slojeva stanične membrane u tekućoj i drugog u gel fazi. Prema ovoj teoriji, molekule hlapljivog anestetika blokiraju lipide u tekućoj fazi i onemogućuju dalji prijelaz u gel fazu. Posljedično navedenom izostaje promjena oblika proteina uz nemogućnost otvaranja dijela ionskih kanala (7, 8, 9).

Za razliku od gore navedenih lipidnih teorija prema proteinskoj teoriji hlapljivi anestetici djeluju na membranske proteine neuronske stanice tako što se izravno vežu na ionske kanale ili djelujući preko sustava drugih glasnika (10, 11).

Phil G. Morgan ukazao je na mogućnost da se učinak hlapljivih anestetika može tumačiti specifičnom genskom podlogom. Tako će različiti organizmi uslijed genskih razlika pokazati različitu osjetljivost na određeni hlapljivi anestetik.

U istraživanju učinjenom na nematodi *Caenorhabditis Elegans,* Phil G. Morgan pretpostavlja da su lipidne splavi mete djelovanja hlapljivih anestetika i mjesta u kojima se mogu ujediniti liposolubilnost hlapljivog anestetika i njegova specifična interakcija s nekim od membranskih proteina. Tako je u staničnoj membrani *C. Elegans* pronađen protein UNC-1 koji je odgovoran za mogući mehanizam djelovanja hlapljivog anestetika, specifičnu osjetljivost oblika na hlapljivi anestetik i njegovu pokretljivost (12, 13).

Smatra se da je UNC-1 protein nematoda homolog proteinu stomatinu. Stomatin je također integralni protein stanične membrane humanih neurona gdje je odgovoran za promjene

vodljivosti ionskih kanala za Na^+ i K^+ i za nastajanje i održavanje lipidnih splavi membrana (14).

Također spominje se i niz drugih gena koji kontroliraju osjetljivost *C. Elegans* na hlapljivi anestetik, tako što se udružuju u mikrodomenama stanične membrane: unc-7, unc-8, unc-9, unc-24 i unc-79 (15).

1. 2. 1. Mogući mehanizmi djelovanja hlapljivih anestetika

Hlapljivi anestetici mnogim, različitim mehanizmima potiču depresiju SŽS-a.

Oni mogu mijenjati inhibiciju kompleksa $GABA_A$ receptora spregnutog s kloridnim kanalima (17). Talamus kao važna struktura SŽS-a odgovoran je za prekapčanje mnogih osjetnih putova sve do kore velikog mozga. On također kontrolira stanje svijesti i spavanja tijekom opće anestezije, tako što u retikularnoj formaciji produžava vrijeme zatvaranja kloridnog kanala reguliranog ligandom GABA (γ-amino maslačna kiselina) i to putem $GABA_A$ receptora smanjuje osjetljivost za ione Ca^{2+} (16).

Učinci HA se vide i u depresiji receptora spregnutih s T-tipom Ca^{2+} kanala. Ovi receptori su odgovorni za kontrolu postsinaptičke membrane pojedinih moždanih stanica, tako što mijenjaju ili produžavaju vrijeme oporavka Ca^{2+} kanala nakon njihove inaktivacije (18).

Iako se smatralo da samo visoke koncentracije HA mogu inhibirati presinaptičke Na^+ kanale i smanjiti oslobađanje neurotransmitera u sinapsi, danas je poznato kako već kliničke koncentracije HA imaju ovakav učinak. Smatra se da je to jedan od mehanizama koji objašnjava kako HA dovode do stanja amnezije, sedacije i gubitka pokreta (19, 20).

Hlapljivi anestetici mijenjaju učinke muskarinskih acetilkolinskih (mACh) receptora djelujući na stanje memorije i svijesti. Isofluran inhibira m3-ACh receptora. Sevofluran ovisno o primijenjenoj dozi inhibira funkciju m1-ACh receptora (21).

HA se vežu na glutamatne i na glicinske receptore i posreduju u aktivnosti kalcijem reguliranih kalijevih kanala (22).

Neka istraživanja ukazuju na činjenicu da HA utječu na prijenos neuronskog signala formirajući čvrstu vezu s domenama postsinaptičkog zgusnuća, PDZ (engl. *postsynaptic density domain*) i proteinima koji u njima posreduju u silaznim signalnim procesima (23).

Još uvijek nije u potpunosti razjašnjena činjenica nastanka postoperativne kognitivne disfunkcije (POCD), je li ona rezultat djelovanja samo anestetika, samo operacije ili kombinacija oba (24).

Pručavajući mehanizme djelovanja HA došlo se do spoznaje da djeluju na aktivaciju kaspaza, povećavaju nastajanje β-amiloidnog proteina, povisuju proupalne citokine i čimbenik nekroze tumora, TNF-α (engl. *tumor necrosis factor*), te podržavaju apoptozu stanice. A upravo ti mehanizmi mogli bi dati odgovor na promjenu kognitivnih funkcija nakon izlaganja hlapljivim anesteticima (25).

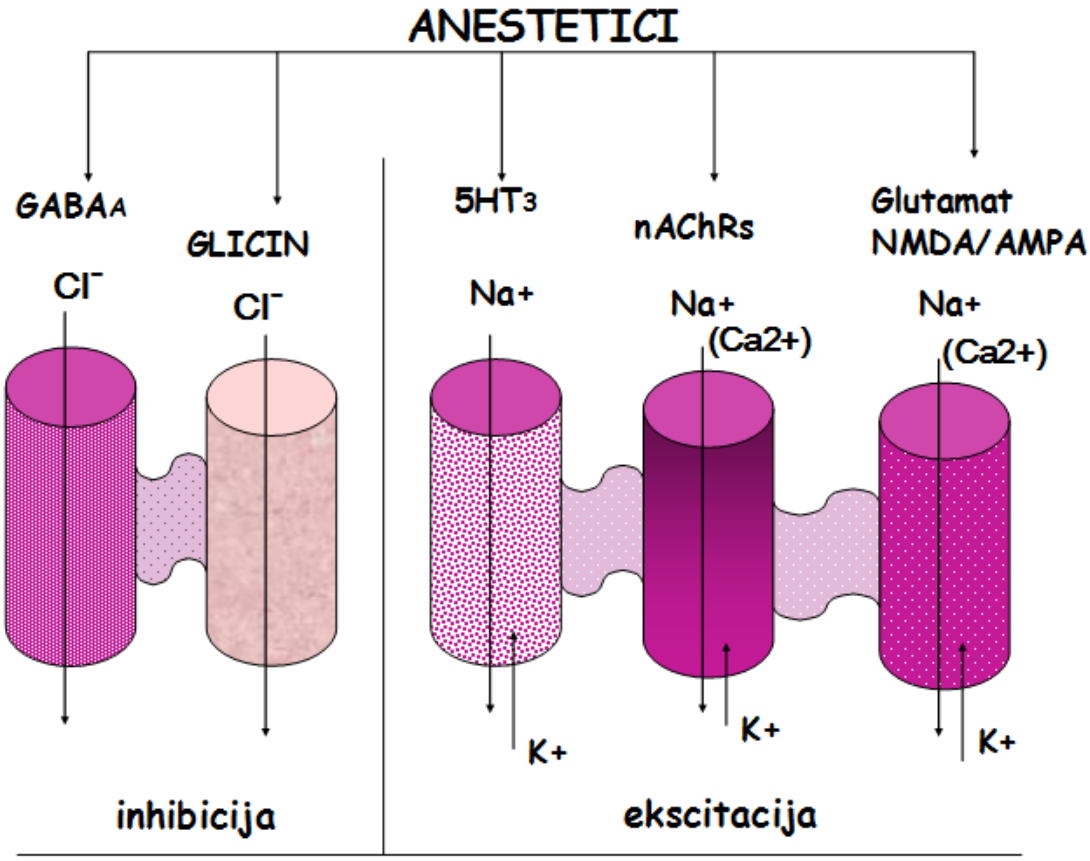
1. 2. 2. Farmakokinetika hlapljivih anestetika

Djelovanje hlapljivog anestetika započinje udisanjem u pluća, a zatim prolaskom kroz alveo-kapilarnu membranu ovisno o koeficijentu topljivosti krv/plin, brzini protoka krvi kroz pluća i gradijentu koncentracije anestetika.

S obzirom da su hlapljivi anestetici u neioniziranom obliku, njihove molekule lako prelaze iz krvi u tkiva procesom difuzije. Distribucija se odvija u tri odjeljka. Brza faza distribucije odvija se u središnjem odjeljku prema organima bogatim cirkulacijom kao što je SŽS. Spora faza distribucije odvija se u dva periferna odjeljka prema slabije prokrvljenim organima.

Brza izmjena koncentracije hlapljivog anestetika u pojedinim odjeljcima osigurava stalni prelazak anestetika iz visoko prokrvljenih tkiva u krvnu struju. Mehanizam redistribucije ovisan je o gradijentu koncentracije anestetika, koeficijentu tkivo/krv i arterijsko-venskoj razlici. Eliminacija HA primarno se odvija u plućima. Brzina indukcije i buđenja direktno je ovisna o frekvenciji disanja, brzini protoka i volumenu svježe smjese plinova u dišnom krugu. Za male laboratorijske životinje, kao što su miševi, radi brze frekvencije disanja, 94 do 163 udaha/min, uvod u anesteziju i eliminacija hlapljivog anestetika su brzi.

Za procjenu učinka HA koristi se minimalna alveolarna koncentracija (MAC) kao indeks procjene stanja anestezije, odnosno, kao kvantitativna mjera anestetičkih mogućnosti. Ako je pretpostavka da je parcijalni tlak HA u alveolama na kraju izdaha jednak parcijalnom tlaku HA u mozgu, onda MAC predstavlja anestezijsku aktivnost na mjestu djelovanja HA (26, 27).



Slika 1.1 Slika prikazuje učinak inhibicije ili ekscitacije hlapljivih anestetika na aktivnost neurotransmitera vezanih za ionske kanale.

1. 3. Dosadašnje spoznaje o učinku sevoflurana

Sevofluran je fluorirani metilni-isopropil-eter ($(CH_2F\text{-}O\text{-}CH(CF)_3)_2$). Njegov stupanj biotransformacije je 2-3 %. Za indukciju u anesteziju potrebna je snaga MAC-a od 1,8-2,0 Vol %. Metabolizira se u tri-fluoroacetat i heksa-fluoroisopropanol. Apsorberi CO_2 stupaju u interakciju s sevofluranom i stvarajući dva spoja A i B, koji mogu utjecati na bubrežnu funkciju. Nefrotoksičnost je uočena kod štakora u uvjetima malih protoka (manjih od 2 L/min) i visokih koncentracija (većih od 4 Vol %) (28, 29).

Njegov nizak koeficijent topljivosti krv/plin (0,65) osigurava brzi uvod u anesteziju i buđenje. Na stanje memorije i svijesti djeluje potiskujući funkciju m-ACh receptora (30).

Neovisno o ulasku iona Ca^{2+} u stanični citosol sevofluran dovodi do spore depolarizacije mitohodrijske membrane u presinaptičkim strukturama neurona. Za to je odgovorno otvaranje mitohondrijskih ionskih kanala za kalij koji su regulirani adenozin-3-fosfatom ($MitoK_{ATP}$) (31).

Istraživanje na mladim miševima pokazalo je da izlaganje miševa sevofluranu rezultira pojavom agresivnog ponašanja i nedostatkom sposobnosti učenja. Vjeruje se da je molekularni mehanizam neuronske stanice za nastanak POCD, dugoročna potencijacija posredovana GABA receptorima tip A ($GABA_A$) i glicinskim receptorima, te depresija nikotinskih-acetilkolinskih (nAChRs) i (NMDA) receptora (32, 33).

Ove promjene u kognitivnim funkcijama povezane su i s dugotrajnim izlaganjem hlapljivom anestetiku. U tom slučaju kognitivna slabost nastaje jer HA potiče proizvodnju amiloid-β proteina (Aβ), koji je derivat amilod prekursorskog proteina (APP). Aβ i APP su patološki suspstrat u Alzheimerovoj bolesti (AD) u čijoj kliničkoj slici dominira kognitivno propadanje (34).

Osim gore navedenog, dodatni razlog za promjenu ponašanja bi mogao biti i to što sevofluran potiče neuroinflamatorni učinak u tkivu mozga. Ovo je primjećeno u istraživanjima na neonatalnim transgeničnim miševima koji su model za AD (33, 35).

Sevofluran utječe i na GABA-om posredovani sinaptički prijenos. Pretpostavlja se da izloženost sevofluranu utječe na GABA-ergičke neurone i povećava inhibiciju živčanog prijenosa (36).

Također anestezija sevofluranom koncentracije veće od 3 Vol% udružena s hipoksijom i acidozom dovodi do većeg stupnja neurotoksičnosti u mozgu tkiva AD transgeničnih miševa u odnosu na divlje miševe (37).

Rijetko se kod produženog izlaganja sevofluranu u koncentracijama 7 Vol% i većim bilježe promjene u EEG-u kao epileptiformna aktivnost, ali ne rijetko se mogu javiti konvulzije, delirantno ponašanje i uznemirenost (38, 39).

1. 4. Dosadašnje spoznaje o učinku izoflurana

Isofluran je halogeni metil-etil-eter, nezapaljiv na sobnoj temperaturi, iritabilnog mirisa i dugotrajnim stajanjem ne podliježe razgradnji. U odnosu na sevofluran njegova biotransformacija je svega 0,2 %. Koeficijent topljivosti krv/plin je 1,4 što produžava vrijeme uvođenja u anesteziju i buđenje u usporedbi s sevofluranom. Za uvod u anesteziju MAC mu iznosi 1,2 Vol % (40).

Izlaganjem humanih stanica proksimalnih bubrežnih tubula izofluranu uočio se protuupalni i antinekrotični učinak isoflurana u bubrežnom tkivu. Naime, isofluran povećava razinu

transformirajućeg čimbenika, TGF-β1 (engl. *transforming growth factor-β1*). Također isofluran povećava broj kaveola u staničnoj membrani navedenih stanica (41).

Istraživanja provedena u zadnjem desetljeću dovela su do razumijevanja učinka izoflurana u procesu ishemijskog prekondicioniranja. Ovaj hlapljivi anestetik u moždanim stanicama osigurava toleranciju na učinke nastale nakon teške ishemijske ozljede. Smatra se da je mehanizam kojim izofluran podržava otpornost mozga na nastalu ishemiju porast koncentracije unutarstaničnog Ca^{2+}, aktivacija NMDA receptora i mitogenima aktivirane protein kinaze, MAP (*mitogen activated protein kinase*) (42).

Ovaj neuroprotektivni učinak izoflurana u mozgu C57BL miševa u kojih se izazvala fokalna ishemija mozga se vidi kao smanjenje smrti neurona (43).

S druge strane izofluran može inducirati apoptozu u primarnim kortikalnim neuronima miša, što je posljedica poremećaja u stvaranju endogenog Ca^{2+}. U konačnici vidi se poticanje neurotoksičnog učinka od strane izoflurana, koje je intenzivnije nego li kod sevoflurana. Naime sevofluran dovodi do manjeg oslobađanja Ca^{2+} (44, 45).

Smatra se kako primjenom isoflurana nastupa blokada dugoročne potencijacije LTP (engl. *long-term potentiation*) u hipokampusu, a time i modulacija na razini NMDA receptora što mijenja temelje staničnog mehanizma za učenje i pamćenje (46).

Izlaganjem isofluranu mladih miševa starosti do 2 tjedna i odraslih miševa starosti preko 12 mjeseci zapaženo je slabije stjecanje nove memorije i zaboravljanje već naučenih zadataka prostorne memorije (47).

Kao i kod primjene sevoflurana dugotrajno izlaganje izofluranu narušava kognitivne funkcije, što se povezuje s pojačanim stvaranjem Aβ proteina (48). Na postsinaptičkoj membrani neurona izofluran djelomično mijenja ili produžava vrijeme oporavka Ca^{2+} kanala nakon njihove inaktivacije (49). Gubitak svijesti tijekom izlaganja izofluranu nastupa vjerojatno zbog blokade Na^{+} kanala, smanjenja podražljivosti talamičkih neurona i blokiranja talamičko-kortikalne komunikacije (50). Izofluran kroz inhibiciju signala m3-ACh receptora djeluje na stanje memorije i svijesti (30).

Do sada su postavljene brojne hipoteze o mehanizmu djelovanja HA koji uključuju $GABA_A$, NMDA, mACh i nAChRs receptore. Međutim nove spoznaje o strukturi stanične membrane potaknule su mogućnost uključivanja novih mehanizama prolaza HA kroz staničnu membranu. Stoga je u novije vrijeme postavljena hipoteza o djelovanju HA na lipidne signalne domene.

1. 5. Lipidne splavi

Prije 40 godina Nicolson i Singer su postavili model stanične membrane kao tekućeg mozaika. Oni su pretpostavili da je membrana ocean lipida u kojem plutaju membranski proteini kao sante leda (51, 52).

Međutim već dva desetljeća poznato je da unutar dvostruke ovojnice postoji dobro organizirana struktura lipida i proteina. Lokalizirane lipidne građevine visokog sadržaja kolesterola i glikosfingolipida jesu mikrodomene stanične membrane ili lipidne splavi *(engl. lipid rafts)*. Lipidne splavi uklopljene su u fluid membrane poput platformi tako da svoj sfingolipidni dio okreću egzoplazmi, a fosfolipidi dio unutarnjem listu citoplazme. Kolesterol ima ulogu dinamičkog ljepila (53).

Lipidne domene fosfolipida koji učestvuju u izgradnji splavi sadrže zasićene masne kiseline. Udio zasićenih masnih kiselina je ovdje znatan u usporedbi s dijelom membrane koji je izvan splavi. Upravo ovaj sadržaj zasićenih masnih kiselina neposredno omogućuje stabilnu strukturu lipidne splavi, koja se ponaša kao platforma za okupljanje membranskih proteina. Proteini s citoplazmatske strane lipidnih splavi često imaju palmitoilna ili miristilna sidra, dok se s izvanstanične strane nalaze proteini sa gliko-fosfatidil-inozitolskim sidrima *(GPI-sidro)*. Kako bi se ostvarila signalizacija unutar membrane mnogi proteini se doseljavaju u lipidne splavi kao što su: obitelj SRC kinaza, G-protein receptora čimbenika rasta, mitogenima aktivirana protein kinaza (MAPK), protein kinaza C, receptor čimbenika rasta trombocita (PDGF), endotelin i drugi proteini.

Tako su GPI-sidro i SRC kinaze strukture odgovorne za smještaj lipidne splavi unutar specifičnog dijela stanične membrane (54).

Niz dosadašnjih istraživanja dokazuje da se lipidne splavi ne mogu promatrati kao monolitne strukture već kao heterogena kolekcija domena koje se razlikuju u sastavu proteina i lipida, ali i po vremenskoj stabilnost.

Na simpoziju u Keyston-u, 2006 godine, *Keystone Symposium of Lipid Rafts and Cell Function*, konsenzusom je usvojena definicija o lipidnim splavima:

Lipidne splavi su male (10-200 nm) heterogene, vrlo dinamične, sterolima i sfingolipidima bogate domene koje kategoriziraju stanične procese. Manje splavi mogu se stabilizirati u oblik veće platforme kroz interakcije protein-protein ili protein-lipid (55).

Najčešće lipidne splave nalaze se u rasponu veličina od 200 nm do 300 nm, a čine 30-50 % površine stanične membrane (56, 57).

Udio razine kolesterola u splavi je dvostruko veći, a razina sfingomijelina za 50 % veća, nego li u neuređenim djelovima stanične membrane (58).

Promatrajući veličinu lipidnih splava mogu se uočiti manje ulegnuća (invaginacije) stanične membrane promjera od 100 nm, nazvane kaveole. One također imaju visok sadržaj kolesterola i glikosfingolipida, ali i obaveznu komponentu proteina kaveolin-1 vezanu za kolesterol. Smatra se da je kaveolin-1 odgovoran za stabilnu strukturu kaveola tijekom invaginacije. S obzirom na veličinu kaveola one teže međusobnom udruživanju (69, 60, 61).

Distribucija lipidnih splavi na površini stanice ovisna je o vrsti stanice. U polariziranim epitelnim stanicama i neuronima lipidne splavi se akumuliraju u apikalnim aksonskim staničnim membranama. Kaveole su gusto raspoređene duž bazo-lateralne domene epitelnih stanica u neposrednoj blizini krvnih žila i potreba za signalnim prijenosom putem splavi.

Mnogi modeli koji oslikavaju prijenos signala u lipidnim splavima uključuju mogućnost da u signalizaciji učestvuju receptori. Tako se spominju tri moguća načina participiranja receptora. Prva je mogućnost stalno mjesto receptora na splavi i aktiviranje vezanjem s ligandom. Druga mogućnost je da su pojedini receptori manjeg afiniteta za lipidne splavi, ali preko veze s posrednikom produžuju svoje vrijeme boravka u splavi. Treća mogućnost je da aktivirani receptori mogu potaknuti križno vezanje proteina u splavi, koji se zatim vežu za proteine u drugoj splavi. Rezultat toga je međusobno stapanje lipidnih splavi. Niti jedna od ovih mogućnosti ne isključuje drugu. Udruživanjem lipidnih splavi stvara se prostorna i vremenska mreža signalnih interakcija (62).

Lipidne splavi učestvuju u mnogim staničnim procesima: prometu i izgradnji membrane stanice, staničnoj polarizaciji, prijenosu signala T i B-stanica, signalizaciji ceramid/sfingomijelin koja regulira rast, preživljavanje i smrt stanice, upalne procese potaknute mikroorganizmima koji otimaju splavi u svoje svrhe. Stoga ne čudi da su lipidne splavi uključene u mehanizme nastanka brojnih patoloških stanja u organizmu: Alzheimer-ovu i Parkinsonovu bolest, anafilaksu, astmu, hipertenziju, neoplazme, šećernu bolest, hiperparatireoidizam, gastrointestinalne ulkuse, sepsu/septički šok, bakterijske i virusne infekcije i mnoge druge bolesti i stanja (7, 63, 62).

1. 6. Gangliozidi

Naziv „gangliozidi“ upotrebio je 1942 god. njemački biokemičar Klenk koji je ovako nazvao skupinu kiselih glikosfingolipida izoliranih iz ganglijskih stanica mozga bolesnika oboljelih

od GM1 gangliozidoze poznate pod imenom amaurotični idiotizam. Dvadeset godina kasnije Kuhn i Wiegandt prvi put su opisali i prikazali kemijsku strukturu gangliozida (63).

Godine 1962, Svennerholm je predložio nomenklaturu najčešćih gangliozida ekstrahiranih iz mozga (64).

Trenutačno su u uporabi dvije nomenklature gangliozida. Veći broj istraživača se odlučuje za kraću nomenklaturu po Svennerholmu koja se temelji na redoslijedu migracije ganglio serija gangliozida metodom kromatografije (65).

Sveobuhvatniji, ali manje primjenjivan je IUPAC sustav nomenklature (58, 66, 67).

Prema Svennerholmu jezgru strukture čine neutralni šećeri koji daju ime seriji gangliozida. Kratice šećera koji čine osnovni šećerni lanac su kako slijedi: D-galaktoze (Gal), D-N-acetil-glukozamin (GlcNAc) ili D-N-acetilgalaktosamin (GalNAc). Imena kratica daju podatke o seriji gangliozida G=ganglio ili L=lakto odnosno broju molekula šećera i broju sijalinskih kiselina (A=0, M=1, D=2, T=3, P=4, P=5, H=6, S=7). Sijalinska kiselina (eng. *sialic acid*) ili N-acetilneuraminska kiselina, NANA (eng. *N-acetylneuraminic acid*, NANA) može biti višestruko uključena na osnovnu strukturu gangliozida. Najčešće je sijalinski ostatak vezan za unutarnju ili vanjsku galaktozu osnovnog lanca i to vezom α 2,3 ili vezom α 2,8 ako se jedan sijalinski ostatak veže na drugi.

Biosinteza gangliozida započinje galaktozilceramidom, a iznimka je GM4 koji se sintetizira iz glikozilceramida. Prvo se sintetizira jednostavni gangliozid GM3 enzimom laktozilceramid sijaliltransferazom (GM3-sintaze). Potom se stvaraju GD3 i GT3. Nastali gangliozidi su prekursori za nastanak složenijih struktura a, b i c serije gangliozida (68).

Glikosfingolipidi imaju amfipatski karakter. U staničnu membranu umetnuti su u vanjski sloj tako da je oligosaharidni lanac izložen prema izvanstaničnom mediju. Osobito ih ima u izobilju u staničnim membranama neurona gdje predstavljaju 6% svih lipida.

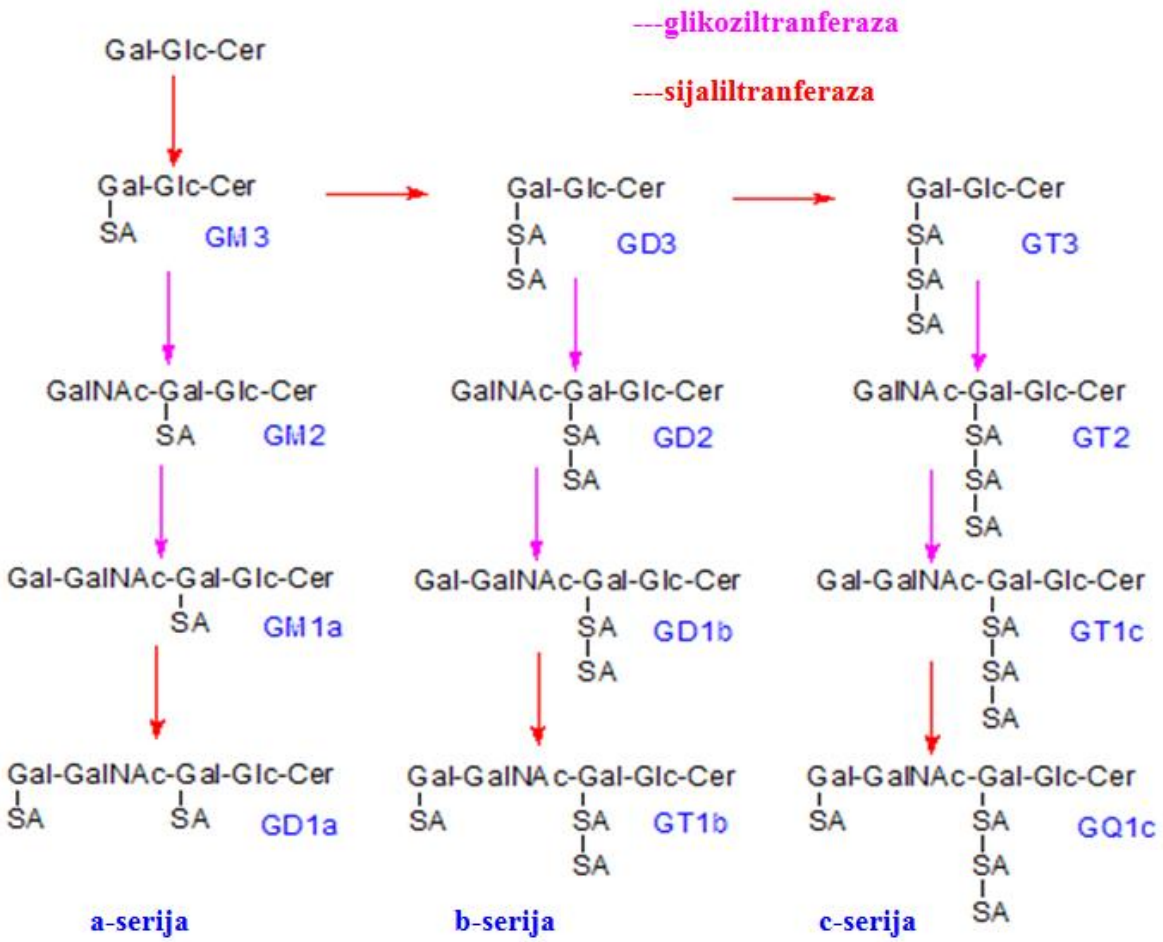
Poznato je da gangliozidi kao ravnopravni sudionici s glikoproteinima, glikozaminoglikanima i glikosfingolipidima učestvuju u izgradnji glikokaliksa na površini stanice. Velika heterogenost strukture gangliozida osigurava im mjesto posrednika u međudjelovanjima proteina i lanaca oligosaharida ili čak u međusobnim interakcija s drugim glikosfingolipidima iste ili nasuprotne membrane. Danas postoji opća suglasnost da se gangliozidi ponašaju kao „socijalne“ molekule koje su uključene u modulaciju enzimskih svojstava i staničnu signalizaciju, adheziju stanica i sortiranje proteina. Oni sudjeluju preko sijaloglikanskih elemenata stanične površine u prepoznavanju specifičnih molekula i reguliranju aktivnosti membranskih proteina. Tako gangliozidi GM3 *(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-β 4Glc 1Cer)* imaju strukturnu i funkcijsku ulogu u mikrodomenama membrane (69, 70).

U stanicama ljudskog mozga su pet puta više zastupljeni u sivoj nego li u bijeloj tvari.

Ekspresija gangliozida doživljava velike promjene tijekom neurogeneze, sinaptogeneze i stanične proliferacije (71).

Promatrajući mozak eksperimentalnog miša, uočava se da je ukupna količina gangliozida 8 puta veća u odraslih životinja nego u embrija, s pomakom u sastavu od jednostavnih ka složenijim gangliozidima (72).

Osim u neuralnim tkivima gangliozidi su u značajnim koncentracijama prisutni u ekstraneuralnim tkivima pa tako GD1 nalazimo u eritrocitima, jetri, slezeni i testisima, GM4 u bubrezima, GM2 u koštanoj srži, GM3 u crijevima i SSEA-4 specifična serija gangliozida u embrionalnim matičnim stanicama (73).



Slika 1.2 Slika prikazuje biosintezu gangliozida a, b i c serije, modificirano prema radu Thomas-a Kolter-a *Ganglioside Biochemistry*, 2012. god. Crvenim strijelicama označen je put djelovanja enzima sijaliltransferaze, a ružičastim strijelicama put djelovanja enzima glikoziltransferaze (68).

Gangliozidi se također javljaju u mitohondrijima, gdje GD3 regulira apoptozu stanice (74). U staničnoj jezgri uključeni su u ravnotežu iona kalcija (75). Kompleksi gangliozida u tkivima nisu stabilni već se mijenjaju s diobom i rastom stanica. Životna dob također mijenja udio gangliozida. Starenjem nastupaju promjene u sastavu mozga tako da se količina lipida smanjuje s 1070 g po gramu mokre težine tkiva mozga u zdravog 25-godišnjaka na 380 g u 85-godišnjaka. Unatoč tome, koncentracija GQ1b, GT1b, i GD1b gangliozida raste s životnom dobi na uštrb GM1 i GD1a. U ljudskoj prehrani, sijalinska kiselina bitna je u razvojnoj fazi mozga dijece. (76)

Razgradnja gangliozida počinje sekvencijalnim cijepanjem jedinica monosaharida na staničnoj površini, a zatim se nastavlja u lizosomima. Nedostaci i pogreške nastale u putu razgradnje objašnjavaju patološka stanja odnosno ganglioidoze (Landing-ova bolest), sfingolipidoze (Niemann-Pick-ova bolest), mukopolisaharidozu (Hurler-ova bolest), kao i niz lizozomskih bolesti nedostatka pojedinih enzima, npr. izoenzima heksozaminidaze (Tay-Sachs-ova bolest). Također neuropatija, Guillain-Barre, sindrom je koji nastaje zbog prisutnih serumskih protutijela na gangliozidima (77, 78).

Učinak HA na lipidne splavi istražen je *in vivo* na modelu miša s isključenim enzimom (GM2/GD2 sintaze), što dovodi do defekta u sintezi gangliozida, a kao posljedica navedenih i do degenerativnih promjena u SŽS.

1. 7. Miševi *B4galnt1* s isključenim genom za sintezu kompleksnih gangliozida

To su miševi sa nedostatkom enzima CMP-euAc: GM3 2,8-sialiltransferaze (GM2/GD2 sintaze) proizvedeni disrupcijom *B4galnt1* gena delecijom i zamjenom egzona 6, egzona 7 i djela egzona 8 sa MC1NeoPolyA kazetom (80) od Richard L. Proia, *Genetics of Development and Disease Branch, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, USA*, koje smo dobili ljubaznošću *The Scripps Reasrch Institute, La Jolla, California 92037, USA* kao dio Konzorcija za funkcionalnu glikomiku. Miš sa isključenim genom *B4Galnt1* napravljen je na genetičkoj osnovi miša C57black/6 (C57BL/6). Kod ovih miševa se razvijaju degenerativne promjene u središnjem živčanom sustavu (SŽS) kao posljedica defekta u sintezi gangliozida (80). Mozak ovih životinja starosti 1 mjeseca je u usporedbi s mozgom divljeg tipa miša nešto manji, ali morfološi intaktan. Histološki se u ovoj dobi zapažaju promjene u smislu upadljive vakuolizacije spinalne i cerebelarne bijele tvari i područja jezgara moždanog debla. Kod

B4galnt1 miševa starosti 2-3 mjeseca zapažaju se neurodegenerativne promjene, intenzivnija vakuolizacija bijele tvari i progresivno smanjenje mozga. Imunohistokemijskom analizom uočava se povećana gustoća astrocita oko strukture *corpus calosum* i bijele tvari *cerebellum*. Analizom elektronskom mikroskopijom uočavaju se degenerativne promjene mijelinskog sloja aksona i pojavu apoptoza stanica cerebralnog korteksa (79). Nakon osmog mjeseca starosti ovi miševi razvijaju značajnu i progresivnu neuropatiju, deficite u refleksnim pokretima, snazi, koordinaciji i ravnoteži. U odnosu na kontrolne grupe pokazuju progresivni poremećaj hoda i smanjenu sposobnost propinjanja. Kreću se malim i otežanim pokretima. *B4galnt1* starosti 12 mjeseci pokazuju značajnu pojavu tremora i katalepsije (82).

1. 7. 1. Miševi tretirani demijelinizacijskim spojevima

Ako se miševi divljeg tipa hrane hranom u prahu u koju je umiješan kelator bakra kuprizon (N, N´-bis (cikloheksil-deamino) etanediamid) u koncentraciji 0,2 % to uzrokuje tkivnu deficijenciju bakra i demijelinizaciju (83). Bakar je esencijalni element u tragovima koji omogućuje funkcioniranje brojnih metaloenzima (84) kao što su bakar-cink superoksid dizmutaza (CuZnSOD1) i ceruloplazmin (85). Oligodendrociti su posebno osjetljivi na male doze kuprizona dok druge stanice ostaju pošteđene. Demijelinizaciju prati pojava mikroglije i astroglioza. Hranjenje 0,1%-tnim kuprizonom kroz 6 tjedana ne dovodi do potpune demijelinizacije, dok primjena 0,2%-tnog i više kuprizona dovodi do gotovo potpune demijelinizacije nakon 6 tjedana (86, 87). Kuprizon uzrokuje primjetnu demijelinizaciju oko trećeg tjedna primjene, a gotovo 100%-tnu demijeinizaciju doseže oko 5 tjedna od početka primjene (87).

2. HIPOTEZA

Hipoteze istraživanja

U istraživanju smo pretpostavili:

- Hlapljivi anestetici isofluran i sevofluran imaju učinke na motoričke i kognitivne testove kod miševa.
- Hlapljivi anestetici isofluran i sevofluran imaju drugačije učinke na motoričke i kognitivne testove jer imaju drugačije mehanizme djelovanja.
- Izlaganje životinja hlapljivom anestetiku sevoflurnu ili isofluranu izaziva razliku u rezultatima motoričkih i kognitivnih testova miševa sa isključenim genom *B4Galnt1* u odnosu na WT miševe.
- C57BL/6 miševi tretirani kuprizonom (kelator bakra koji izaziva hipomijelinizaciju) postižu drugačije rezultate na kognitivnim i motoričkim testovima od WT miševa.
- Nakon izlaganja hlapljivom anestetiku javlja se značajna razlika u rezultatima motoričkih i kognitivnih testova između C57BL/6 miševa tretiranih kuprizonom u odnosu na WT miševe.
- Nakon izlaganja hlapljivom anestetiku javlja se značajna razlika u rezultatima motoričkih i kognitivnih testova između C57BL/6 miševa tretiranih kuprizonom u odnosu na miševe sa isključenim genom *B4Galnt1*.
- Razlike u rezultatima kognitivnih testova i testova motorike prije anestezije i u postanestezijskom vremenu posljedica su promijenjenog sastava lipidnih domena, a ne hipomijelinizacije.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja

Cilj je poduprijeti pretpostavku da defekt u sintezi beta-1,4-N-acetil-galaktosaminil transferaze 1 nije samo uzrok motoričkih i kognitivnih razlika zbog demijelinizacije već da *B4galnt1* miševi zbog nedostatka sinteze kompleksnih gangliozida imaju specifične fenotipske promjene koje se ne mogu objasniti samo demijelinizacijskim promjenama već uključuju kompleksne promjene sudjelovanja gangliozida u motoričkim i kognitivnim funkcijama, a ove razlike pojačava djelovanje anestetika.

Cilj istraživanja je izložiti motoričkim i kognitivnim testovima prije i poslije anestezije isofluranom i sevofluranom tri modela miša:

- WT tip miša
- miš sa isključenim genom *B4galnt1*
- model C57BL/6 miša tretiranog kelatorom bakra, kuprizonom

Životinjama će se u motoričkim i kognitivnim testovima mjeriti vrijeme latencije potrebno da izvrše zadanu radnju, kao i vrijeme uvoda u anesteziju i vrijeme buđenja poslije anestezije.

4. ISPITANICI, METODE I MATERIJALI

4. 1. Pokusne životinje

U ispitivanje je bilo uključeno šest skupina miševa:

- 13 miševa divljeg tipa (WT), starosti 6 mjeseci, prva kontrolna skupina;
- 23 miša WT, starosti 3 mjeseca, druga kontrolna skupina;
- 4 miša WT, starosti 12 mjeseci, treća kontrolna skupina;
- 13 miševa *B4galnt1*, starosti 12 mjeseci;
- 1 miš *B4galnt1*, starosti 3 mjeseca;
- 16 miševa C57BL/6, starosti 3 mjeseca, koji su kroz 19 dana hranjeni hranom u prahu u koju je umiješan kelator bakra, kuprizon [*N, N′-bis (cikloheksil-denamino) etanediamid*] u koncentraciji od 0,2 % (87, 88, 89).

4. 1. 1. Uvjeti uzgoja miševa

Životinje su prije testiranja boravile u nastambi za životinje Medicinskog fakulteta Osijek. Kavezi s miševima bili su smješteni su u prostoriju u kojoj se održava kontinuirani period *svjetlo-tama*, 14 sati svjetla i 10 sati tame. Prostor je bio klimatiziran na temperaturu od 24,9°C, uz dozvoljenu frekvenciju tonova jačine ljudskog govora. Životinje su bile pod nadzorom veterinara Medicinskog fakulteta Osijek. Kavezi su označeni identifikacijskim karticama. Radi prepoznavanja životinje su označene urezom/rupicom na lijevom i/ili desnom uhu metodom Univerzalnog sustava označavanja miševa (89). *prilog br.1.*
Miševi su do laboratorija gdje će biti testirani prenšeni u samoventilirajućim prijenosnim kavezima sa steljom. U istim kavezima boravili su tijekom pokusa. Broj miševa u pojedinom kavezu je bio od 2 do najviše 5 životinja.

4. 1. 2. Uvjeti prilikom izvođenja pokusa

Prije početka pokusa životinje su boravile jedan sat u laboratoriju gdje će biti testirati kako bi se prilagodile novo nastalim uvjetima sredine u kojoj do tada nisu boravile. Pokusi su se provodili popodne od 17.00 do 22.00 sati. Prostorija za pokuse je bila zamračena, osvijetljena neonskim svjetlom, klimatizirana na temperaturu od 23,9-24 ˚C. Tijekom pokusa u laboratoriju su boravili samo ispitivač i životinje.

4. 1. 3. Postupak anestezije

Za postupak inhalacijske anestezije korišten je sustav linearno povezanih komponenti kako slijedi:

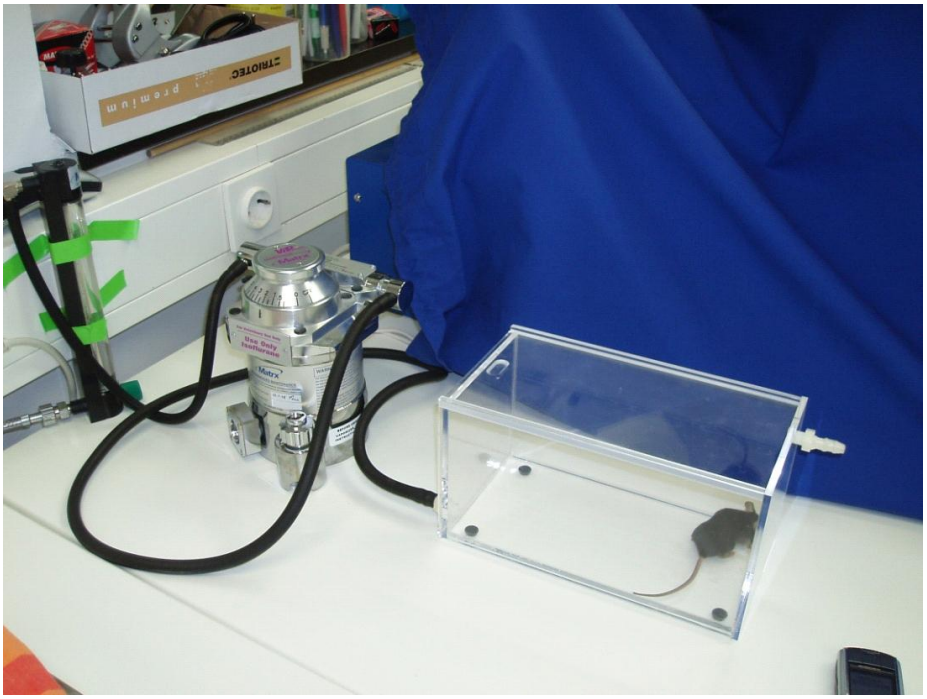
- rezervoar kisika, cilindar u kojem je kisik stlačeni plin pod tlakom od 150 atmosfera.
- redukcijski ventil koji reducira tlak kisika iz cilindra na radni tlak od 1 atmosfere.
- jednosmjerni ventil koji onemogućava povrat plinova prema cilindru.
- mjerač protoka, (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) s regulacijom protoka kisika do najviše 1000 mL.
- isparivač MATRX VIP 3000 Vaporiser (proizvođača Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA)-zatvorena posuda kroz koju prolazi kisik, kao noseći plin koji se saturira parama hlapljivog anestetika izoflurana ili sevoflurana osiguravajući zadanu koncentraciju anestetika u smjesi izlaznog plina iz isparivača;
- indukcijska komora (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) je bila posuda od prozirnog pleksiglasa u kojoj se anesteziraju miševi, dimenzija 25x13x13 cm, volumena 3120 ml. Komora ima klizno pomičnu gornju stjenku, ventil za dopremu plinova povezan s isparivačem i ventil za sakupljanje plinova povezan s Fluovac-Scavenger sistemom;
- Fluovac Scavenger system (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) kao apsorber otpadnih plinova.

Na mjeraču protoka kisika bio je odabran protok kisika od 400 mL. Na isparivaču su podešene koncentracije anestetika za indukcijsku fazu anestezije od 2 Vol% izoflurana ili 3.4 Vol% sevoflurana, a dalje je održavanje bilo na 1 Vol% izoflurana ili 1.7 Vol% sevoflurana. U radu je za potrebe izofluranske anestezije korišten izofluranski isparivač, a za potrebe sevofluranske anestezije izofluranski isparivač je ispran visokim protokom 100% kisika (90).

Mjera zadovoljavajuće dubine anestezije bilo je gašenje refleksa uha i kada su refleks uha i pedalni refleks bili ugašeni smatrali smo da je postignuta dovoljna dubina anestezije. Tijekom anestezije životinje su imale očuvano spontano disanje. Životinja su održavane u anesteziji u indukcijskoj komori u vremenu do 5 minuta. Nakon 5-te minute isparivač je postavljen u nulti položaj, a životinje su narednih 3 do 4 minute izlagane sobnom zraku do konačnog buđenja. Vrijeme uvoda u anesteziju i vrijeme buđenja i oporavka iz anestezije je individualno za pojedinu životinju te se bilježi za svaku životinju. U trenutku potpune budnosti životinje su imale prisutni pedalni refleks, refleks trzaja uha i osjet boli pri pritisku vrha repa, trčale su po kavezu u potrazi za hranom, a njuhom su istraživale prostor u kojem su

se nalazile. Budna životinja smatrala se spremnom za izvođenje kognitivnih i motoričkih testova (91).

Miševi su testirani prema protokolu odabranih testova prije i nakon anestezije sevofluranom ili izofluranom. Sevofluranska anestezija je izvođena u vremenskom pomaku od najmanje 24 sata u odnosu na izofluransku anesteziju kako bi bili sigurni da se učinak prvog anestetika u potpunosti izgubio.



Slika 4.1. Isparivač povezan sa indukcijskom komorom (desno) i mjerač protoka (lijevo)

4. 1. 4. Ispitivanje refleksa

Refleks dodira uha provjeravan je nježnim dodirom sa unutarnje strane uške i promatranjem nastalog trzaja uha. Za provjeru pedalnog refleksa (eng. *pedal withdrawl reflex*) pritisnut je jastučić na prednjoj ili stražnjoj šapi i promatralo se povlači li anestezirana životinja šapu odnosno savija li nogu (92).

4. 1. 5. Protokol hranjenja C57BL/6 miševa kuprizonom

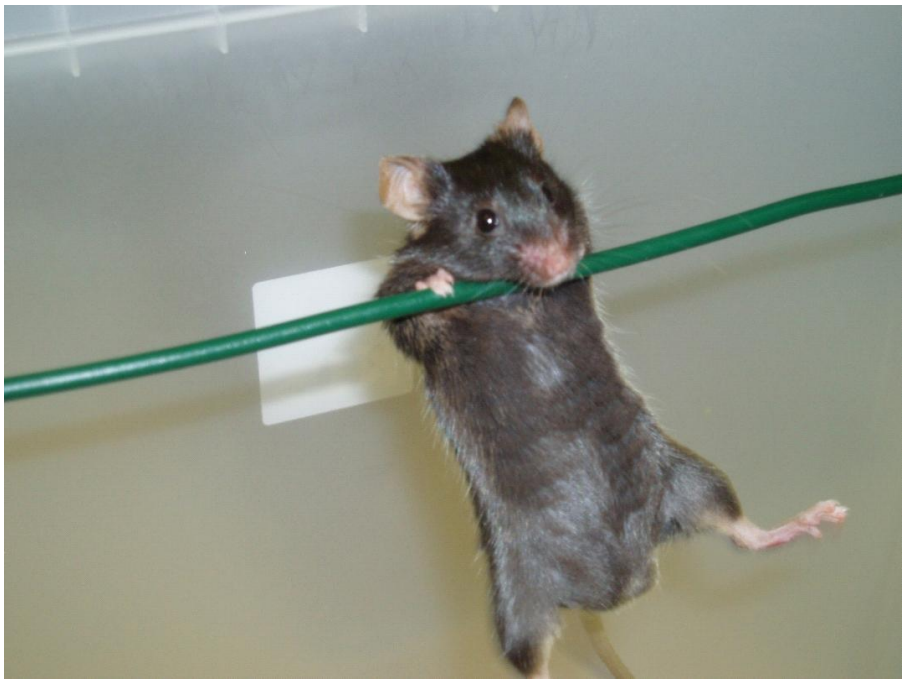
Skupina od 16 miševa divljeg tipa, hranjena je 19 dana hranom u prahu, načinjenom usitnjavanjem briketa standardne hrane za miševe, u koju je ravnomjerno umiješan kuprizon (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) koncentracije od 0,2 %. Dvadesetog dana započeto je testiranje, a istog dana je isključena hrana s 0,2 % kuprizon-om i uvedena hrana s 0,1 % kuprizon-om kako bi se zadržala krivulja hipomijelinizacije od 33% (88, 89, 93).
Na životinjama su ispitvani kognitivni i motorički testovi prije i poslije anestezije izofluranom ili sevofluranom. Da bi se održala razina krivulje hipomijelinizacije i izbjegao proces remijelinizacija svi testovi su bili provedeni kroz sedam dana.

4. 2. Mjerenje orijentacije u prostoru (test ispružanja prednjih nogu)

U testu orjentacije u prostoru *(eng. hindlimb reflex extension test*) životinja su bile postavljene u vertikalni položaj u odnosu na rub stola. Glava miša je bila na visini 15 cm od ruba stola. Miš je pridržavan za rep i polako spuštan tijekom 2-3 minute do ruba stola. Promatrano je da li će životinja spontano i samostalno ispružiti prednje noge da bi se oslonila na rub (94). Rezultat je ocijenjen na slijedeći način.
1 = da, ispruži prednje noge
0 = ne, ne ispruži prednje noge.

4. 2. 1. Mjerenje snage stiska prednjih nogu

Tijekom mjerenja snage stiska prednjih nogu životinje su (engl. *forelimb grip strength test*) postavljene tako da prednjim nogama pridržavaju žicu debljine 3mm, na visini 60 cm u odnosu na podlogu. Mjerilo se vrijeme koje miš postigne držeći se za žicu sa obje prednje noge. Najduže dozvoljeno vrijeme držanja za žicu bilo je do 30 sekundi (94).



Slika 4.2. Test snage stiska prednjih nogu

4. 2. 2. Mjerenje refleksa ispružanja stražnjih nogu

Tijekom mjerenje refleksa ispružanja stražnjih nogu (eng. *hindlimb reflex extension test*) životinje su pridržavane za rep u vertikalnom položaju kroz 10 sek. i promatran je položaj stražnjih nogu (94). Položaj stražnjih nogu je ocjenjen ocjenama od 0 do 4 kako slijedi:

0 = jedna ili obje prednje noge su paralizirane

1 = prednje noge su položene uz tijelo, šape su zatvorene, a refleksi odsutni

2 = prisutna je fleksija nogu, ali su odsutni refleksi

3 = životinja širi noge pod kutom manjim od 90°

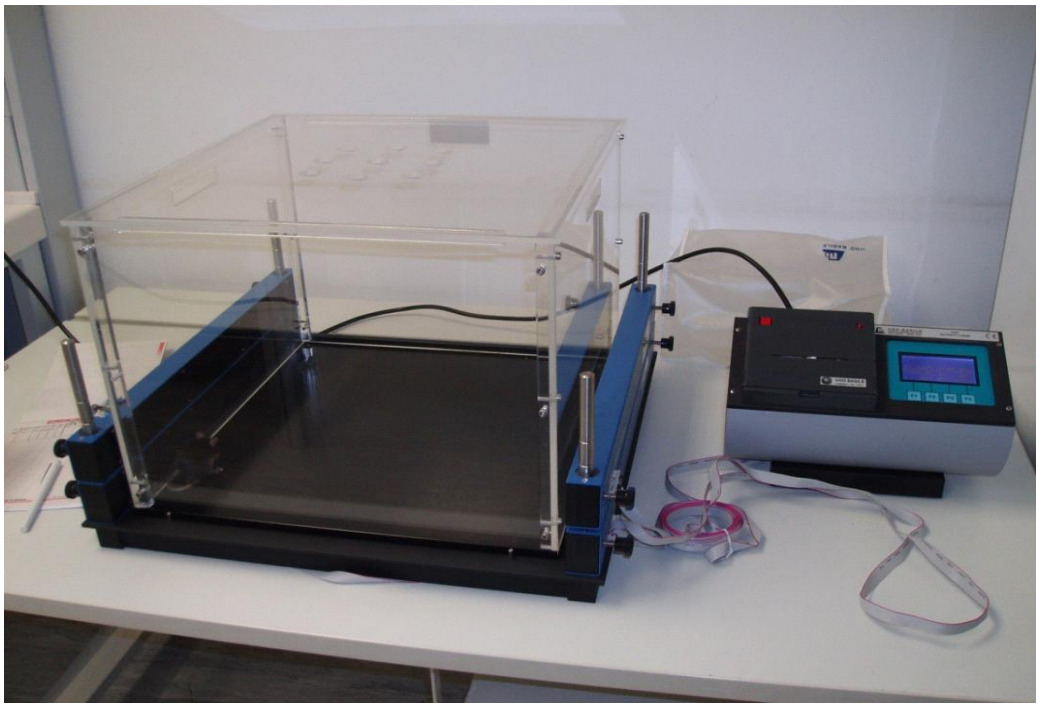
4 = životinja širi noge pod kutom većom od 90°



Slika 4.3. Mjerenje refleksa ispružanja stražnjih nogu (ocjena 1)

4. 3. Mjerenje lokomotorne aktivnosti u otvorenom polju

Kavez koji je korišten za mjerenje lokomotorne aktivnosti (eng. *photocell activity cage*), (ACTIVITI CAGE, model: Cat. 7420, UGO BASILE, COMERIO-Varese Italy) koristi mikroprocesore s 16 odašiljača i isto toliko prijemnika postavljenih jedan nasuprot drugom oko plastičnog kaveza. Svako pomicanje životinje u dva smjera (vodoravnom i okomitom) bilježi procesor u programiranom vremenu. Vremenski intervali individualno se mijenjaju ovisno o želji istraživača, a najkraći vremenski interval je 60 sekundi. Nakon zadanog vremena na ekranu štampača brojčano se zabilježi vodoravna i okomita aktivnost životinje izmjerena infracrvenim zrakama. Komora kaveza je konstruirana tako da može primiti jednog ili grupu od 3-4 miša. Kavez je izrađenog od prozirnog *Perspex* materijala dimenzija 41 x 41 x 33 cm. Gornja površina zatvorena je perforiranim poklopcem od istog prozirnog materijala. Ovim testom mjeri se spontana, koordinirana, lokomotorna aktivnost i ponašanje životinje u određenim vremenima, nakon 60 sek. i nakon 240 sek. Pod spontanom aktivnosti podrazumijeva se pokretanje životinje u plastičnom kavezu u vodoravnom, odnosno okomitom položaju (95, 96).

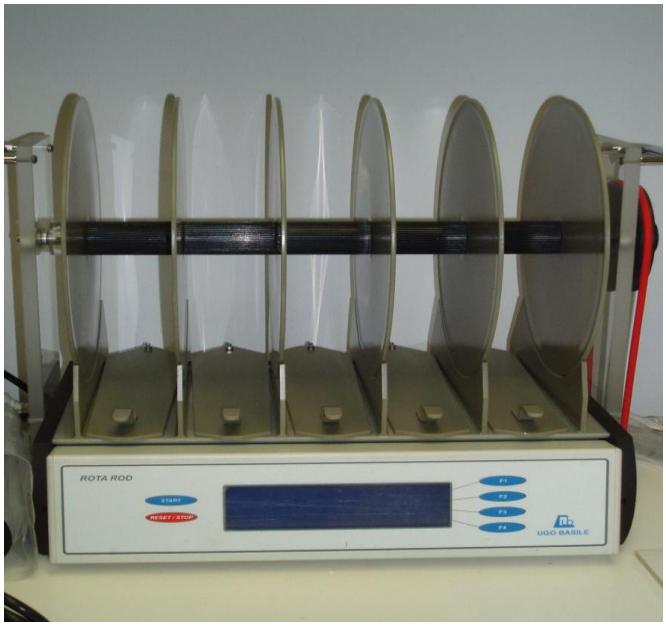


Slika 4.4. Slika prikazuje kavez za mjerenje lokomotorne aktivnosti u otvorenom polju

4. 3. 1. Mjerenje održavanja na rotirajućoj osovini

Za mjerenje održavanja na rotirajućoj osovini (engl. *Rotarod*) koristi se uređaj Rota-Rod 47600 (sl.4.4.). To je mikroprocesorski kontrolirana jedinica, tvrtke Ugo-Basile (Rota-Rod, model: Cat. 47600 (Rev. 2), UGO BASILE, COMERIO-Varese Italy). Sastoji se od pet cilindara promjera 3 cm. Cilindri su obrađeni na način da osiguravaju optimalnu čvrstoću držanja životinje. Šest razmaknica promjera 25 cm formiraju ukupno pet traka. Svaka traka je širine 57 mm. Na ovaj način omogućeno je testiranje pet miševa istovremeno. Na kugličnim ležajevima se okreće rotor pokretan izdržljivim istosmjernim motorom promjenjive brzine okretanja. Brzina okretanja ne ovisi o promjenama napona, trenju i habanju. Na taj način omogućava se ponavljanje testova u nepromijenjenim radnim uvjetima. Brzina ili ubrzanje kretnji valjka su elektronski kontrolirani, a individualno se prilagođavaju ovisno o životinji i prirodi testa. Brzina okretanja rotora može se podešavati odgovarajućim izborom funkcijskih tipki. Brzina se može povećavati te tako pratiti ima li životinja dovoljno snage kako bi mogla trčati i održavati ravnotežu po pokretnoj površini. Za mjerenje održavanja miša na rotirajućoj osovini u ovom istraživanju korišten je mod fiksne brzine 20 rpm. uz maksimalno dozvoljeno vrijeme na Rota-rodu tijekom uvježbavanja do 3 minute. Ovaj mod je odabran kako bi se izbjeglo veće zamaranje i osigurao oporavak miša za iduće mjerenje (tri mjerenja u nizu). Svaka životinja se 3 dana prije pokusa uvježbava na rotirajućem valjku. Također miševi tipa

B4Galnt1 zbog tremora i slabosti nogu ne bi mogli izdržati duže vrijeme veće brzine. Miševima se tijekom samog pokusa dozvoljava maksimalno trajanje kretanja po Rota-rodu do 5 minuta. pri fiksnoj brzini od 20 rpm. Tijekom testiranja u trenutku kada životinja padne s rotirajućeg valjka polugica aktivira svjetlosni senzor i tako registrira vrijeme latencije do trenutka pada životinje. Vrijeme latencije pri fiksnoj brzini valjka postignuto do trenutka pada životinje uzima se kao mjera održavanja ravnoteže i koordinacije pokreta (97, 98).



Slika 4.5. Uređaj Rota-Rod 47600 za mjerenje održavanja na rotirajućoj osovini

4. 4. Protokol izvođenje testova pamćenje

4. 4. 1. Modificirani *Lashley III* labirint

Labirint čini kavez od pleksiglasa unutar kojeg je konstrukcija labirinta. Stjenke labirinta su izrađene od stiropora prema shemi kao što je prikazano (slika 4.6.). Miševi u ovom testu se u potrazi za hranom koriste pamćenjem i njuhom. 24 sata prije ukidanja hrane miševima se ponudi hrana za testiranje (1-2 kukuruzne žitne pahuljice). Nakon 24 sata uskrati se sva hrana, osim stelje i vode, u trajanju od 32 sata, nakon čega slijedi test u labirintu. Kako bi upoznali labirint, 24 sata prije pokusa i neposredno prije pokusa, miševi koji su iz istog kaveza, stavljaju se u labirint u kojem borave 20 min. Miš prije testa njuši žitnu pahuljicu, koja se

potom sakrije u labirintu, a životinji se daje šansa 4 puta po 10 min za pronalaženje hrane određenom putanjom (slika 4.6.). Uvježbanom mišu se još jednom mjeri vrijeme za pronalaženje hrane neposredno prije anestezije. Nakon anestezije potpuno budan miš stavlja se u labirint. Testiranje traje najduže 15 min. Cilj je da životinja pronađe hranu. Vrijeme potrebno za aktivno pronalaženje hrane je vrijeme latencije i ono je mjera ovoga testiranja. Hana koju miš pronađe ujedno je i nagrada za uspješno obavljen test (99).



Slika 4.6. Modificirani Lashley III labirint

4. 4. 2. Mjerenje pasivnog izbjegavanja

Mjerenje pasivnog izbjegavanja *(eng. Passive avoidance task)* provodi se u kavezu za treniranje (PASSIVE AVOIDANCE, model: Cat. 7550, UGO BASILE, COMERIO-Varese Italy) koji se sastoji od pravokutnog kaveza podijeljenog u dva odjeljka. Jedan je svijetli odjeljak, osvijetljen sa žaruljom iznad odjeljka, a drugi je tamni odjeljak i takav ostaje do kraja testiranja. Odjeljci su odvojeni s giljotinskim vratima. Vrata se automatski zatvaraju kada miš uđe u tamni odjeljak. U trenutku ulaska miša u tamni odjeljak kroz pod načinjen od žičanih rešetki prođe kratkotrajni strujni udar koji miš osjeti na šapama. Test pasivnog izbjegavanja ispituje strah i motivaciju. Izbjegavanjem zadatka miš se uči sigurnijem ponašanju odnosno suzdržavanju od prolaženja kroz vrata u tamnu prostoriju gdje slijedi

kažnjavanje. U prirodi ponašanja miša je da istražuje, ulazi u tamne prostore i skriva se. Latencija tj vrijeme do ulaska u prostoriju za kažnjavanje služi kao pokazatelj vremena odgađanja instinktivne reakcije.

Kao vrijeme latencije bilježi se vrijeme spuštanja vrata i ulaska miša u tamni odjeljak. Jednom kada miš uđe u tamni odjeljak, a giljotinska vrata se zatvore, miš se ponovo vraća u kavez u kojem je boravio.

Prije prvog mjerenja miš se treba uvježbati tako da se kroz 30 sek. privikne na prostor svijetlog odjeljka i usmjeri prema giljotinskim vratima i uđe u tamni odjeljak. Nakon 30 sekundi vrata se otvore kako bi se dopustilo mišu da slobodno istražuje. Kada miš uđe u tamni odjeljak sa sve četiri šape giljotinska vrata se zatvore. Kao vrijeme latencije bilježi se vrijeme spuštanja vrata i ulaska miša u tamni odjeljak. Samo 3 sekunde nakon što se vrata zatvore uslijedi blagi strujni udar od 0,5 mA u trajanju od 2 sekunde. 30 sekundi nakon strujnog udara miš se vraća u kavez u kojem je boravio.

Prvo mjerenje slijedi 24 sata nakon dana uvježbavanja. Miš se vraća u svijetli odjeljak i usmjeri se prema giljotinskim vratima i tamnom odjeljku. Nakon 5 sekundi vrata se otvore, a mišu se dozvoli da uđe u tamni odjeljak sa sve četiri šape. Kada miš uđe giljotinska vrata se zatvore. Kao vrijeme latencije bilježi se vrijeme spuštanja vrata i ulaska miša u tamni odjeljak. Samo 3 sek. nakon što se vrata zatvore uslijedi manji strujni udar jačine do 0,5 mA u trajanju od 2 sek. Nakon 30 sekundi po strujnom udaru miš se vraća u kavez u kojem je boravio.

Prvo se ispituje kratkoročno pamćenje, a nakon 15 dana postupak se ponavlja za dugoročno pamćenje, ali bez prethodnog učenja i uvježbavanja životinje. Pokus je potrebno učiniti prije anestezije i nakon anestezije izofluranom ili sevofluranom (100, 101).

4. 5. Priprema tkiva za imunohistokemijsku analizu i imunohistokemijska analiza

Eutanazija je učinjena u skladu s etičkim principima uz odobrenje (broj: 2158-61-07-12-38) Etičkog povjerenstva za istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta JJ Strossmayera u Osijeku, a uz poštivanje svih etičkih načela prema odredbama Zakona o dobrobiti životinja: „Zaštita životinja za pokuse i druga znanstvena istraživanja, poglavlje XIII; 1999 god.“

Životinje su prije žrtvovanja duboko anestezirane pomoću dva anestetika – Ketanest (Pfizer, Germany) ubrizgan peritonealno u koncentraciji od 30 mg/kg te drugi inhalacijski sevofuran

(Baxter, Deerfield, IL, USA). Životinjama je napravljena kardijalna perfuzija najprije s 0,1 M otopinom PBS-a (fosfatni pufer, engl. *phosphate buffer saline*), a zatim je s 4%-tnim paraformaldehidom (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) otopljenim u 0,1 M otopini PBS-a i s podešenom pH vrijednosti na 7,4. Nakon disekcije mozgovi su fiksirani 24 sata na +4°C u 4%-tnom paraformaldehidu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) u 0,1 M PBS-u, pH 7,4. Nakon toga su krioprotektirani kroz 24 sata u otopini 10% saharoze u 0,1 M PBS-u na +4°C te još 24 sata u 20% saharozi, također na +4°C. Uzorci su smrznuti u 2-metilbutanu (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) na -80°C te su pohranjeni na istoj temperaturi do daljnje obrade.

Smrznuti uzorci mozgova namijenjeni imunohistokemijskoj metodi izrezani su na kriostatu (Leica, CM3050S, Germany) u koronarnom smjeru, na debljinu od 35 μm. Za detekciju kompleksnih gangliozida (GM1, GD1a, GD1b i GT1b) korištena su visokospecifična monoklonska protutijela IgG klase proizvedena u miševima s isključenim genom za enzim UDP-*N*-acetil-D-galaktozamin:GM3/GD3 (*N*-acetil-D-galaktozaminil-transferaza ili GM2-sintaza(102, 103). Kod ovog miša ne dolazi do sinteze kompleksnih gangliozida. Protutijela su poklon prof. dr. sc. Ronalda L. Schnaara.

Imunohistokemijska analiza provedena je i primjenom monoklonskih protutijela NeuN (Chemicon, Temecula, CA, USA) specifičnim za DNA vezujući, neuron specifični protein, u svrhu utvrđivanja opće morfologije tkiva te laminacije korteksa. Protutijela SMI 311 (Stenberg Monoclonals, Baltimore, MD, USA) - detektira nefosforilirane neurofilamente karakteristične za tijela neurona i dendrite te SMI 312 (Stenberg Monoclonals, Baltimore, MD, USA)-generalni marker svih aksona koji prepoznaje fosforilirani epitop na neurofilamentima aksona, upotrijebljena su u svrhu utvrđivanja položaja sustava vlakana i ukupne količine fosforiliranih epitopa u njima. Općenito je poznato da tijekom mijelinizacije raste količina forsoriliranih epitopa na neurofilamentima aksona pa su ova dva markera upotrijebljena i za detekciju stupnja demijelinacije postignute kuprizonom, odnosno za detekciju slijeda defosforilacije na različitim sustavima vlakana. Nadalje, korištena su i monoklonska protutijela koja detektiraju glikoprotein pridružen mijelinu (MAG, engl. *myeline associated glycoprotein*) (Chemicon, Temecula, CA, USA) i mijelinski bazični protein (MBP, engl. *myelin basic protein*) (QED Bioscience Inc., San Diego, CA, USA) te monoklonsko protutijelo koje detektira enzim fosfodiesterazu cikličkih nukleotida (CNPase, prema engl. *2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodi-esterase*) koju u visokim koncentracijama eksprimiraju mladi oligodendrociti u odraslom središnjem živčanom sustavu te Schwannove stanice u perifernom živčanom sustavu (104).

Zbog ove specifične stanične ekspresije, CNP se prepoznaje kao specifični marker za ove dvije vrste glija stanica koje proizvode mijelin, ali je u našem slučaju prije svega korišten zato da bi utvrdili postojanje pokušaja remijelinizacije tijekom davanja kuprizona. MAG, MBP i CNP su markeri mijeliniziranih aksona i njihovom upotrebom imali smo namjeru utvrditi opći stupanj demijelinizacije kod miševa divljeg tipa tretiranih kuprizonom.

Imunohistokemija je rađena na slobodno plutajućim rezovima koji su pretretirani u 1% otopini vodikovog peroksida (Kemika, Zagreb) u 0,1M PBS-u kako bi se uklonila aktivnost endogenih peroksidaza. Nespecifično vezanje protutijela blokirano je otopinom 1% goveđeg serumskog albumina (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) i 5% kozjeg seruma (Gibco, Invitrogen Auckland, NZ) u 0,1M PBS-u tijekom 2 sata na +4°C i uz neprekidno treskanje. Inkubacija u primarnom protutijelu trajala je preko noći na +4°C uz neprekidno treskanje. Sva primarna protutijela pripremljena su u otopini za blokiranje, a korištena su u slijedećim omjerima: anti-GM1, 1:3000; anti-GD1a, 1:10000; anti-GD1b, 1:10000; anti-GT1b, 1:3000; NeuN, 1:2000; SMI 311, 1:5000; SMI 312 1:5000; anti-MAG, 1: 500; anti-MBP, 1:500; anti-CNPase, 1:500. Nakon inkubacije u primarnom protutijelu rezovi su tri puta isprani u pothlađenom 0,1M PBS te inkubirani u sekundarnom protutijelu kroz 4 sata na +4°C uz neprekidno treskanje. Kao sekundarno protutijelo korišten je biotinilirani kozji anti-mišji IgG (Jackson Immunoresearch lab., West Grove, PA, USA) razrijeđen u omjeru 1:500 u otopini za blokiranje. Nakon toga rezovi su isprani 3 puta po 10 minuta u pothlađenom 0,1M PBS i prebačeni u tercijarni kompleks, *Vector Elite kit* (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), pripremljen u skladu s uputama proizvođača. Ovaj tercijarni kompleks se sastoji od avidina i biotinilirane peroksidaze te se zbog toga prije upotrebe treba prekonjugirati u otopini za blokiranje u trajanju od oko pola sata. U tercijarnom protutijelu rezovi su inkubirani 2 sata na +4°C uz neprekidno treskanje. Rezovi su ponovno isprani, a potom su razvijeni precipitirajućim supstratom Vector DAB Substrate Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) pripremljen u skladu s uputama proizvođača. Pozitivna reakcija vidi se kao smeđe do sivo obojenje na mjestima gdje je došlo do vezanja primarnog protutijela.

Preparati su još jednom isprani s 0,1M PBS-om, a potom su iz destilirane vode navučeni na predmetna stakalca, osušeni, skenirani NikonScan skenerom te slikani mikroskopom (Carl Zeiss, Germany. Slike su obrađene i pripremljene za tisak programima Photoshop i CorelDraw.

4. 6. Statistika

Normalnost distribucije testirana je Kolmogorov-Smirnov testom. Razlika među pojedinačnim grupama analizirana je Mann-Whitney U testom. Za usporedbu razlike ponavljanih mjerenja unutar pojedine skupine korišten je Wilcoxonov t-test. Passive avoidance task analiziran je Kaplan-Meier analizom i Logrank testom (105) te ANOVA ponavljanim mjerenjem i Bonferroni *post hoc* korekcijom.

5. REZULTATI

5. 1. Rezultati Razlike u vremenu indukcije u anesteziju i buđenja iz anestezije

Indukcija u anesteziju

WT miševi stari 3 mjeseca imaju značajno kraće vrijeme indukcije izofluranom od WT miševa starosti 12 mjeseci (p=0,006), (Sl.5.1.**).

WT miševi starosti 6 mjeseci imaju značajno kraće vrijeme indukcije izofluranom od WT miševa starosti 12 mjeseci (p=0,003), (Sl.5.1.***).

Miševi WT hranjeni kuprizonom starosti 3 mjeseca imaju značajno duže vrijeme indukcije izofluranom (p<0,001), (Sl.5.2.*) i sevofluranom (p<0,001), (Sl.5.2.*) od WT miševa starosti 3 mjeseca.

B4galnt1 miševi starosti 12 mjeseci imaju značajno kraće vrijeme indukcije izofluranom od WT miševa starosti 12 mjeseci (p=0,003), (Sl.5.2.**).

B4galnt1 miševi imaju značajno kraće vrijeme indukcije u anesteziju izofluranom (p<0,001), (Sl.5.2.****) i sevofluranom (p<0,001) od WT miševa hranjenih kuprizonom, (Sl.5.2.*****).

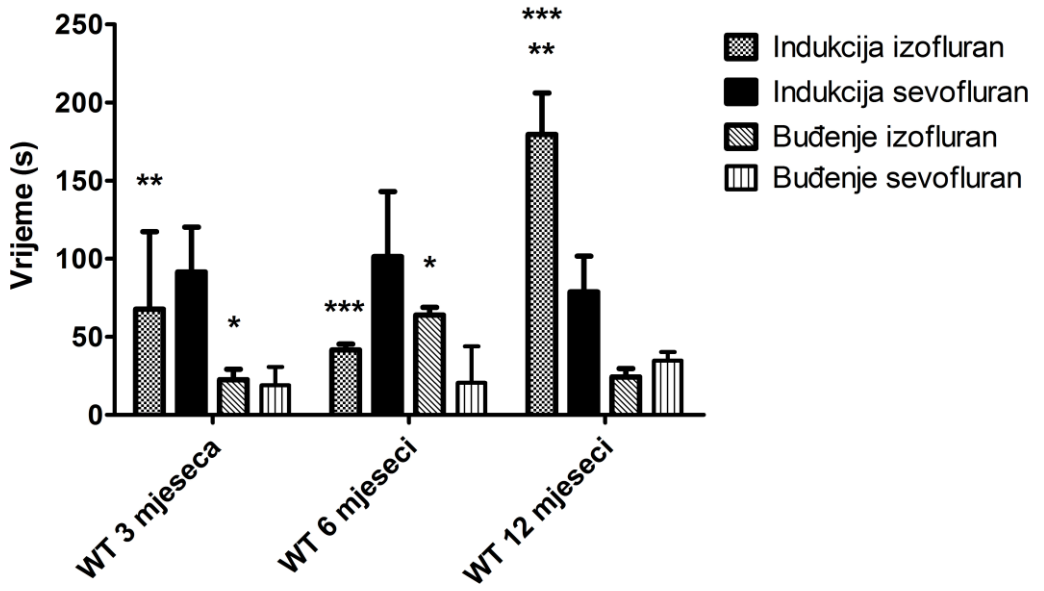
Buđenje iz anestezije

WT miševi stari 3 mjeseca imaju značajno kraće vrijeme buđenja nakon anestezije sevofluranom (p=0,014), (Sl.5.1.) od WT miševa starosti 12 mjeseci .

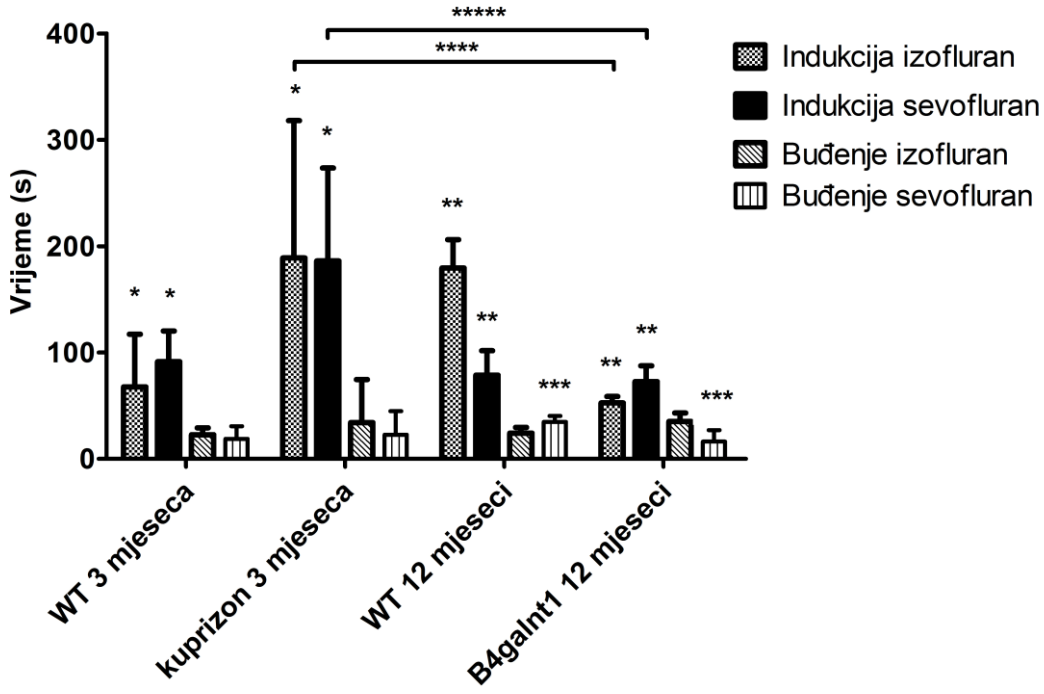
Naprotiv WT miševi stari 6 mjeseci imaju značajno duže vrijeme buđenja iz anestezije nakon anestezije izofluranom od WT miševa starosti 12 mjeseci (p=0,003), (Sl.5.1.).

B4galnt1 miševi starosti 12 mjeseci imaju duže vrijeme buđenja nakon anestezije izofluranom od WT miševa starosti 12 mjeseci (p=0,023), (Sl.5.2.).

B4galnt1 miševi imaju značajno kraće vrijeme buđenja nakon anestezije sevofluranom od WT miševa starosti 12 mjeseci, (Sl.5.2.***).



Slika 5.1 Indukcija u anesteziju i buđenje iz anestezije izofluranom ili sevofluranom za miševe WT starosti 3, 6 i 12 mjeseci.* WT 3 mj. nasuprot WT 6 mj., izofluran, (p<0,001). ** WT 3 mj. nasuprot WT 12 mj., izofluran, (p=0,006). * WT 6 mj. nasuprot WT 12 mj., izofluran, (p=0,003)**



Slika 5.2 Indukcija i buđenje iz anestezije izofluranom ili sevofluranom, miševa WT starosti 3 i 12 mj., miševa hranjenih kuprizonom i *B4galnt1*. * WT 3 mj. nasuprot miševima hranjenim kuprizonom; indukcija izofluranom (p<0,001) i sevofluranom (p<0,001). WT 12 mj. nasuprot *B4galnt1*12mj; indukcija izofluranom, (p=0.003). *** WT 12 mj. nasuprot *B4galnt1*12mj; buđenje sevofluran. **** WT hranjeni kuprizonom nasuprot *B4galnt1* 12mj; indukcija izofluranom, (p<0,001). ***** WT hranjeni kuprizonom nasuprot *B4galnt1*12mj; indukcija sevofluranom, (p<0,001).**

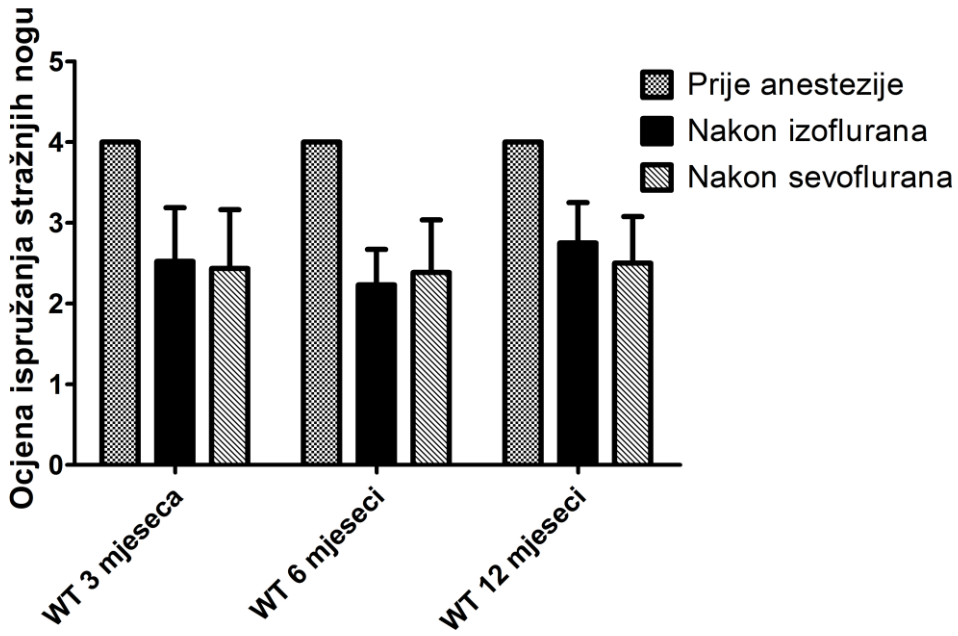
5. 2. Rezultati testiranja orijentacije u prostoru (test ispružanja prednjih nogu)

Sve ispitivane skupine miševa ocjenjene su ocjenom 1 što znači da uspješno ispružaju prednje noge prije anestezije, nakon anestezije izofluranom te nakon anestezije sevofluranom. Nema značajne razlike u refleksu ispružanja prednjih nogu između WT miševa starosti 3 mjeseca, WT miševa starosti 6 mjeseci i WT miševa starosti 12 mjeseci prije anestezije, nakon anestezije izofluranom te anestezije sevofluranom. Nema razlike u refleksu ispružanja prednjih nogu između WT miševa hranjenih kuprizonom starosti 3 mjeseca i WT miševa starosti 3 mjeseca. Nema značajne razlike u refleksu ispružanja prednjih nogu između *B4galnt1* miševa starosti 12 mjeseci i WT miševa starosti 12 mjeseci niti između *B4galnt1* miševa i miševa hranjenih kuprizonom prije anestezije, nakon anestezije izofluranom i anestezije sevofluranom.

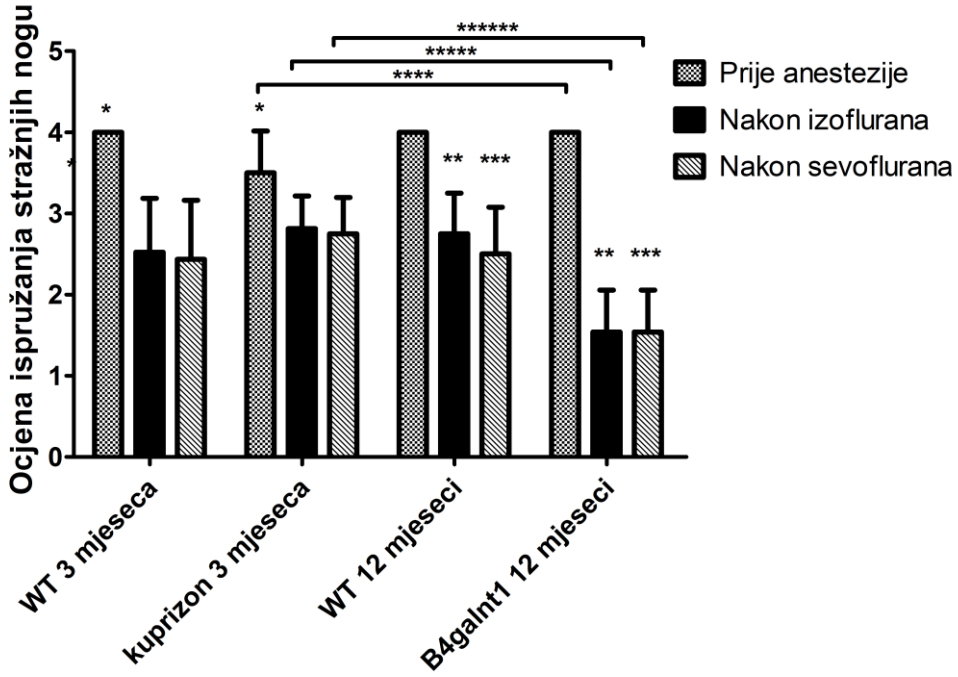
5. 3. Rezultati testova ispitivanja motorike prije i poslije anestezije

5. 3. 1. **Rezultati mjerenja Refleksa ispružanja stražnjih nogu**

Nema značajne razlike u refleksu ispružanja stražnjih nogu između WT miševa starih 3 mjeseca i WT miševa starih 6 mjeseci i WT miševa starosti 12 mjeseci prije anestezije, nakon anestezije izofluranom i nakon anestezije sevofluranom. WT miševi starosti 3 mjeseca imaju značajno manju ocjenu ispružanja stražnjih nogu prije uvoda u anesteziju i nakon izlaganja izofluranom ($p<0,001$) i sevofluranom ($p<0,001$), (Sl.5.3.). Postoji značajna razlika u refleksu ispružanja stražnjih nogu između miševa hranjenih kuprizonom starosti 3 mjeseca i WT miševa starih 3 mjeseca prije izlaganja anesteziji, (Sl.5.4.*). Miševi hranjeni kuprizonom postižu značajno manju ocjenu ispružanja stražnjih nogu. *B4galnt1* miševi postižu značajno manju ocjenu ispružanja stražnjih nogu od WT miševa starosti 12 mjeseci nakon izlaganja izofluranom ($p=0,006$), (Sl.5.4.**) i sevofluranom ($p=0,017$), (Sl.5.4.***), ali ne prije izlaganja anesteziji. *B4galnt1* miševi postižu značajno manju ocjenu ispružanja stražnjih nogu prije anestezije ($p=0.003$), (Sl.5.4.****), nakon uvoda u anesteziju izofluranom ($p<0,001$), (Sl.5.4.*****) i sevofluranom ($p<0,001$), (Sl.5.4.******) od miševa hranjenih kuprizonom. Miševi hranjeni kuprizonom imaju značajno manju ocjenu ispružanja stražnjih nogu nakon izoflurana ($p=0,009$) i sevoflurana ($p=0,001$), (Sl.5.4.). *B4galnt1* miševi također imaju značajno manju ocjenu ispružanja stražnjih nogu nakon izoflurana ($p=0,001$) i sevoflurana ($p=0,001$), (Sl.5.4.).



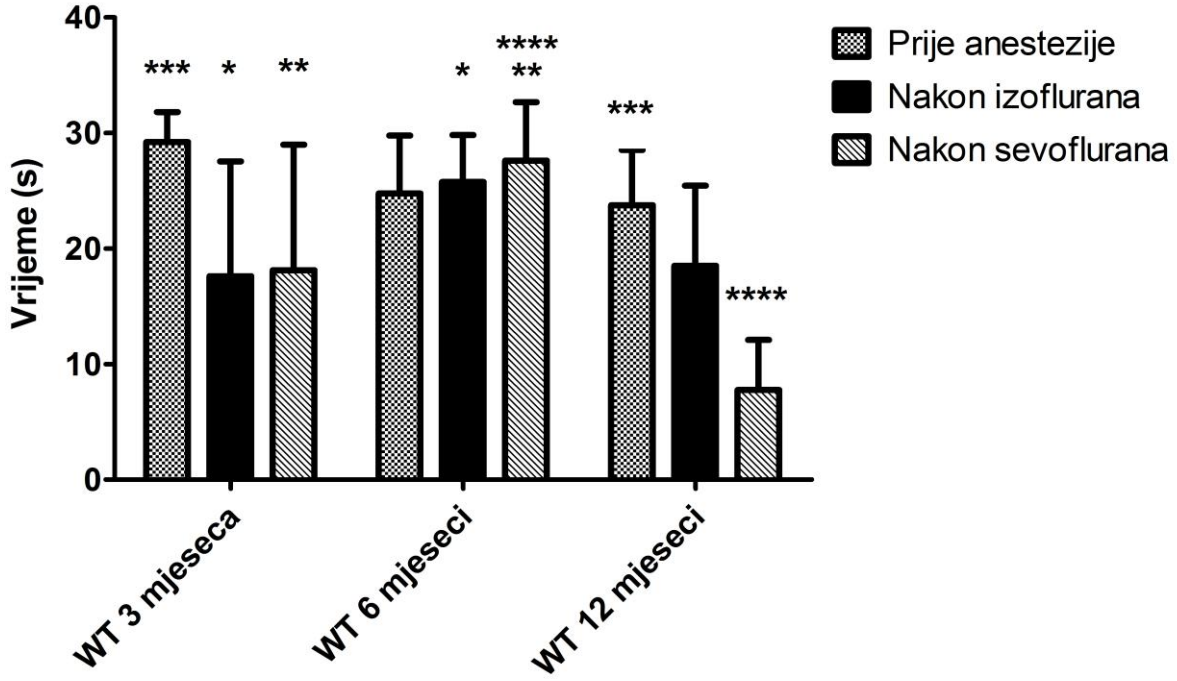
Slika 5.3 Ocjena ispružanja stražnjih nogu prije i nakon anestezije izofluranom ili sevofluranom kod miševa WT starosti 3, 6 i 12 mj



Slika 5.4 Ocjena ispružanja stražnjih nogu prije i nakon anestezije izofluranom ili sevofluranom kod miševa WT starosti 3 i 12 mj., miševa hranjenih kuprizonom i *B4galnt1*. * WT 3 mj. nasuprot hranjeni kuprizonom, prije anestezije. ** WT 12 mj., nasuprot *B4galnt1* 12mj, izofluran, (p=0,006). * WT 12 mj., nasuprot *B4galnt1* 12mj, sevofluran, (0,017). **** hranjeni kuprizonom nasuprot *B4galnt1,* prije anestezije, (p=0,003). ***** hranjeni kuprizonom nasuprot *B4galnt1*, izofluran, (p<0,001). ****** hranjeni kuprizonom nasuprot *B4galnt1*, sevofluran, (p<0,001)**

5. 3. 2. Rezultati testa snage stiska prednjih nogu

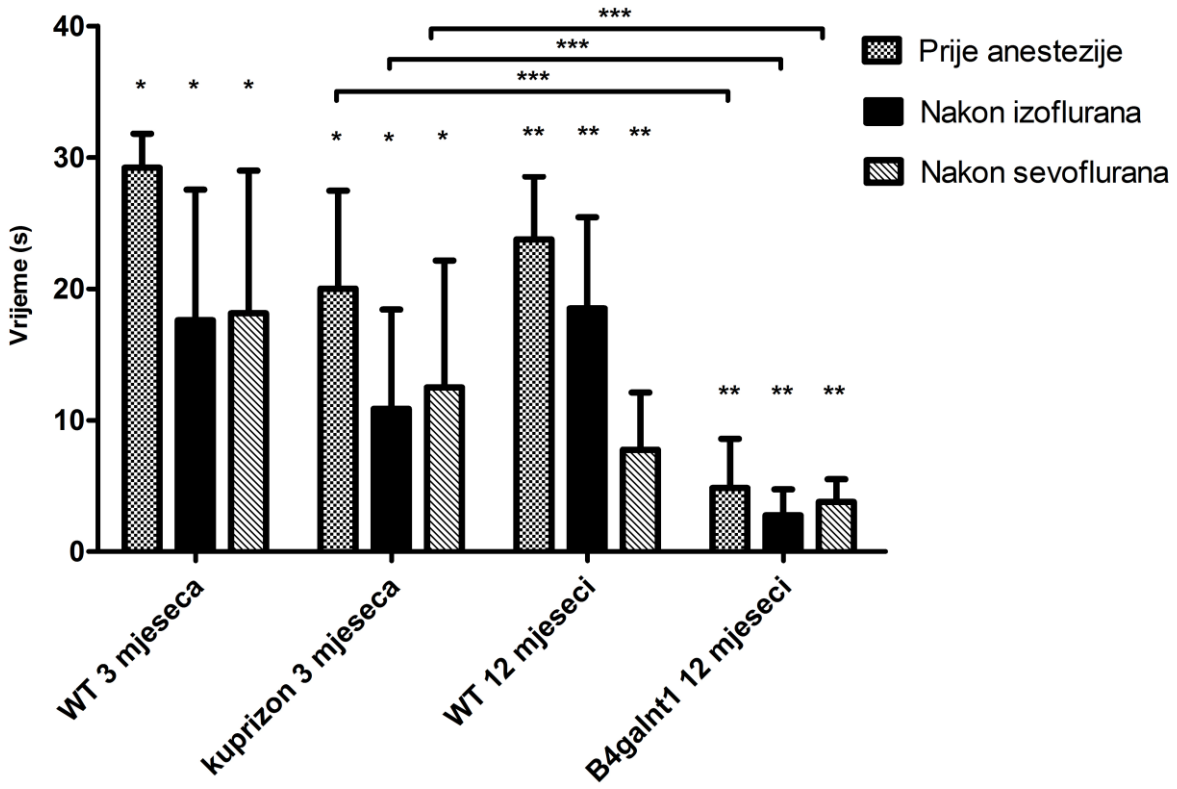
WT miševi starosti 3 mjeseca značajno duže mogu se održati prednjim nogama od WT miševa starosti 6 mjeseci prije anestezije (p=0,001), ali značajno kraće nakon anestezije izofluranom (p=0,029), (Sl.5.5.*) i sevofluranom (p=0,007), (Sl.5.5.**). WT miševi starosti 3 mjeseca imaju značajno duže vrijeme držanja prednjim nogama prije anestezije od WT miševa starosti 12 mjeseci, (Sl.5.5.***). WT miševi starosti 6 mjeseci značajno se duže mogu održavati prednji nogama od WT miševa starosti 12 mjeseci nakon izlaganja izofluranu (p=0,034), (Sl.5.5.) i sevofluranu (p=0.001), (Sl.5.5.****).



Slika 5.5 Vrijeme držanja prednjim nogama za žicu kod miševa WT starosti 3, 6 i 12 mj. * WT 3 mj. nasuprot WT 6 mj., izofluran, (p=0,029). ** WT 3 mj. nasuprot WT 6 mj., sevofluran, (p=0,007). * WT 3 mj. nasuprot WT 12 mj., prije anestezije. **** WT 6 mj. nasuprot WT 12 mj., sevofluran, (p=0,001)**

Miševi hranjeni kuprizonom starosti 3 mjeseca imaju značajno kraće vrijeme održanja prednjim nogama od WT miševa starosti 3 mjeseca prije anestezije (p<0,001) i nakon anestezije izofluranom (p=0,032), (Sl.5.6.*). *B4galnt1* miševi starosti 12 mjeseci značajno se kraće mogu održati prednjim nogama prije anestezije (p=0,003), nakon izoflurana (p=0,003) i nakon sevoflurana (p=0,033) od WT miševa starosti 12 mjeseci, (Sl.5.6.**). *B4galnt1* miševi značajno se kraće održavaju prednjim nogama prije anestezije (p<0,001), nakon izlaganja

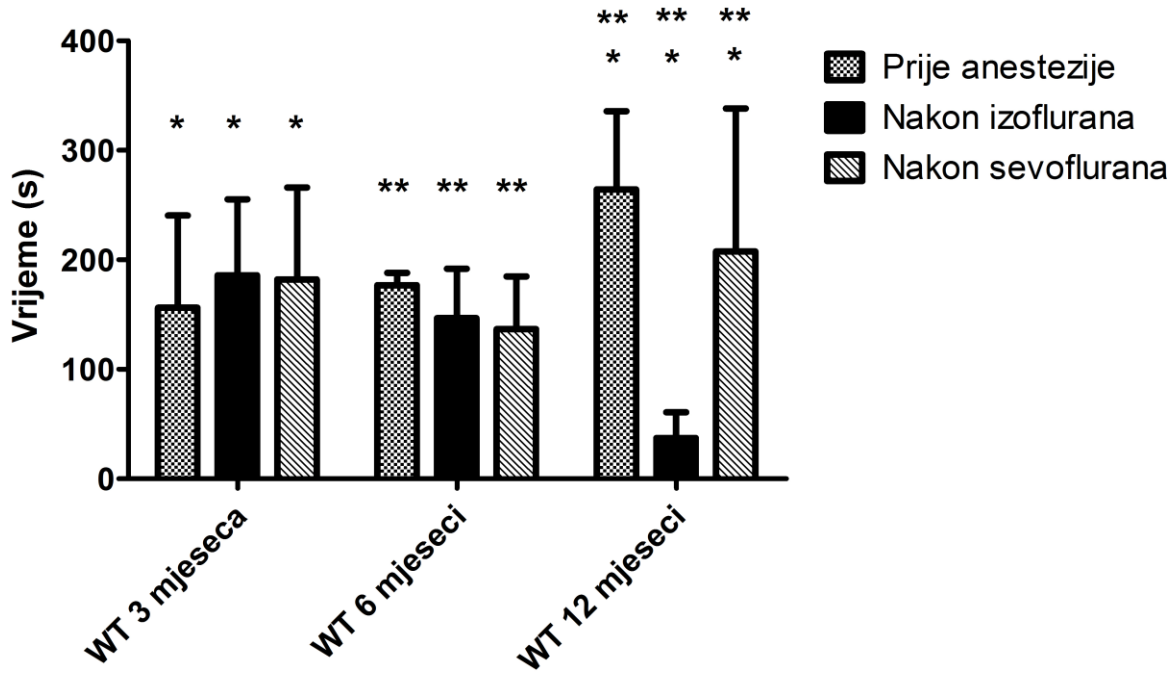
izofluranu (p<0,001) i sevofluranu (p=0,004) od miševa hranjenih kuprizonom, (Sl.5.6.***). WT miševi starosti 3 mjeseca imaju značajno kraće vrijeme održanja prednjim nogama prije anestezije i nakon anestezije izofluranom (p<0,001) i sevofluranom (p=0,001), (Sl.5.6.). Miševi hranjeni kuprizonom imaju značajno kraće vrijeme održanja prednjim nogama prije anestezije i nakon anestezije izofluranom (p<0,002) i sevofluranom (p=0,026), (Sl.5.6.). *B4galnt1* miševi imaju značajno kraće vrijeme održavanja prednjim nogama prije anestezije i nakon izlaganja izofluranu (p=0,018), (Sl.5.6.).



Slika 5.6 Vrijeme držanja prednjim nogama za žicu kod miševa WT starosti 3 i 12 mj., miševa hranjenih kuprizonom i *B4galnt1* 12mj. * WT 3mj. nasuprot hranjeni kuprizonom, prije anestezije (p<0,001), isofluran (p=0,032). ** WT 12 mj. nasuprot *B4galnt1,* prije anestezije i izofluran (p=0,003), sevofluran (p=0,033). * WT 3 mj. nasuprot *B4galnt1,* prije anestezije i izofluran (p<0,001), sevofluran (p=0,004)**

5. 3. 3. Rezultati testa održavanje na rotirajućoj osovini

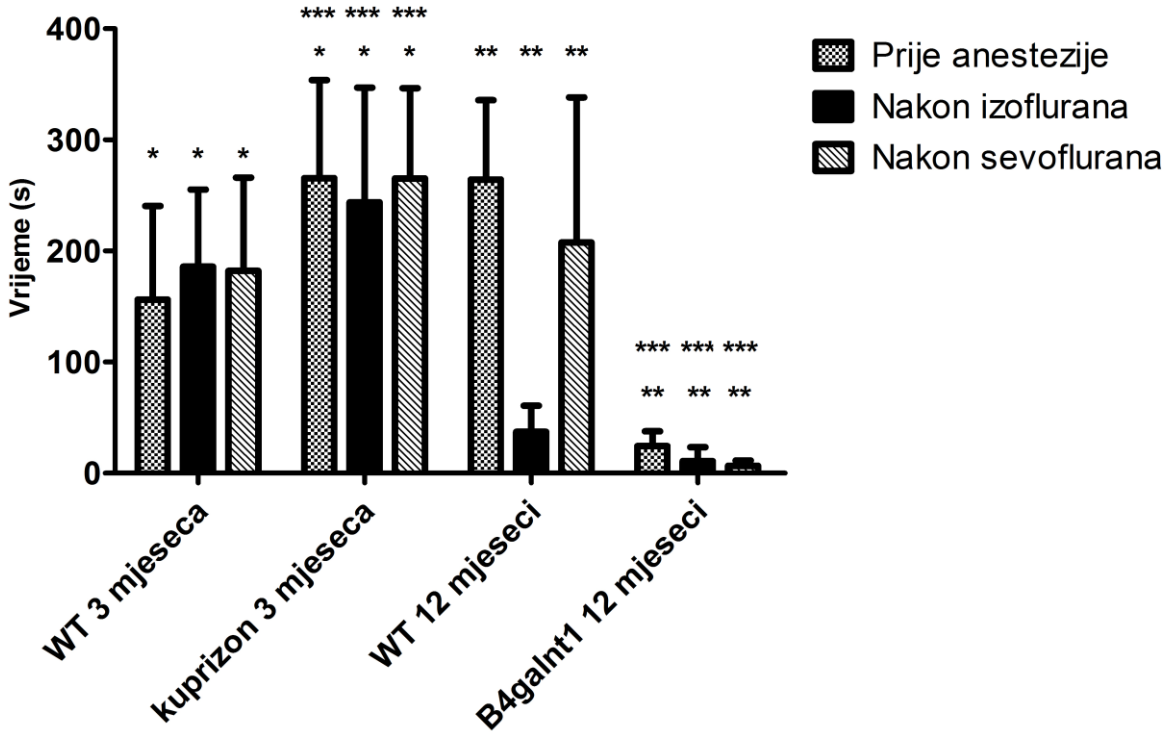
Primijećena je značajna razlika (p<0,001) između vremena održanja na rotirajućoj osovini WT miševa starosti 3 mjeseca i WT miševa starosti 12 mj nakon indukcije izofluranom, (Sl.5.7.*). WT miševi starosti 12 mjeseci se značajno kraće mogu držati na rotirajućoj osovini. Slična razlika primijećena je između vremena održanja na rotirajućoj osovini WT miševa starosti 6 mjeseci i WT miševa starosti 12 mjeseci (p=0,003), (Sl.5.7.**).



Slika 5.7 Vrijeme održavanja na rotirajućoj osovini kod WT miševa starosti 3, 6 i 12 mj. prije anestezije i nakon anestezije izofluranom ili sevofluranom. * WT 3mj. nasuprot WT 12 mj. (p<0,001). ** WT 6 mj. nasuprot WT 12 mj. (p=0,003)

Postoji značajna razlika u vremenu održanja WT miševa starosti 6 mjeseci prije anestezije i nakon aanestezije izofluranom (p=0,028) i vremenu održanja na rotirajućoj osovini prije anestezije i nakon anestezije sevofluranom (p=0,008), (Sl.5.7.). Također je primijećena značajna razlika u vremenu držanja na rotirajućoj osovini *B4galnt1* miševa prije anestezije i nakon anestezije izofluranom (p=0,001) te prije anestezije i nakon anestezije sevofluranom (p=0,001), (Sl.5.8.).

Miševi hranjeni kuprizonom starosti 3mjeseca postižu značajno duže vrijeme održanja na rotirajućoj osovini od WT miševa starosti 3 mjeseca prije anestezije (p<0,001), nakon anestezije izofluranom (p=0,049) i sevofluranom (p=0,003), (Sl.5.8.*). *B4galnt1* miševi starosti 12 mjeseci postižu značajno kraće vrijeme održanja na rotirajućoj osovini od WT miševa starosti 12 mjeseci prije anestezije (p=0,003), nakon anestezije izofluranom (p=0,039) i nakon anestezije sevofluranom (p=0,001), (Sl.5.8.**). Miševi hranjeni kuprizonom postižu značajno duže vrijeme održanja od *B4galnt1* miševa prije anestezije, nakon anestezije izofluranom i nakon anestezije sevofluranom (p=0,003), (Sl.5.8.***).

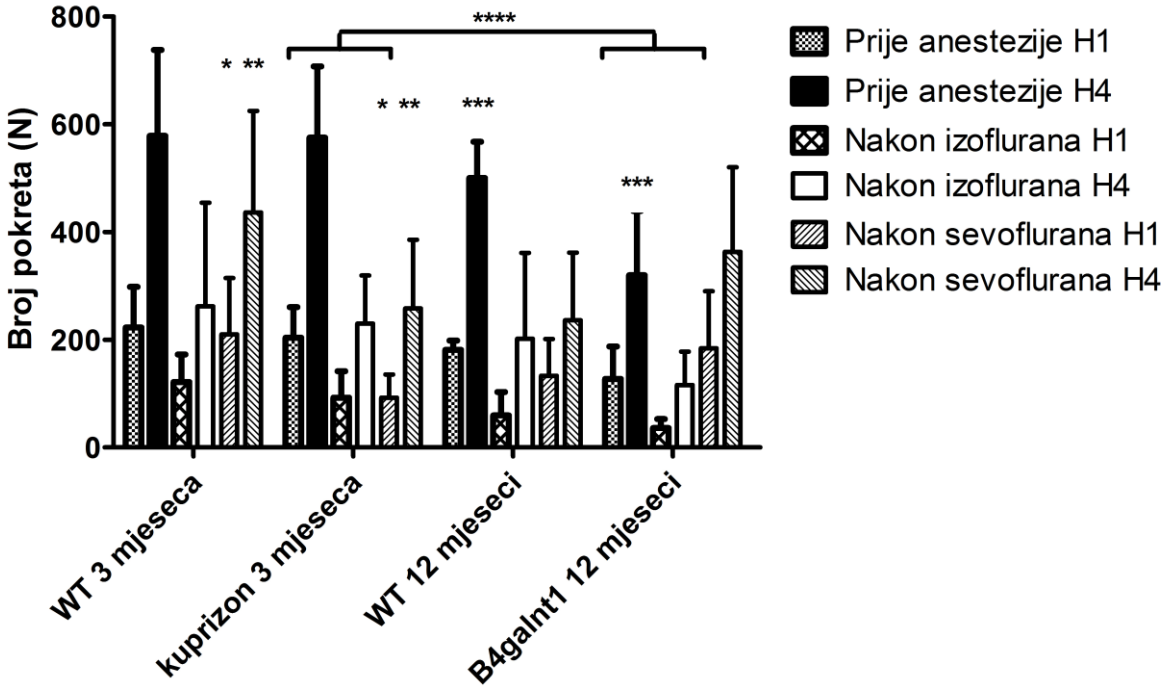


Slika 5.8 Vrijeme održavanja na rotirajućoj osovini kod Wt miševa starosti 3 i 12 mj., miševa hranjenih kuprizonom i *B4galnt1* prije anestezije i nakon anestezije izofluranom ili sevofluranom. * WT 3 mj. nasuprot miševa hranjenih kuprizonom prije anestezije (p<0,001), izofluran (p=0,049), sevofluran (p=0.003). ** WT 12 mj. nasuprot *B4galnt1* 12 mj. prije anestezije (p<0,003), izofluran (p=0,039), sevofluran (p=0,001). * *B4galnt1* 12 mj. nasuprot miševa hranjenih kuprizonom, prije anestezije, isofluran i sevofluran (p=0,003)**

5. 3. 4. Rezultati mjerenja lokomotorne aktivnosti u otvorenom polju

Kod WT miševa starosti 12 mjeseci nema značajne razlike u broju horizontalnih i vertikalnih u 1. i 4. minuti pokreta prije anestezije i nakon izlaganja izofluranu i sevofluranu. Miševi hranjeni kuprizonom imaju značajno manje horizontalnih pokreta prije anestezije i nakon izlaganja izofluranom (Sl.5.9.). *B4galnt1* miševi imaju prije anestezije i nakon anestezije izofluranom značajno manje horizontalnih pokreta u 1. (p=0,002) i 4. (p=0,002) minuti (Sl.5.9.). Kod *B4galnt1*miševa značajno je veći broj horizontalnih pokreta u 1. (p=0,001) i 4. (p=0.001) minuti nakon anestezije sevofluranom nego anestezije izofluranom (Sl.5.9.). *B4galnt1* miševi starosti 12 mjeseci imaju prije anestezije značajno manje horizontalnih pokreta u 4. minuti (p=0,024) od WT miševa starosti 12 mjeseci (Sl.5.9.***). *B4galnt1* miševi imaju prije anestezije značajno manje horizontalnih pokreta u 1. (p=0,002) i 4.

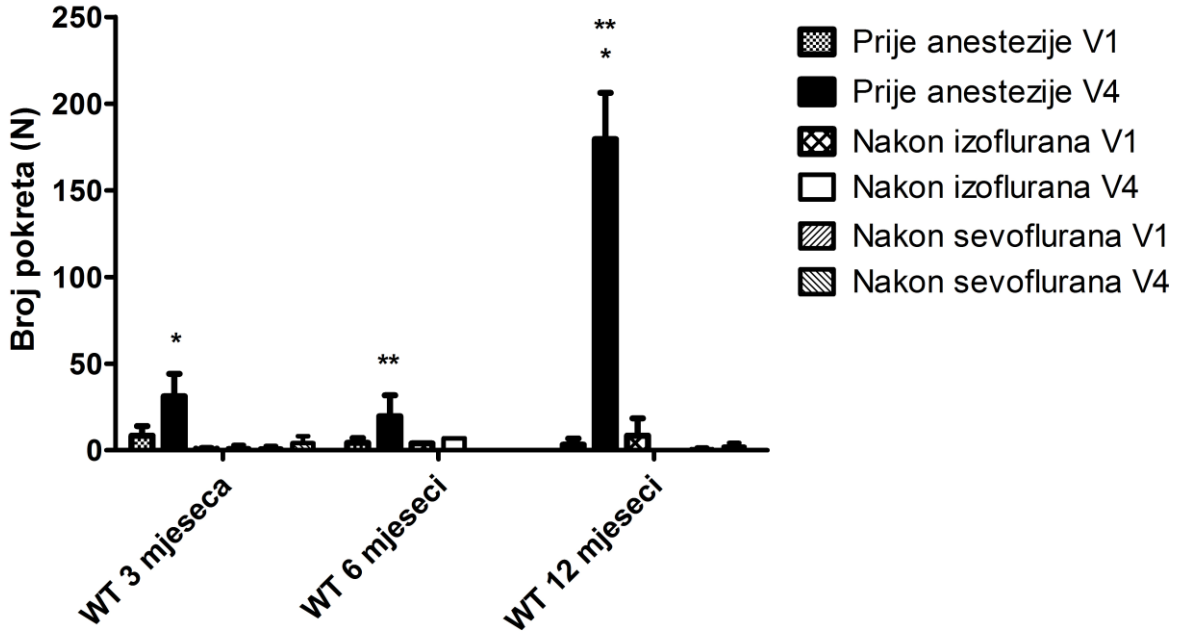
(p<0,001) minuti od miševa hranjenih kuprizonom (Sl.5.9.****). Također *B4galnt1* miševi imaju nakon primjene izoflurana značajno manje horizontalnih pokreta u 1. (p<0,001) i 4. (p<0,001) minuti od miševa hranjenih kuprizonom (Sl.5.9.). Nakon primjene sevoflurana *B4galnt* miševi imaju paradoksalno više horizontalnih pokreta u 1. (p=0,004) minuti (Sl.5.9.). Miševi hranjeni kuprizonom nakon anestezije sevofluranom imaju značajno manje horizontalnih pokreta u 1. (p=0,001) i 4. minuti (p=0,005) od WT miševa starosti 3 mjeseca (Sl.5.9.**).



Slika 5.9 Broj horizontalnih pokreta u prvoj i četvrtoj minuti kod miševa WT 3 i 12 mj., hranjenih kuprizonom i *B4galnt1*. (H1-horizontalni pokreti u prvoj minuti, H4-horizontalni pokreti u četvrtoj minuti) * WT 3 mj. nasuprot hranjeni kuprizonom, H1, nakon izoflurana, (p=0,001). ** WT 3 mj. nasuprot hranjeni kuprizonom, H4, nakon sevoflurana, (p=0,005). * WT 12 mj. nasuprot *B4galnt1,* H4, prije anestezije, (p=0,024). **** *B4galnt1* nasuprot hranjeni kuprizonom, prije anestezije, H1 (p=0,002); H4 (p<0,001). H1 (horizontalni pokreti u 1. min.). H4 (horizontalni pokreti u 4. min.)**

WT miševi starosti 3 mjeseca imaju prije anestezije značajno više vertikalnih pokreta u 1. (p=0,024) i 4. (p=0,021) minuti od WT miševa starosti 6 mjeseci (Sl.5.10.). WT miševi starosti 3 mjeseca imaju nakon anestezije sevofluranom značajno više vertikalnih pokreta u 1. (p=0,011) i 4. minuti (p<0,001) (Sl.5.10.). WT miševi starosti 3 mjeseca imaju prije anestezije značajno manje vertikalnih pokreta u 4. minuti (p=0,002) (Sl.5.10.*). WT miševi starosti 6 mjeseci imaju značajno manje vertikalnih pokreta u 4. minuti prije anestezije (p=0,003) (Sl.5.10.**). WT miševi starosti 6 mjeseci imaju značajno više vertikalnih pokreta u 4. minuti

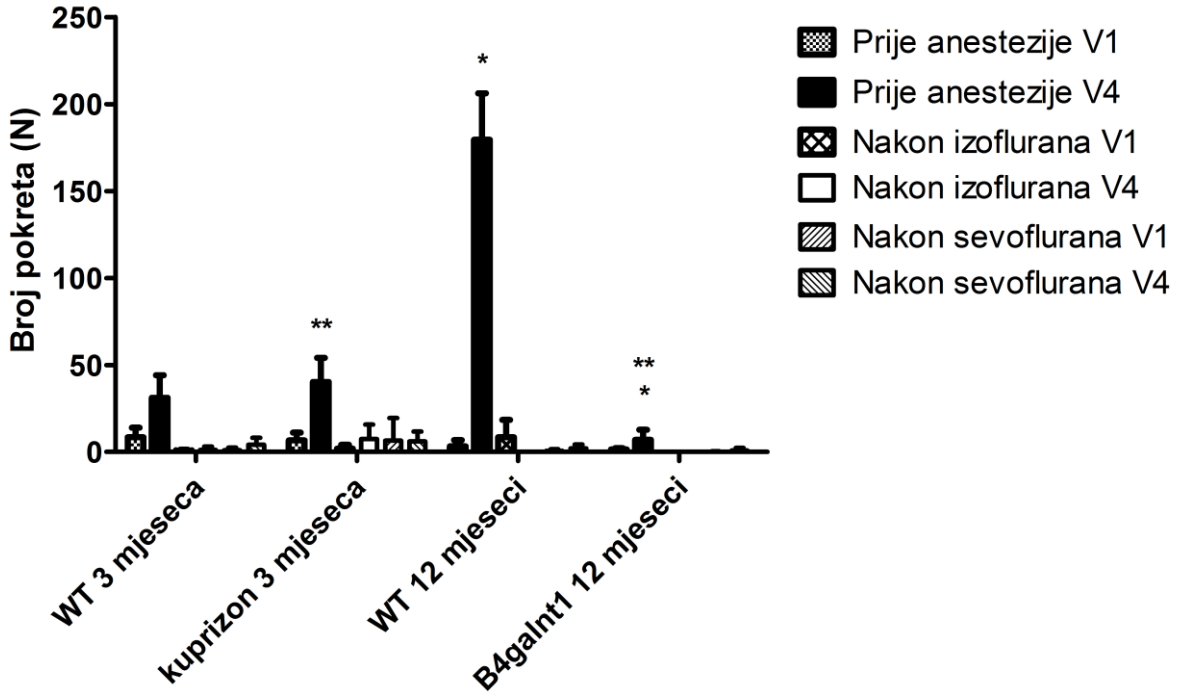
nakon primjene izoflurana (p=0,041) i sevoflurana (p=0,008) (Sl.5.10.). WT miševi starosti 3 mjeseca imaju značajno manje vertikalnih pokreta u 1. (p=0,004) i 4. (p<0,001) minuti prije anestezije i nakon izlaganja izofluranom (Sl.5.10.). WT miševi starosti 6 mjeseci imaju značajno manje vertikalnih pokreta u 1. (p=0,002) i 4. (p=0,001) minuti prije anestezije i nakon anestezije izofluranom (Sl.5.10.).



Slika 5.10 Broj vertikalnih pokreta u prvoj i četvrtoj minuti kod miševa WT 3, 6 i 12 mj. (V1-vertikalni pokreti u prvoj minuti, V4-vertikalni pokreti u četvrtoj minuti) * WT 3 mj. nasuprot WT 12 mj., prije anestezije, V4 (p=0,002) ** WT 6 mj. nasuprot WT 12 mj., prije anestezije, V4 (p=0,003). V1 (vertikalni pokreti u 1. min.). V4 (vertikalni pokreti u 4. min.).

WT miševi starosti 3 mjeseca imaju značajno manje vertikalnih pokreta u 1. (p<0,001) i 4. (p<0,001) minuti prije anestezije i nakon anestezije sevofluranom (Sl.5.11.). Miševi hranjeni kuprizonom starosti 3 mjeseca imaju prije anestezije značajno više vertikalnih pokreta u 4. minuti (p=0,047) i značajno više vertikalnih pokreta u 1. (p=0,006) i 4. (p=0,002) minuti nakon primjene izoflurana (Sl.5.11.). *B4galnt1* miševi starosti 12 mjeseci imaju značajno manje vertikalnih pokreta u 4. minuti (p=0,003), (Sl.5.11.*) prije anestezije i značajno manje vertikalnih pokreta u 4. minuti (p=0,009), (Sl.5.11.) nakon primjene izoflurana nasuprot WT miševima starosti 12 mjeseci. *B4galnt1* miševi imaju prije anestezije značajno manje vertikalnih pokreta u 1. (p<0,001) i 4. (p<0,001) minuti od miševa hranjenih kuprizonom (Sl.5.11.**). *B4galnt1* miševi starosti 12 mjeseci imaju značajno manje vertikalnih pokreta u 1. (p<0,001) i 4. (p=0,002) minuti od miševa hranjenih kuprizonom nakon primjene izoflurana (Sl.5.11.). Nakon primjene sevoflurana *B4galnt* miševi imaju značajno manje

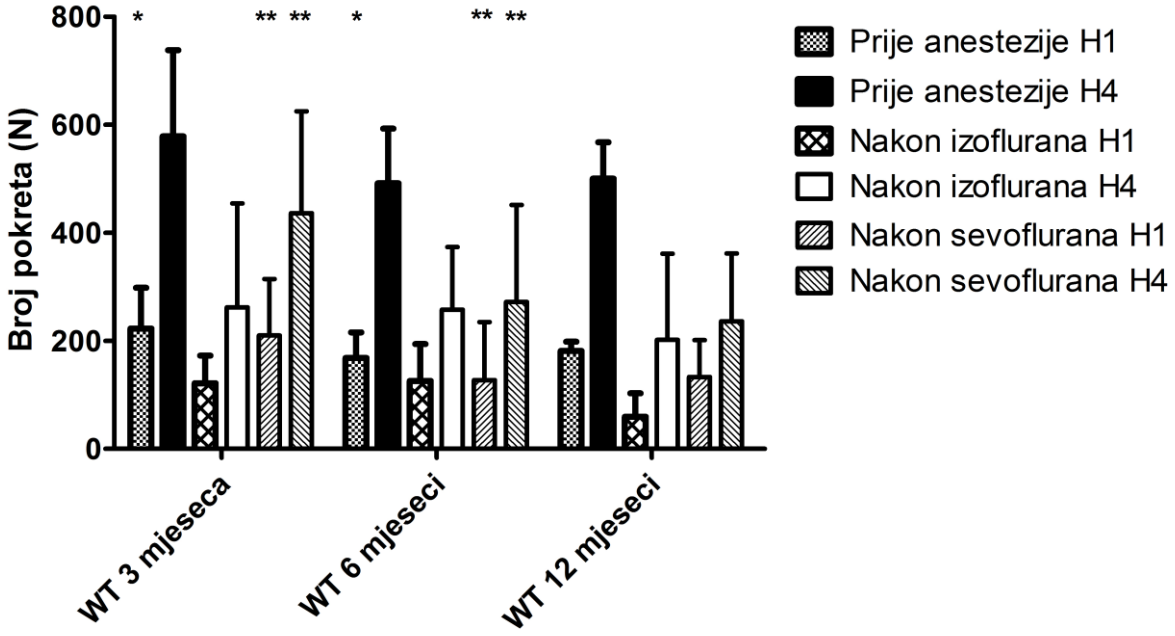
vertikalnih pokreta u 1. (p=0,010) i 4. minuti (p=0,010) (Sl.5.11.). Miševi hranjeni kuprizonom imaju značajno manje vertikalnih pokreta u 1. (p=0,004) i 4. (p<0.001) minuti prije anestezije i nakon izlaganja izofluranom (Sl.5.11.). *B4galnt1* miševi imaju značajno manje vertikalnih pokreta u 1 (p=0,002) i 4. (p=0,001) minuti prije anestezije i nakon anestezije izofluranom (Sl.5.11.). *B4galnt1* miševi imaju značajno manje vertikalnih pokreta u 1. (p=0,003) i 4. (p=0,009) minuti prije anestezije i nakon anestezije sevofluranom (Sl.5.11.).



Slika 5.11 Broj vertikalnih pokreta u prvoj i četvrtoj minuti kod miševa WT starosti 3 i 12 mj., miševi hranjenih kuprizonom i *B4galnt1. WT 12 mj. nasuprot *B4galnt1*, prije anestezije, V4 (p=0,003) ** Miševi hranjeni kuprizonom nasuprot *B4galnt1*, prije anestezije, V4 (p<0,001)**

WT miševi starosti 3 mjeseca imaju prije anestezije značajno više horizontalnih pokreta u 1. minuti (p=0,019) od WT miševa starosti 6 mjeseci (Sl.5.12.*). WT miševi starosti 3 mjeseca imaju nakon anestezije sevofluranom značajno više horizontalnih pokreta u 1. (p=0,022) i 4. minuti (p=0,017) (Sl.5.12.**). WT miševi starosti 3 mjeseca imaju nakon anestezije izofluranom značajno više horizontalnih pokreta u 1. minuti (p=0,029) od WT miševa starosti 12 mjeseci (Sl.5.12.). WT miševi starosti 3 mjeseca imaju značajno manje horizontalnih pokreta u 1. (p=0,001) i 4. (p=0,001) minuti prije anestezije i nakon anestezije izofluranom (Sl.5.12.). WT miševi starosti 3 mjeseca imaju značajno manje horizontalnih pokreta u 4. (p=0,025) minuti prije anestezije i nakon anestezije sevofluranom (Sl.5.12.). WT miševi

starosti 6 mjeseci imaju značajno manje horizontalnih pokreta u 4. minuti (p=0,002) (Sl.5.12.).

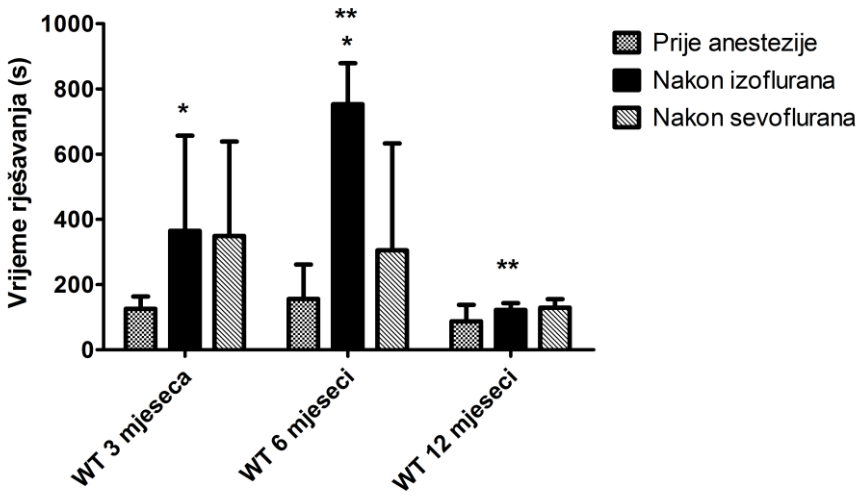


Slika 5.12 Broj horizontalnih pokreta u prvoj i četvrtoj minuti kod miševa WT 3, 6 i 12 mj. * WT 3 mj. nasuprot WT 6 mj., prije anestezije, H1 (0,019). ** WT 3 mj. nasuprot WT 6 mj., nakon sevoflurana, H1 (0,022); H4 (0,017)

5. 4. Rezultati kognitivnih testova

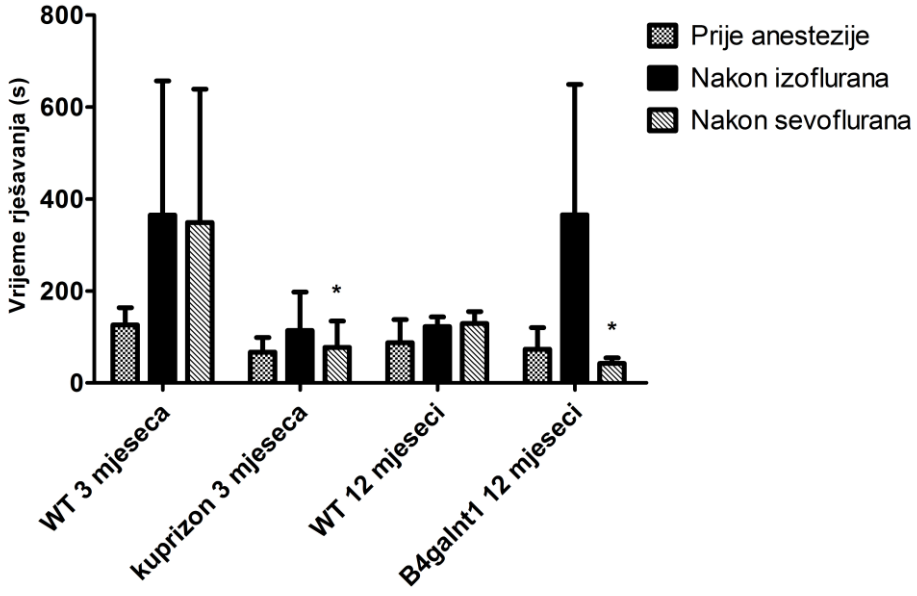
5. 4. 1. Rezultati testa modificiranog *Lashley III* labirinta

WT miševi starosti 3 mjeseca značajno brže rješavaju labirint od WT miševa starosti 6 mjeseci nakon izlaganja izofluranom (p=0,003), (Sl.5.13.*). WT miševi starosti 12 mjeseci znatno brže rješavaju labirint od WT miševa starosti 3 mjeseca, ali ta razlika nije statistički značajna. WT miševi starosti 12 mjeseci nakon anestezije izofluranom značajno brže rješavaju labirint od WT miševa starosti 6 mjeseci (p=0,007), (Sl.5.13.**).



Slika 5.13 Vrijeme rješavanja labirinta kod WT miševa starosti 3, 6 i 12 mj. prije i nakon anestezije izofluranom ili sevofluranom. * WT 3 mj. nasuprot WT 6 mj., izofluran, (p=0,003). ** WT 6 mj. nasuprot WT 12 mj., izofluran, (p=0,007)

Miševi hranjeni kuprizonom starosti 3 mjeseca značajno brže rješavaju labirint od WT miševa starosti 3 mjeseca prije izlaganja anesteziji (p<0,001), nakon anestezije izofluranom (p=0,003) te nakon anestezije sevofluranom (p<0,001). *B4galnt1* miševi starosti 12 mjeseci značajno brže rješavaju labirint od WT miševa starosti 12 mjeseci nakon anestezije sevofluranom (p=0,003). Nema značajne razlike u brzini rješavanja labirinta između WT miševa hranjenih kuprizonom i *B4galnt1* miševa. *B4galnt1* miševi brže rješavaju modificirani *Lashley III* labirint prije izlaganja anesteziji i nakon izlaganja sevofluranom od svih ostalih ispitivanih skupina, (Sl.5.14.).



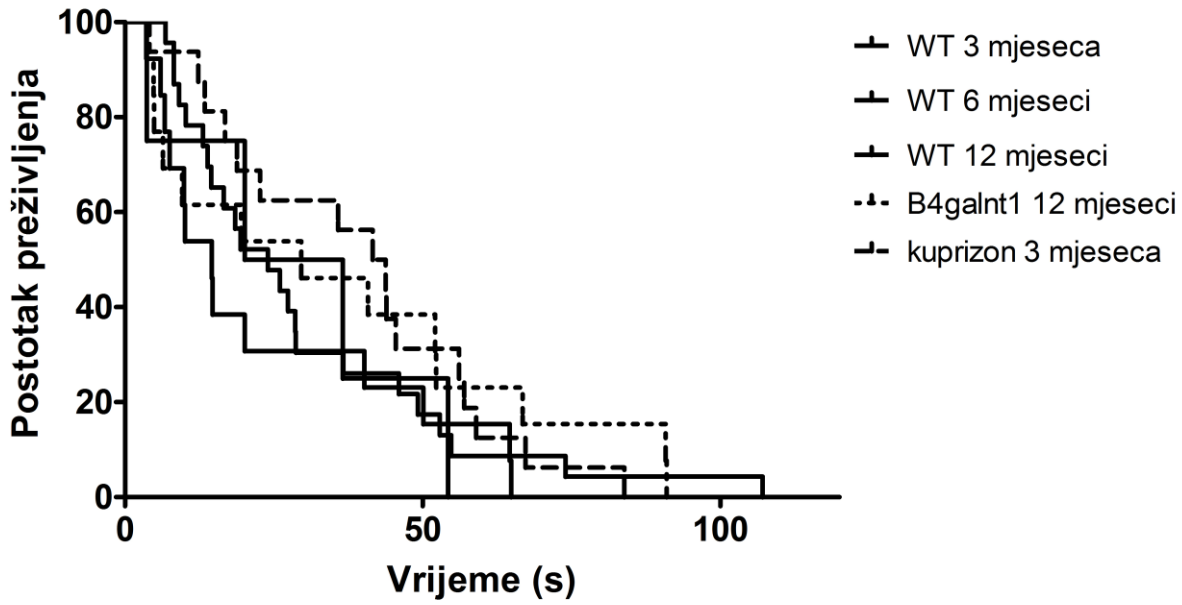
Slika 5.14 Vrijeme rješavanja labirinta kod miševa WT starosti 3 i 12 mj., miševa hranjenih kuprizonom i *B4galnt1*12 mj.

*** Miševi hranjeni kuprizonom nasuprot *B4galnt1*12mj, tretirani sevofluranom**

5. 4. 2. Rezultati testa pasivnog izbjegavanja

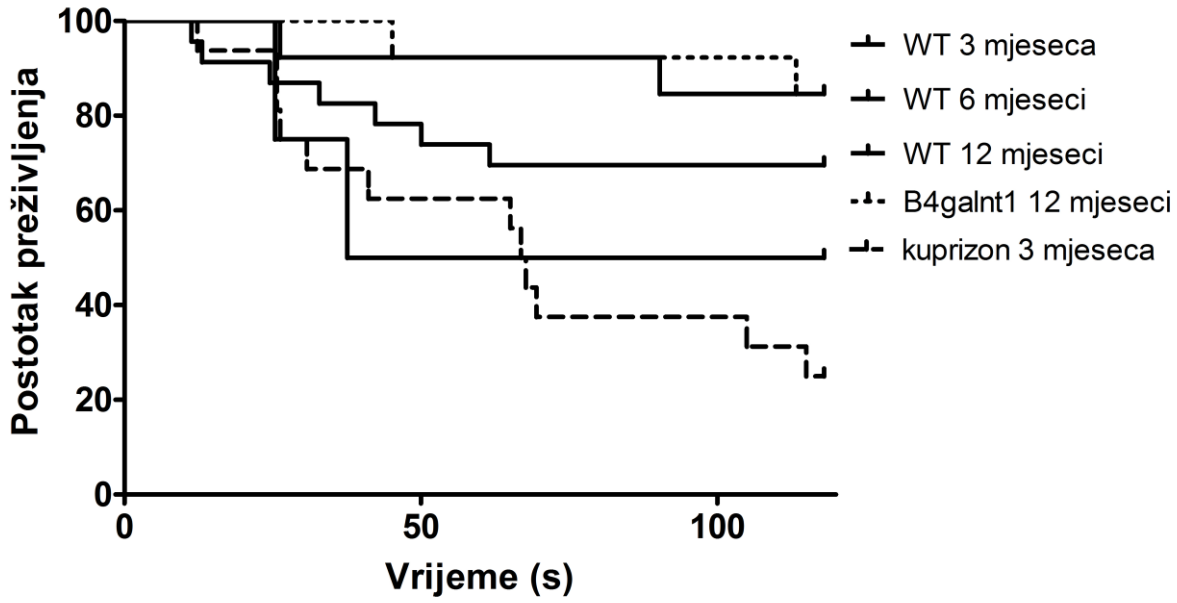
Kratkoročno pamćenje

Tijekom prvoga testiranja najdulje vrijeme zadržavanja u svijetloj komori, koje se smatra vremenom preživljenja, imaju WT miševi starosti 3 mjeseca i *B4galnt1* starosti 12 mjeseci iako razlika među grupama nije statistički značajna (Sl.5.15.). Rezultati su izraženi grafikonom koji prikazuje postotak preživljenja ispitivane skupine miševa ovisno o vremenu zadržavanja u svijetloj komori.



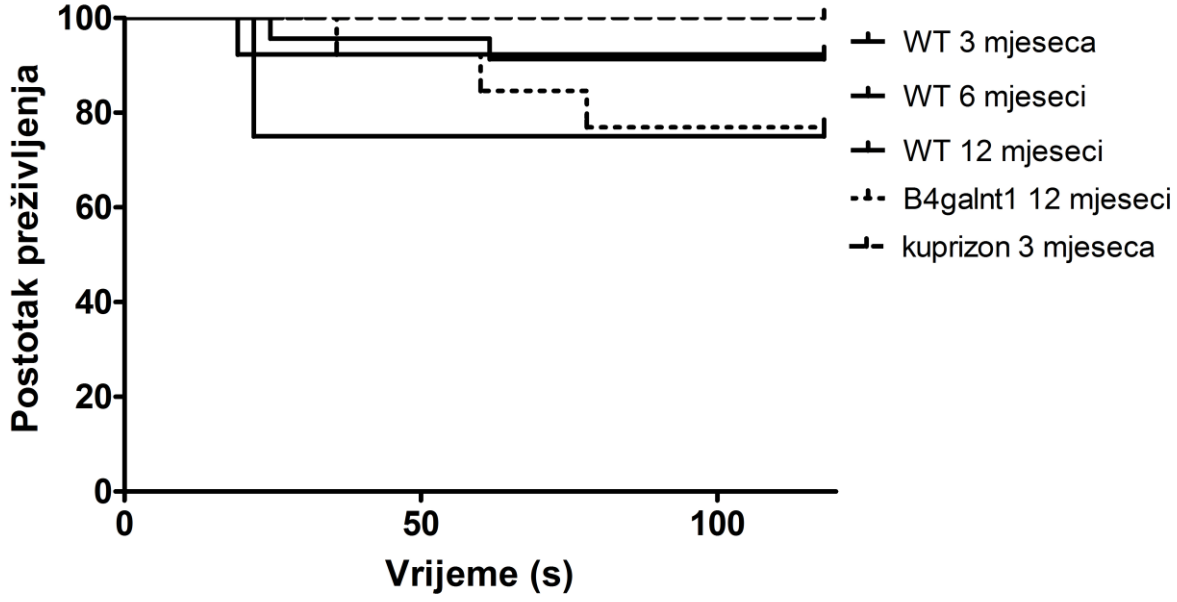
Slika 5.15 Rezultati testa pasivnog izbjegavanja vrijeme boravka u svijetloj komori (vrijeme preživljenja), tijekom prvog testiranja za miševe WT 3, 6 i 12 mj., miševe hranjene kuprizonom i *B4galnt1* miševe

Pri ponovljenom testiranju prije anestezije najdulje vrijeme zadržavanja u svijetloj komori imaju *B4galnt1* starosti 12 mjeseci i WT miševi starosti 6 mjeseci. WT miševi starosti 3 mjeseca imaju značajno dulje vrijeme zadržavanja u svijetloj komori od miševa hranjenih kuprizonom starosti 3 mjeseca (p=0,015). *B4galnt1* starosti 12 mjeseci imaju značajno dulje vrijeme zadržavanja u svijetloj komori od miševa hranjenih kuprizonom starosti 3 mjeseca (p=0,001), (Sl.5.16.).



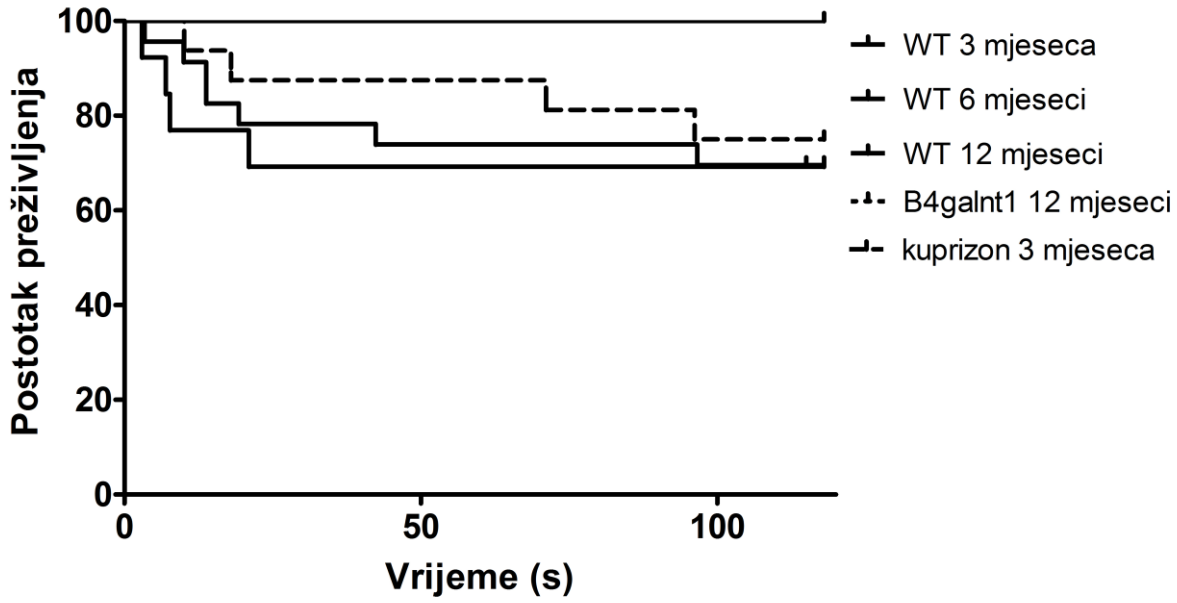
Slika 5.16 Rezultati testa pasivnog izbjegavanja, izraženi vremenom boravka u svijetloj komori-preživljenjem, prije anestezije

Nakon anestezije izofluranom miševi hranjeni kuprizonom imaju značajno duže vrijeme zadržavanja u svijetloj komori od *B4galnt1* miševa (p=0,045), (Sl. 5.17.).



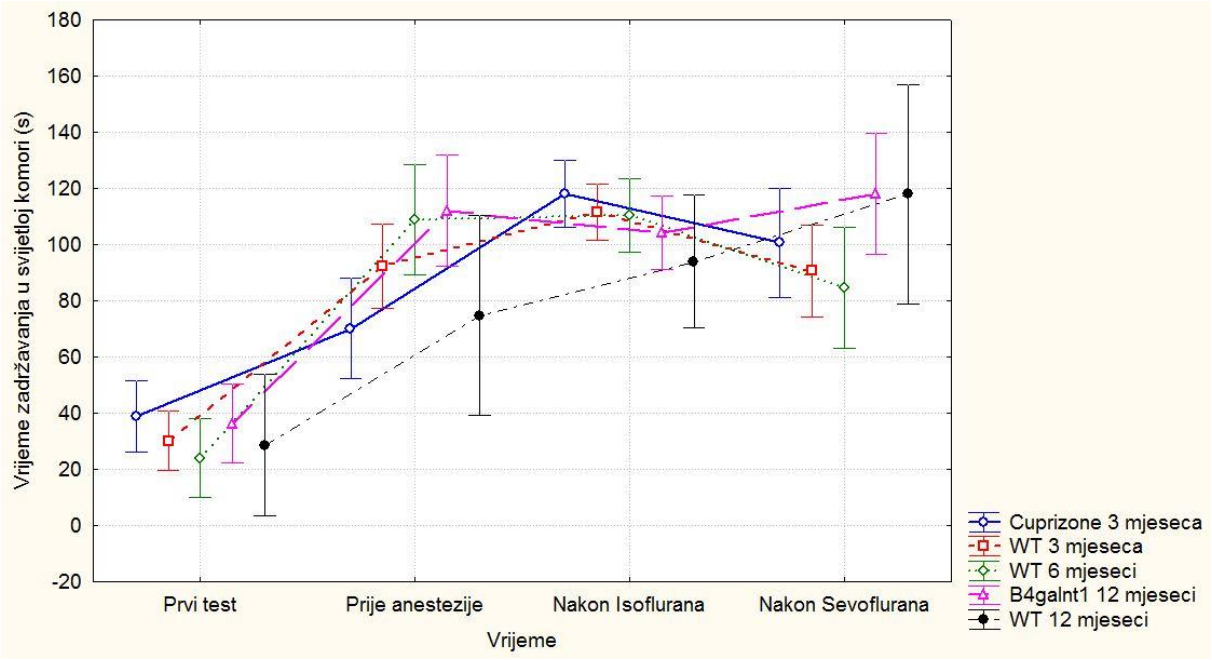
Slika 5.17 Rezultati testa pasivnog izbjegavanja, izraženi vremenom boravka u svijetloj komori-preživljenjem, nakon anestezije izofluranom

Nakon izlaganja sevofluranu *B4galnt1* imaju duže vrijeme zadržavanja u svijetloj komori od miševa hranjenih kuprizonom iako razlika nije statistički značajna, (Sl.5.18.).



Slika 5.18 Rezultati testa pasivnog izbjegavanja, izraženi vremenom boravka u svijetloj komori-preživljenjem, nakon anestezije sevofluranom

Postoji statistički značajna interakcija (vrijeme *x* grupa), razlika je većinom između prvog testiranja i naknadnih testiranja, (Sl.5.19.).

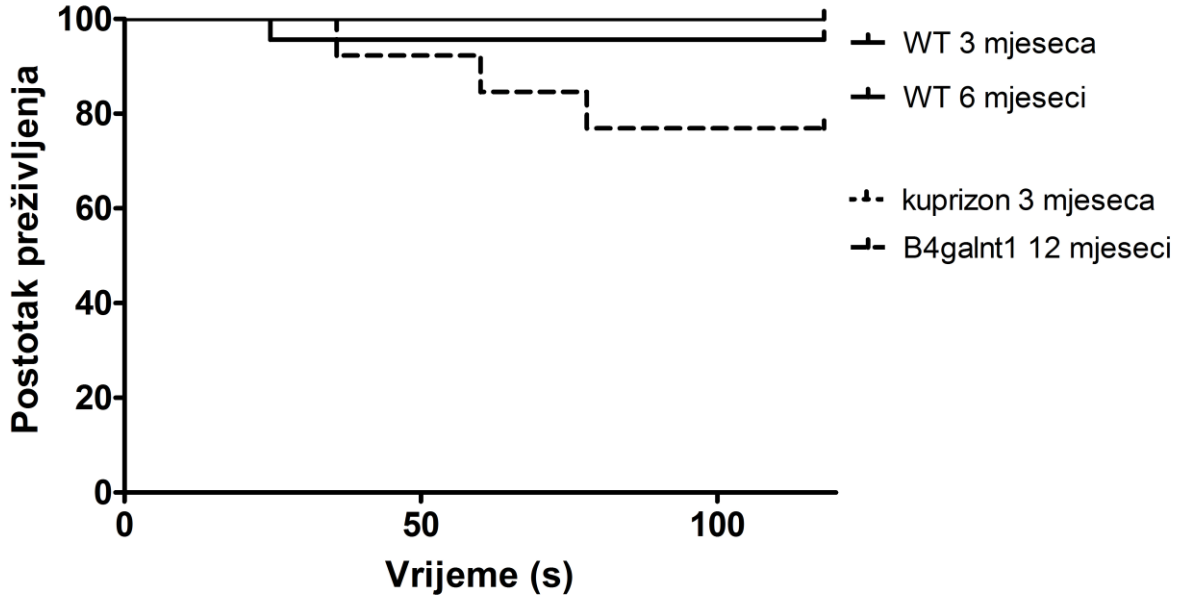


Slika 5.19 Kumulativni rezultati duljine zadržavanja u svijetloj komori za pet ispitivanih skupina analiziranih testom ANOVA, p=0,01235, vertikalne linij epretstavljaju 0,95 CI.

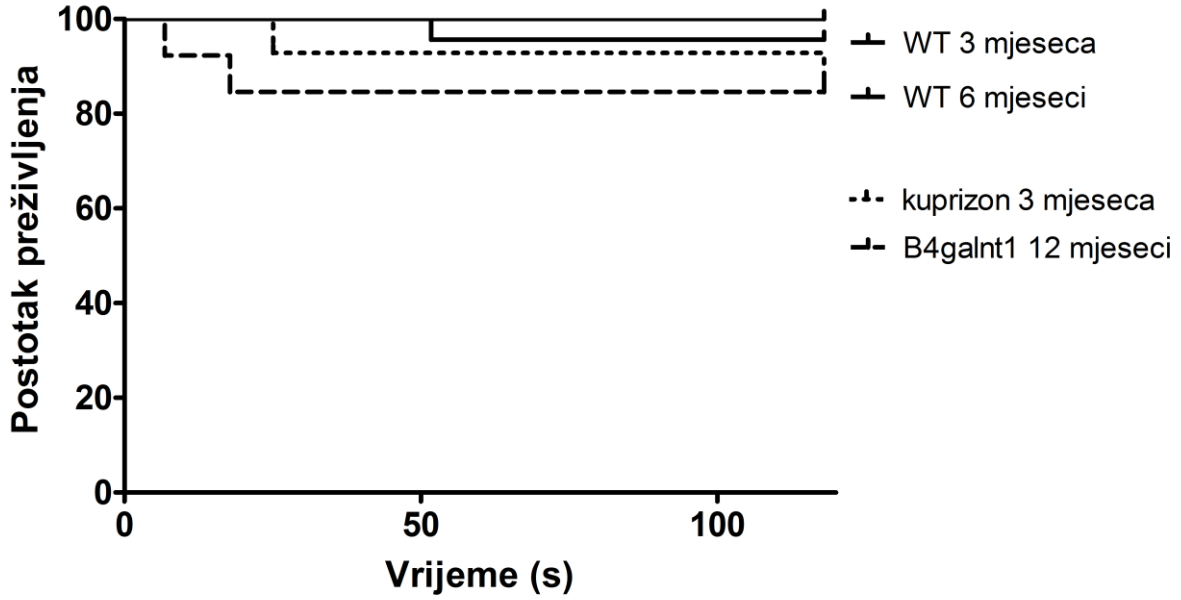
Dugoročno pamćenje

Prije izlaganja anesteziji WT miševi starosti 6 mjeseci i miševi hranjeni Kuprizonom imaju značajno dulje vrijeme zadržavanja u svijetloj komori od *B4galnt1* miševa starih 12 mjeseci (p=0,026), (Sl.5.20.).

Nakon anestezije izofluranom nema značajnih razlika među skupinama, (Sl.5.21.).

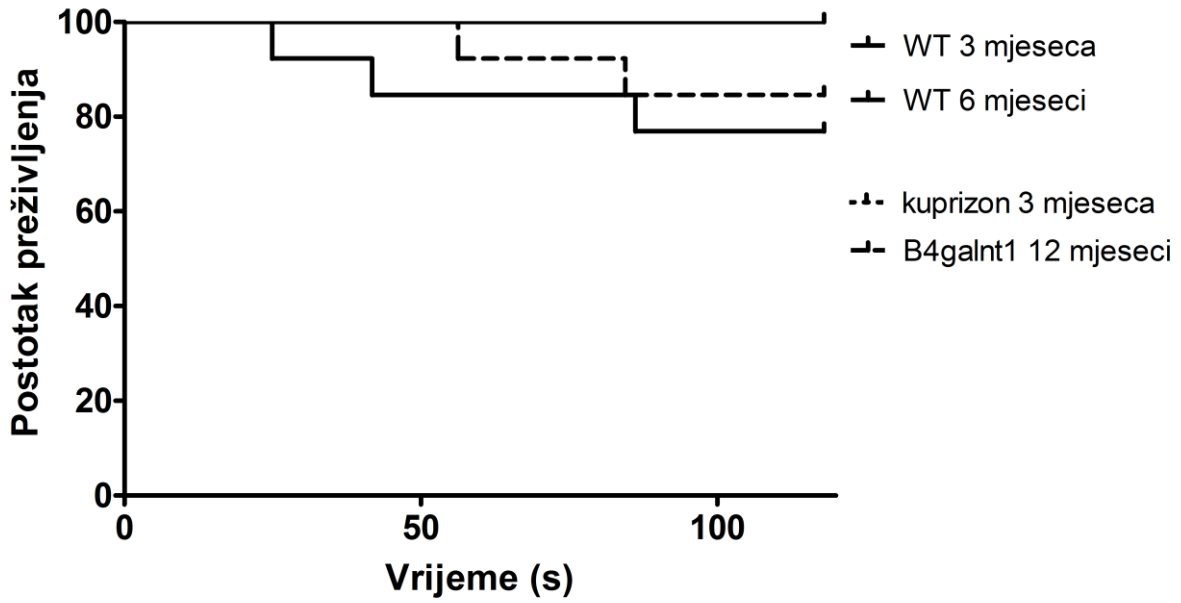


Slika 5.20 Rezultati testa pasivnog izbjegavanja izraženi vremenom boravka u svijetloj komori-preživljenjem, napravljeni u cilju ispitivanja dugoročnog pamćenja, prije anestezije



Slika 5.21 Rezultati testa pasivnog izbjegavanja izraženi vremenom boravka u svijetloj komori-preživljenjem, napravljeni u cilju ispitivanja dugoročnog pamćenja, nakon anestezije izofluranom

Nakon izlaganja sevofluranom WT miševi starosti 3 mjeseca i WT miševi hranjeni kuprizonom starosti 3 mjeseca imaju značajno dulje vrijeme zadržavanja u svijetloj sobi od WT miševa starosti 6 mjeseci (p=0,008), (Sl.5.22.).



Slika 5.22 Rezultati testa pasivnog izbjegavanja izraženi vremenom boravka u svijetloj komori-preživljenjem, napravljeni u cilju ispitivanja dugoročnog pamćenja, nakon anestezije sevofluranom

5. 5. Imunohistokemijska analiza markerima mijelina i protutjelima na gangliozide

Kako bi provjerili uspješnost tretmana kuprizonom na miševima divljeg tipa, uz pomoć markera za mijelin (protutijela antiMAG, antiMBP, antiCNPase) usporedili smo tretirane miševe s miševima divljeg tipa i miševima koji imaju isključeni gen *B4Galnt1*. Međusobno su uspoređene životinje stare godinu dana. Na slikama su reprezentativni primjeri rezova mozga miševa odgovarajuće dobi. Rezultati na slikama nisu kvantificirani jer su razlike dramatične za specifična protutijela, a najveće razlike nisu u intenzitetu bojenja već u distribuciji pa su u komentarima narednih slika posebno naglašene razlike u distribuciji.

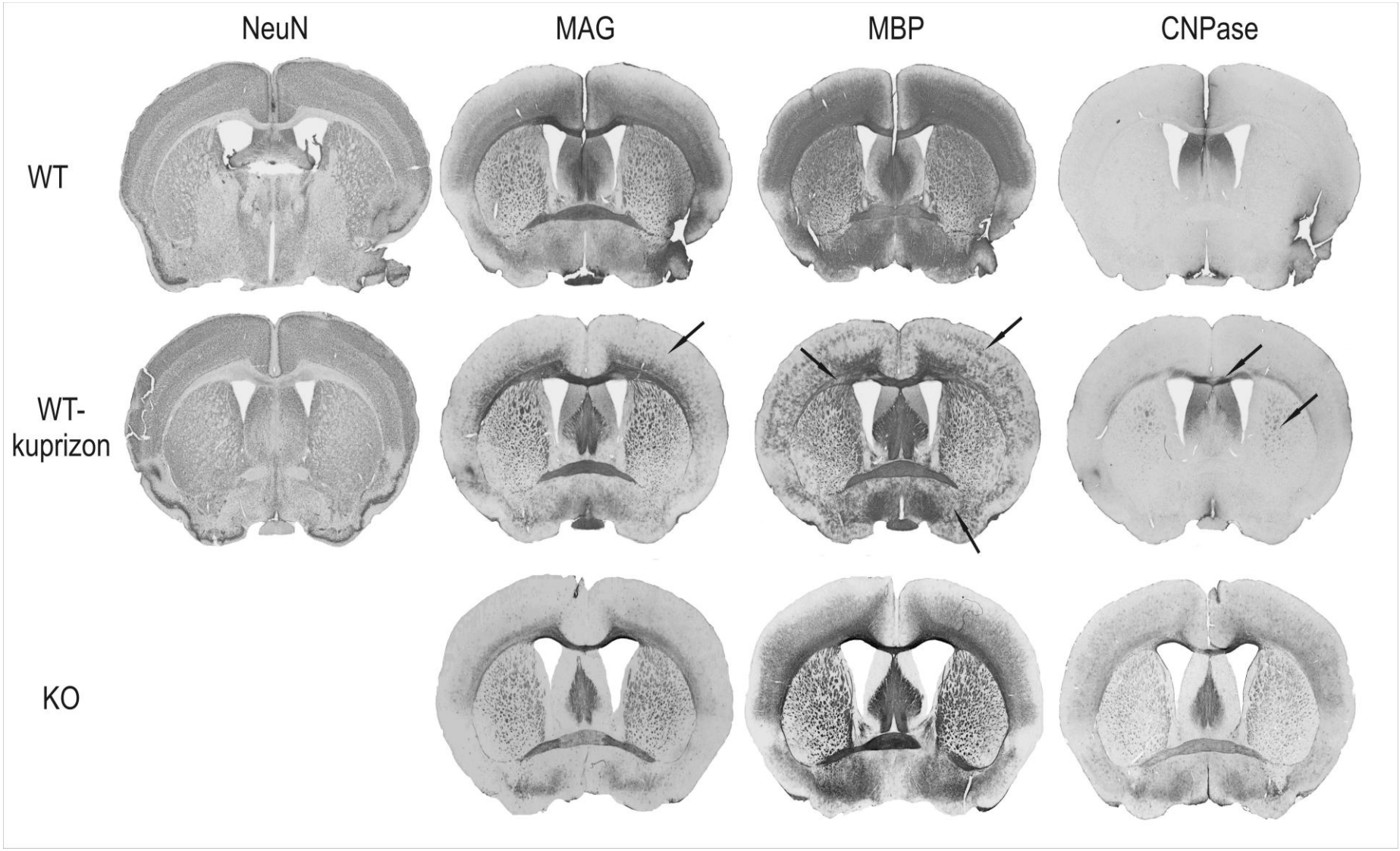
Na slici 5.23. su koronarni rezovi prednjeg mozga na razini prednje komisure. Sva tri upotrijebljena protutijela, antiMAG, antiMBP i antiCNPase prepoznaju epitop na oligodendrocitima. Dva protutijela su tipična za zrele oligodendrocite (antiMAG i antiMBP) dok treće (antiCNPase) prikazuje oligodedrocite u ranijoj fazi zrelosti. Protein CNPase može poslužiti za procjenu kapaciteta regeneracije. Protein se gubi u zrelim oligodendrocitima u kojima je došlo do kompakcije mijelina. Epitopi dvaju protutijela za zrele oligodendrocite, proteini MAG i MBP, također nisu na istom mjestu, naime MAG se nalazi samo na membrani oligodendrocita koja je u direktnoj apoziciji s aksonom i nema ga na kompaktnom mijelinu, dok je MBP prisutan u kompaktiranom mijelinu.

Na slici 5.23. vidi se kako najmanji sadržaj proteina MAG imaju *B4Galnt1* miševi kao što je od prije opisano u literaturi (106). Miševi tretirani kuprizonom također gube ekspresiju MAG proteina osobito u srednjim slojevima korteksa (usporediti s markerom antiNeuN koji pokazuje distribuciju jezgara neurona i pomaže pri utvrđivanju kortikalnih lamina), a nešto manje u velikim snopovima vlakana kao što je *corpus callosum* i *commisura anterior*. Dramatične promjene vide se u ekspresiji proteina MBP. Kompaktni mijelin nedostaje u slojevima korteksa od II-V. Najdublji , VI sloj, te djelomice V, imaju očuvanu mijelinizaciju jer se radi o najdebljim mijelinskim ovojnicama projekcionih vlakana. Vrlo sličan fenomen, ali znatno blažeg obima, vidi se i u mozgu *B4Galnt1*.

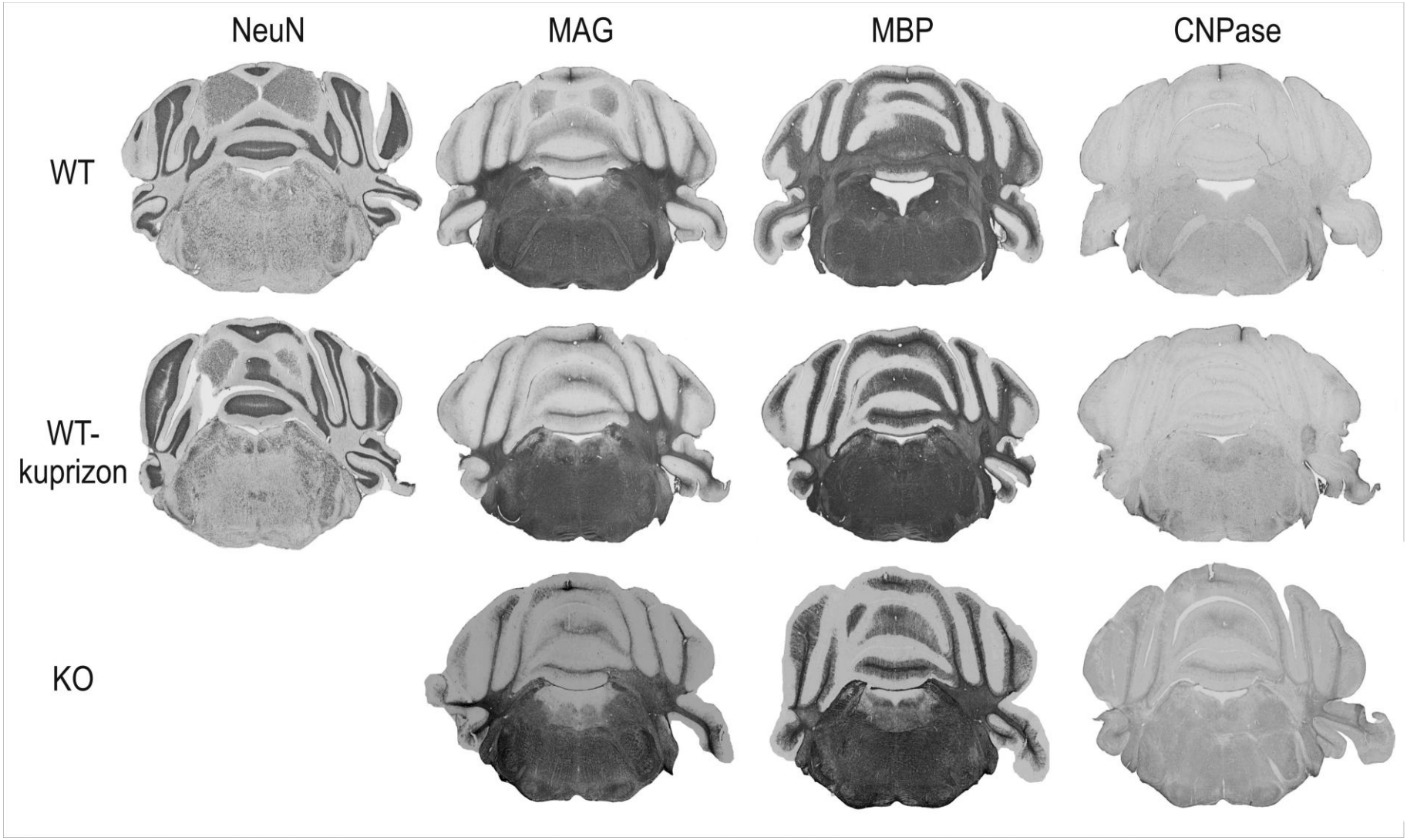
Protein CNPaza je slabo eksprimiran u mozgu miševa divljeg tipa, ekspresija mu raste kod miševa tretiranih kuprizonom, osobito u velikom snopu komisuralnih vlakana *corpus callosum* koji je glavna trasa migracije adultnih matičnih stanica oligodendroglije. Fenomen porasta ekspresije CNPaze osobito je dobro vidljiv u mozgu *B4Galnt1* i to u svim slojevima korteksa i komisurama. Razlika između mozga tretiranog kuprizonom i *B4Galnt1* postoji i radi toga što miševi tretirani kuprizonom nisu imali period oporavka od kuprizona u kojemu bi se jače pokrenuo proces oligodendrogeneze. Za razliku od prednjeg mozga, stražnji mozak

pokazuje značajno manji učinak kuprizona na vlakna koja ulaze ili izlaze iz malog mozga ili prolaze kroz strukture moždanog debla
(slika 5.24). Indirektno učinak demijelinizacije na aksone može se pratiti upotrebom markera za fosforilaciju neurofilamenata (slika 5.25). Protutijelo SMI 311 usmjereno je na nefosforilirane neurofilamente i označava nemijelinizirana ili slabo mijelinizirana vlakna, dok protutijelo SMI 312 prepoznaje visoko fosforilirani epitop na neurofilamentima i zato označava dobro mijelinizirana vlakna (107).

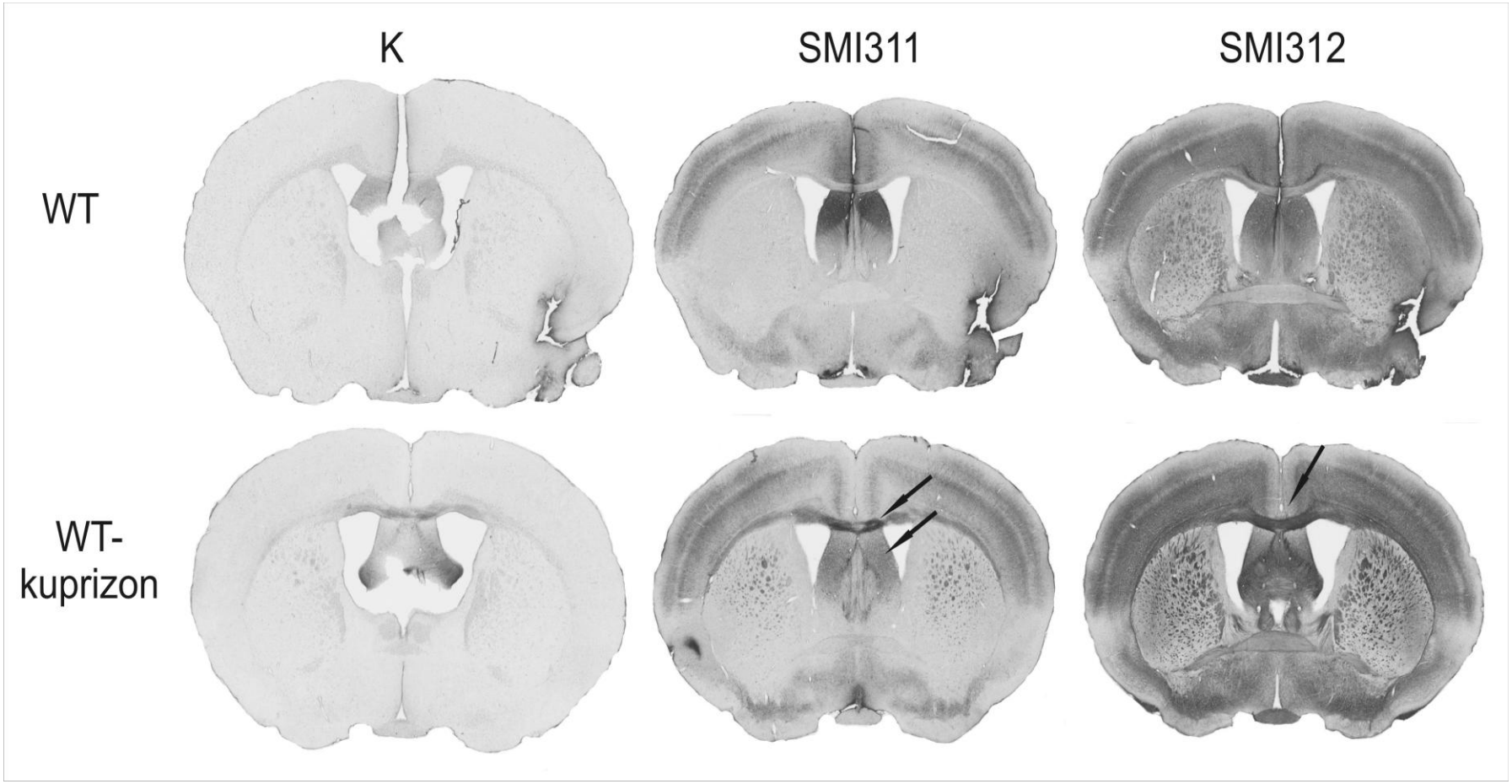
Na slici 5.25 vidi se kako miševi tretirani kuprizonom imaju veći broj nemijeliniziranih vlakana označenih uz pomoć antiSMI 311. Porast je posebno uočljiv u snopu vlakana *corpus calosum*, ali i slojevima korteksa od II-VI. Mada je u radu Ulfiga i suradnika protutijelo SMI 312 korišteno za označavanje mijeliniziranih aksona, naš rezultat pokazuje kako je ovo pan-aksonski marker svih skupina aksona, kao što je navedeno u brošuri proizvođača: (*http://resource.covance.com/pdf/2008-smi-sumopdf.pdf*), a za što vidimo dokaze u ekspresiji ovog epitopa u strukturi *corpus calosum*. S obzirom da smo i ovim markerom zabilježili povećanje ukupne ekspresije u prednjem mozgu kod miševa tretiranih kuprizonom, pretpostavljamo kako se radi i o mogućoj aberantnoj aksogenezi koja se pojavljuje tijekom demijelinizacije.



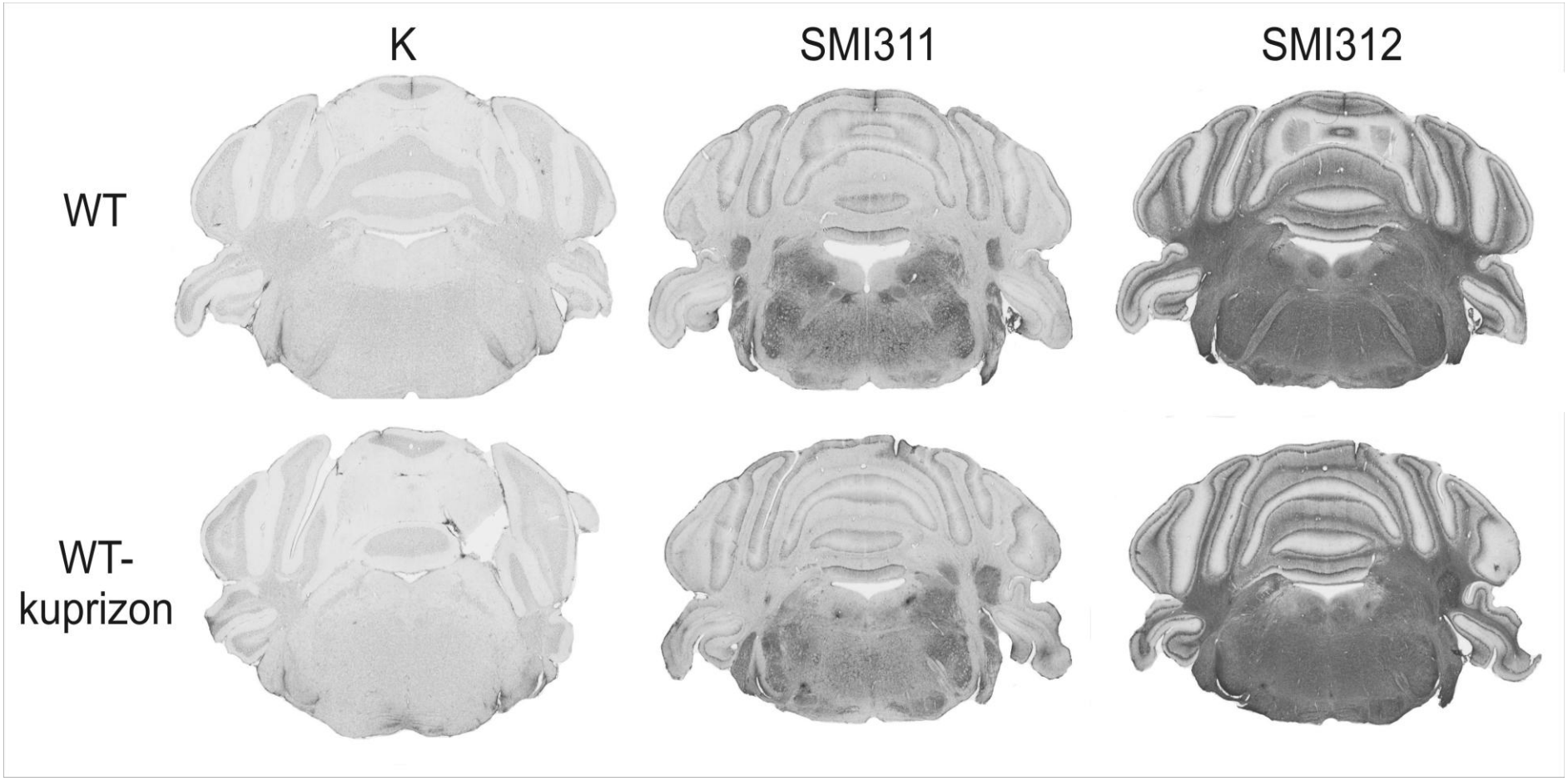
Slika 5.23 Imunohistokemijski prikaz distribucije markera jezgara (anti NeuN) i molekula koje su marker mijelina (antiMAG, antiMBP i anti CNPase) u mozgu miša divljeg tipa (WT), miša tretiranog kuprizonom (WT-kuprizon) i *B4Galnt1* (KO) miša na koronarnim rezovima prednjeg mozga. Strelice pokazuju mjesta najvećih razlika u distribuciji pojedinih markera



Slika 5.24 Imunohistokemijski prikaz distribucije markera jezgara (anti NeuN) i molekula koji su marker mijelina (antiMAG, antiMBP i anti CNPaze) u mozgu miša divljeg tipa (WT), miša tretiranog kuprizonom (WT-kuprizon) i *B4Galnt1* (KO) miša na koronarnim rezovima malog mozga



Slika 5.25 Imunohistokemijski prikaz distribucije markera fosforilacije neurofilamenata u mozgu miša divljeg tipa (WT) i miša tretiranog kuprizonom (WT-kuprizon) na koronarnim rezovima prednjeg mozga. Marker nemijeliniziranih aksona (antiSMI 311) prikazan je pored općeg markera aksona s različitom fosforilacijom neurofilamenata (SMI 312), a oba su uspoređena s kontrolnim rezovima (K) na kojima se vidi razina nespecifičnog vezanja sekundarnog protutijela. Strelica pokazuje izrazite promjene u bojenju c*omisure corpus calosum*.



Slika 5.26 Imunohistokemijski prikaz distribucije markera fosforilacije neurofilamenata u mozgu miša divljeg tipa (WT) i miša tretiranog kuprizonom (WT-kuprizon) na koronarnim rezovima malog mozga. Marker nemijeliniziranih aksona (antiSMI 311) prikazan je pored općeg markera aksona s različitom fosforilacijom neurofilamenata (SMI 312), a oba su uspoređena s kontrolnim rezovima (K) na kojima se vidi razina nespecifičnog vezanja sekundarnog protutijela

Dodatni dokaz kako demijelinizacija više zahvaća prednji nego stražnji mozak, na kojoj su protutijelima SMI 311 i SMI 312 označeni koronarni rezovi malog mozga miševa divljeg tipa i miševa tretiranih kuprizonom vidi se na slici (slika 5.26).

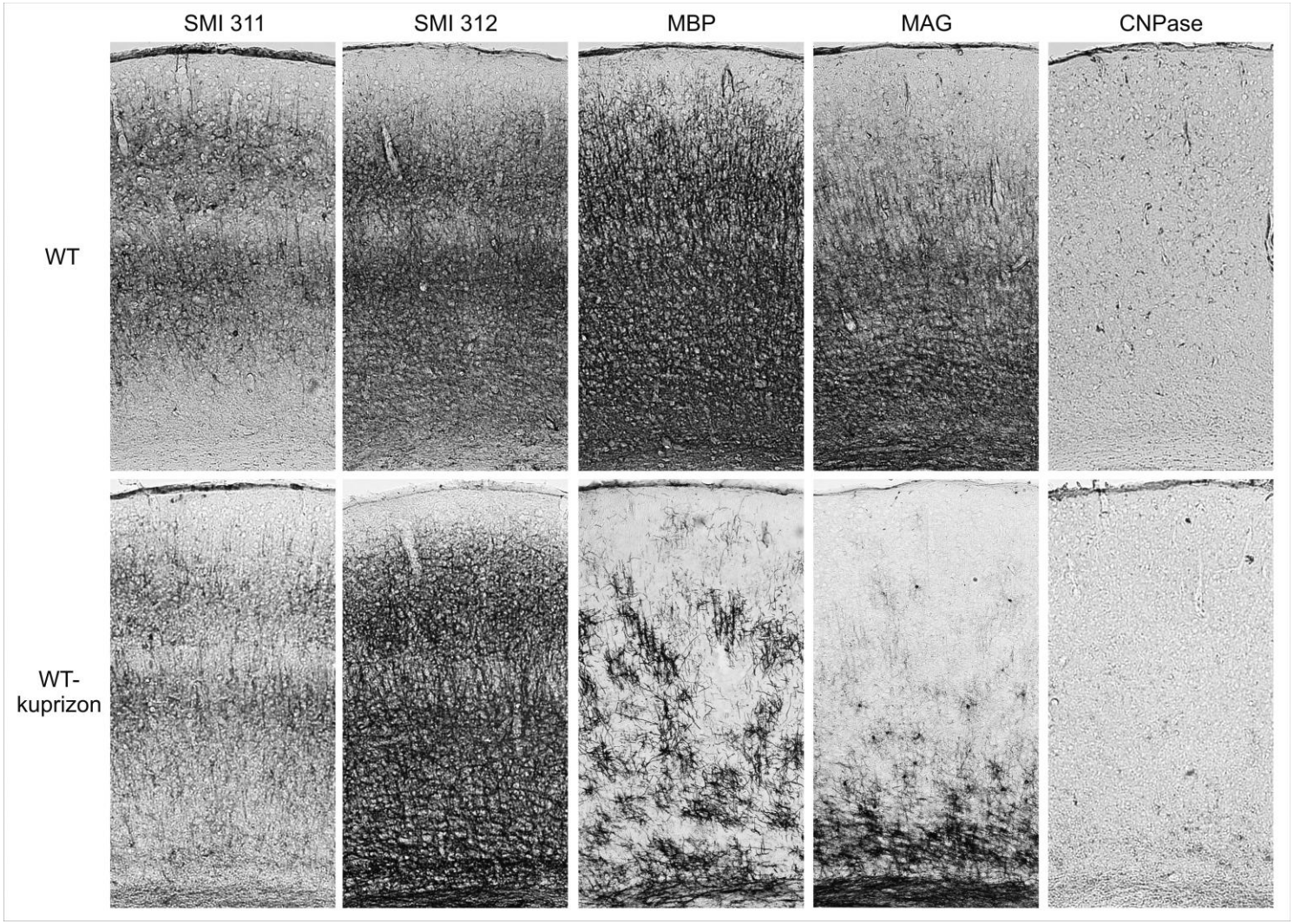
Kako bi smo dodatno razjasnili slijed demijelinizacije izazvane kuprizonom, na slikama 5.27 do 5.31 prikazana su povećanja struktura prednjeg i stražnjeg mozga, poredana slijedom od onih koje su najviše zahvaćene demijelinizacijom (korteks moždanih hemisfera, slika 5.30) do onih koje su najmanje zahvaćene demijelinizacijom (korteks malog mozga, slika 5.31).

Na slici 5.27 je prikaz šestoslojnog korteksa miševa divljeg tipa i miševa tretiranih kuprizonom označenog markerima za fosforilaciju neurofilamenata aksona (antiSMI 311 i anti SMI 312) te markerima mijelinizacije (antiMAG, antiMBP i antiCNPase). Najdramatičnije promjene vide se markerima mijelinizacije; homogena ekspresija MBP od II-VI sloja korteksa kod miševa divljeg tipa zamijenjena je fokalnom ekspresijom istog epitopa u miševa tretiranih kuprizonom; ekspresija proteina MAG od homogene postaje ograničena samo na V i VI sloj.

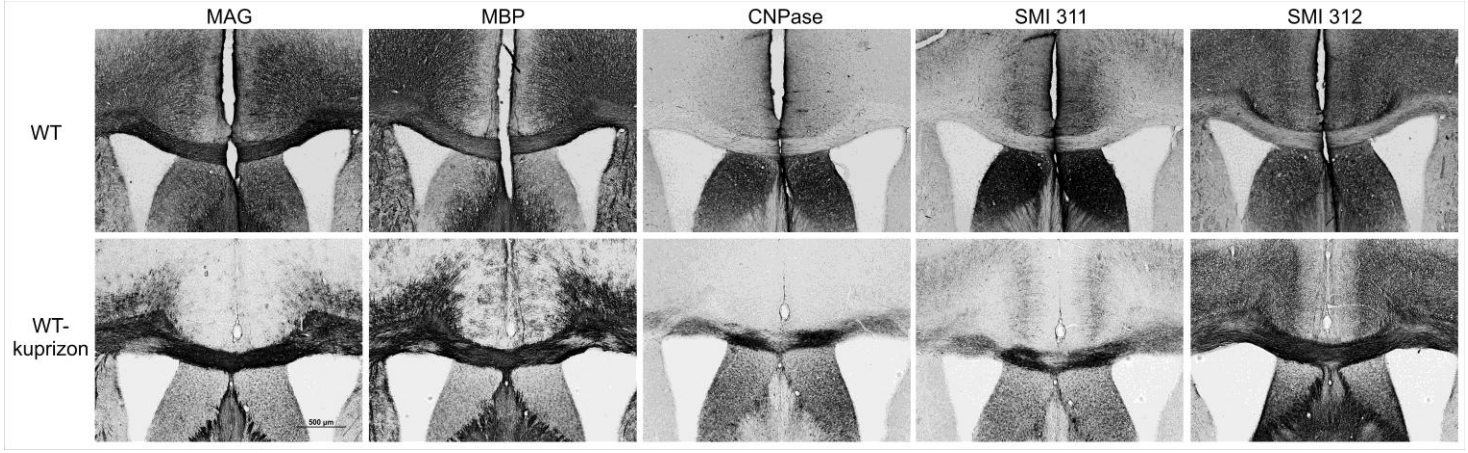
Slijedeća struktura u kojoj se vide dramatične promjene kako na aksonima tako i na oligodendrocitima je *corpus calosum* (slika 5.28). Kuprizon izaziva povećanje ekspresije epitopa antiSMI 311 koji se pojavljuje u središtu snopa komisuralnih vlakana. Povećanje ekspresije epitopa antiSMI 312 u tretiranih miševa vjerojatno je vezano najviše uz pojavu nemijeliniziranih vlakana u komisuri. Ekspresija MBP mijenja se od homogene u netretiranih životinja u fokalni nedostatak bojenja kod tretiranih kuprizonom, te se pojavljuje reaktivnost na CNPase u cijelom komisuralnom snopu.

Sljedeća struktura na kojoj se vide promjene u mijelinizaciji izazvane kuprizonom je prednja komisura. I ova struktura sadržava komisuralna vlakna, ali su promjene nešto drugačije nego u slučaju komisure *corpus calosum*. U prednjoj komisuri niti kod tretiranih niti kod ne tretiranih životinja nema reaktivnosti na nefosforilirani neurofilament (antiSMI 311). Kako se značajnije promjene ne vide niti s markerima antiSMI 312 i antiMBP naša je pretpostavka da se radi o najbolje mijeliniziranim aksonima koji najkasnije doživljavaju demijelinizaciju pod utjecajem kuprizona.

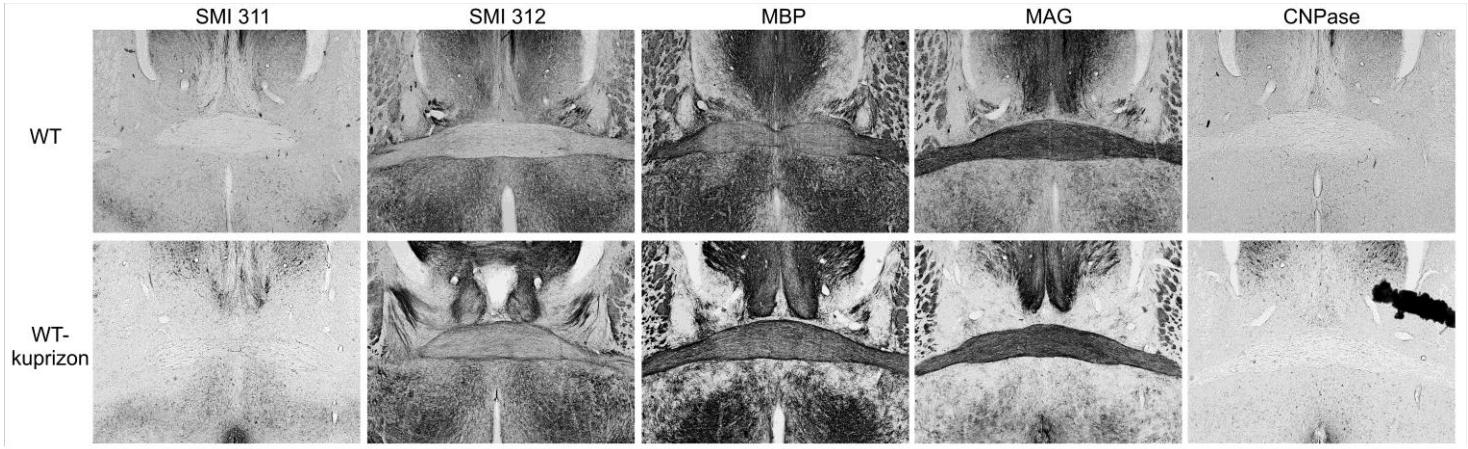
Na povećanjima srednjeg cerebelarnog pedunkula uočili smo najmanje promjene mijelinizacije pod utjecajem kuprizona (slika 5.30). Kako se radi o masivnom snopu vlakana koja su izrazito dobro mijelinizirana ovaj rezultat ustvari ne iznenađuje.



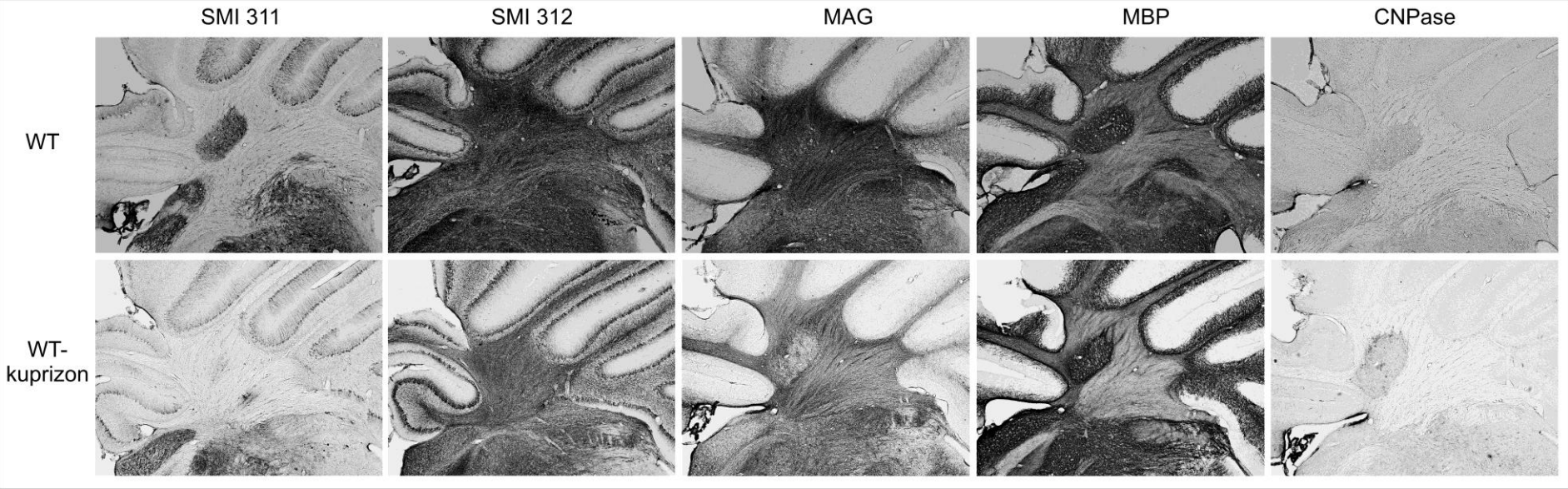
Slika 5.27 Imunohistokemijski prikaz distribucije markera fosforilacije neurofilamenata (antiSMI 311 i antiSMI 312) i markera mijelinizacije (antiMAG, antiMBP i antiCNPase) u mozgu miša divljeg tipa (WT) i miša tretiranog kuprizonom (WT-kuprizon) na koronarnim rezovima korteksa miša divljeg tipa i miša tretiranog kuprizonom. Povećanja su snimljena s ukupnim povećanjem objektiva i okulara od 50x.



Slika 5.28 Imunohistokemijski prikaz distribucije markera fosforilacije neurofilamenata (antiSMI 311 i antiSMI 312) i markera mijelinizacije (antiMAG, antiMBP i antiCNPase) u mozgu miša divljeg tipa (WT) i miša tretiranog kuprizonom (WT-kuprizon) na koronarnim rezovima miša divljeg tipa i miša tretiranog kuprizonom na razini *corpus calosum*. Povećanja su snimljena s ukupnim povećanjem objektiva i okulara od 50x. Strelice pokazuju fokalni nedostatak bojenja markerom antiMBP u miševa tretiranih kuprizonom.



Slika 5.29 Imunohistokemijski prikaz distribucije markera fosforilacije neurofilamenata (antiSMI311 i antiSMI312) i markera mijelinizacije (antiMAG, antiMBP i antiCNPase) u mozgu miša divljeg tipa (WT) i miša tretiranog kuprizonom (WT-kuprizon) na koronarnim rezovima miša divljeg tipa i miša tretiranog kuprizonom na razini *prednje komisure*. Povećanja su snimljena s ukupnim povećanjem objektiva i okulara od 50x.

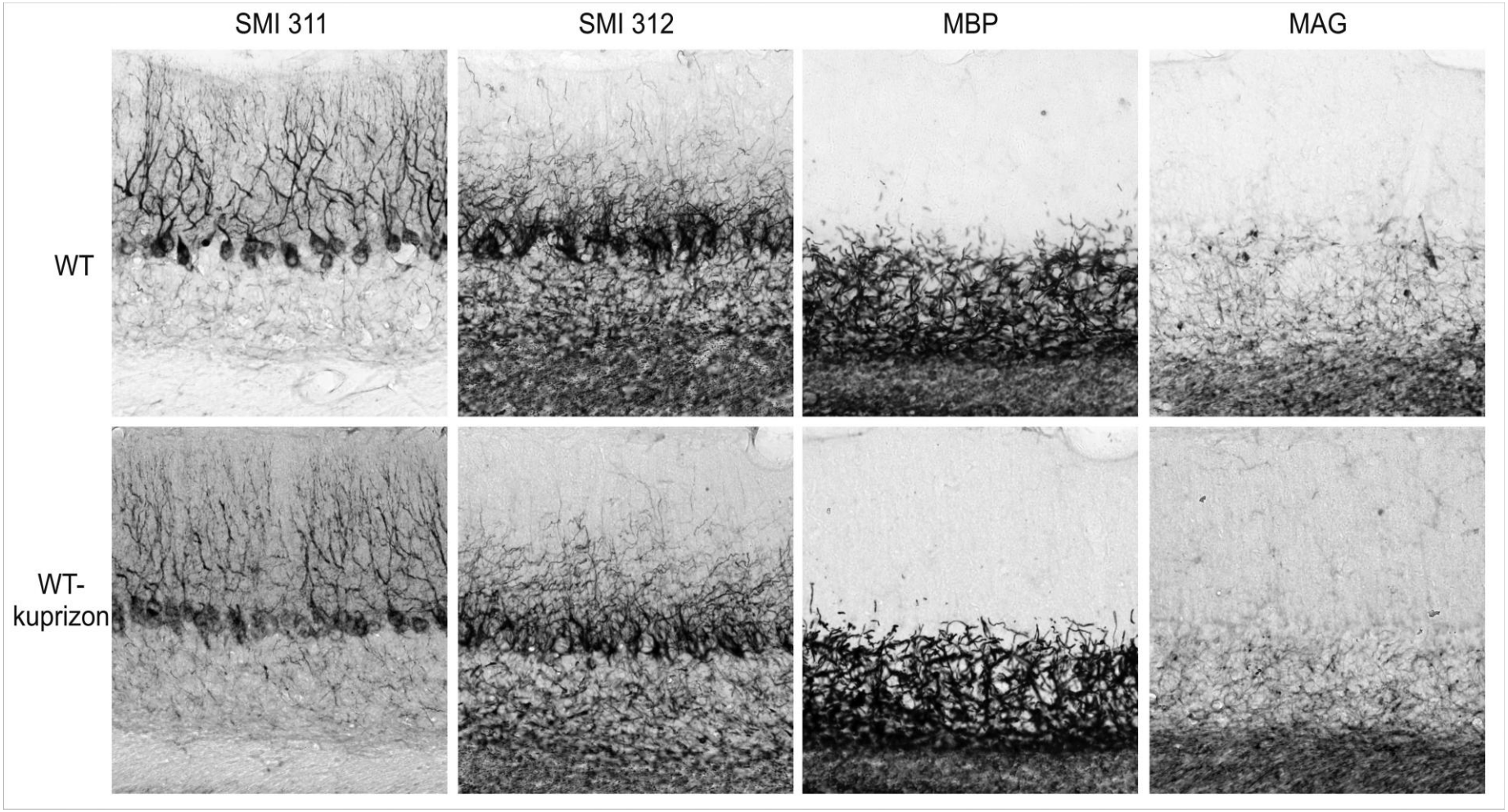


Slika 5.30 Imunohistokemijski prikaz distribucije markera fosforilacije neurofilamenata (antiSMI311 i antiSMI312) i markera mijelinizacije (antiMAG, antiMBP i antiCNPase) u mozgu miša divljeg tipa (WT) i miša tretiranog kuprizonom (WT-kuprizon) na koronarnim rezovima miša divljeg tipa i miša tretiranog kuprizonom na rezovima malog mozga u razini srednjeg pedunkula. Povećanja su snimljena s ukupnim povećanjem objektiva i okulara od 50x.

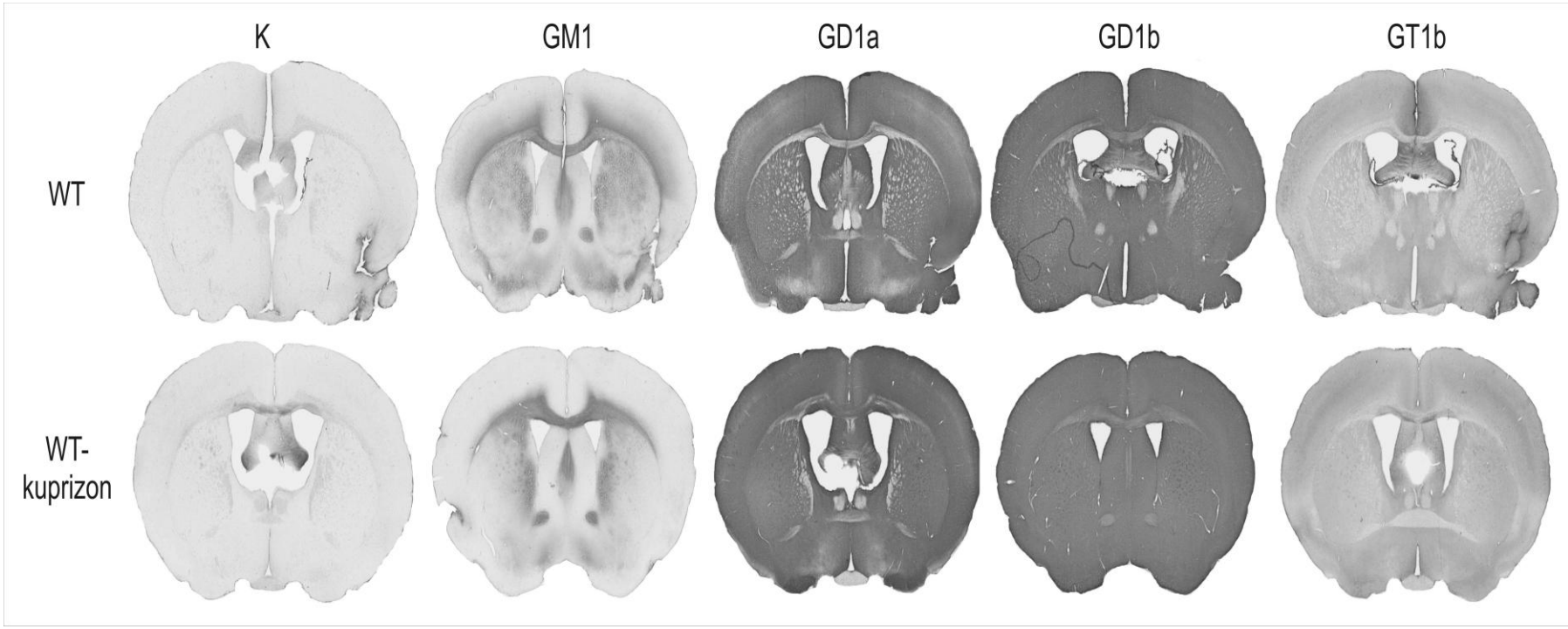
Mada nismo očekivali promjene u ekspresiji markera filamenata i mijelina u korteksu malog mozga one su ipak prisutne u sloju granularnih neurona koji ima povećanu reaktivnost na antiSMI311 (slika 5.31.). Drugi markeri nisu uočljivo promijenjeni, ali promjene u reaktivnosti SMI311 govore u prilog promjene barem u jednom dijelu vlakana koja prolaze kroz granularni sloj malog mozga.

Osim što smo provjerili stupanj demijelinizacije izazvan tretmanom s kuprizonom, također smo provjerili jeli ovaj tretman na bilo koji način promijenio distribuciju gangliozida. Na slici 5.32. je imunohistokemija koronarnih rezova prednjeg mozga miševa divljeg tipa i onih tretiranih kuprizonom označenih protutijelima na četiri najzastupljenija gangliozida mozga (GM1, GD1a, GD1b i GT1b) koji nedostaju kod *B4Galnt1* miša. Opća distribucija za sva četiri protutijela je praktično ista kako u prednjem mozgu (slika 5.32) tako i u malom mozgu (slika 5.33.).

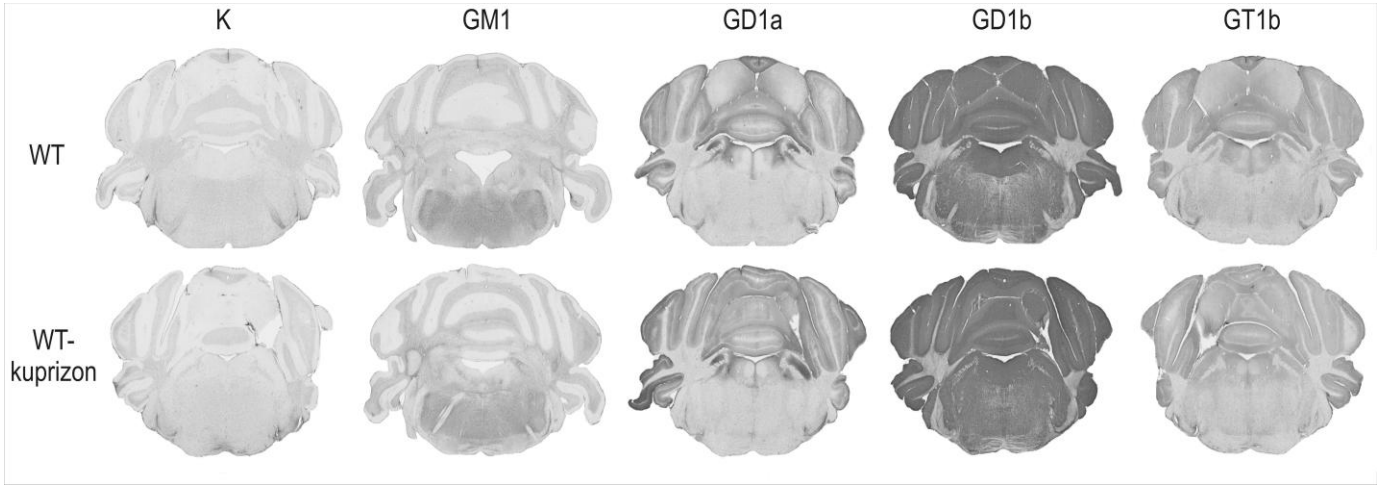
Pa ipak, u distribuciji gangliozida vidimo promjenu kod miša tretiranog kuprizonom koja je najbolje uočljiva u snopu komisuralnih vlakana *corpus calosum*. Prema objavljenim radovima (108, 109, 110) u ovoj strukturi životinja divljeg tipa nepostoji reaktivnost na GD1a i GT1b, dok ju mi nalzimo u životinja hranjenih kuprizonom. Oba ova gangliozida su dobro opisani receptori za MAG. U prethodnim radovima postavljena je pretpostavka kako na snopovima dobro mijeliniziranih aksona nema GD1a niti GT1b zahvljujući nedostupnosti epitopa kojega bi bilo moguće prikazati samo upotrebom detergenta. Kako prilikom upotrebe detergenata dolazi do pojave artefakata i premještanja gangliozida ovo nije bilo moguće dokazati. Demijelinizacija kuprizonom epitop čini dostupnim i na povećanjima strukture *corpus calosuma* se dobro vidi kako su GD1a i GT1b stvarno prisutni na aksonima komisuralnih vlakana (slika 5.34.).



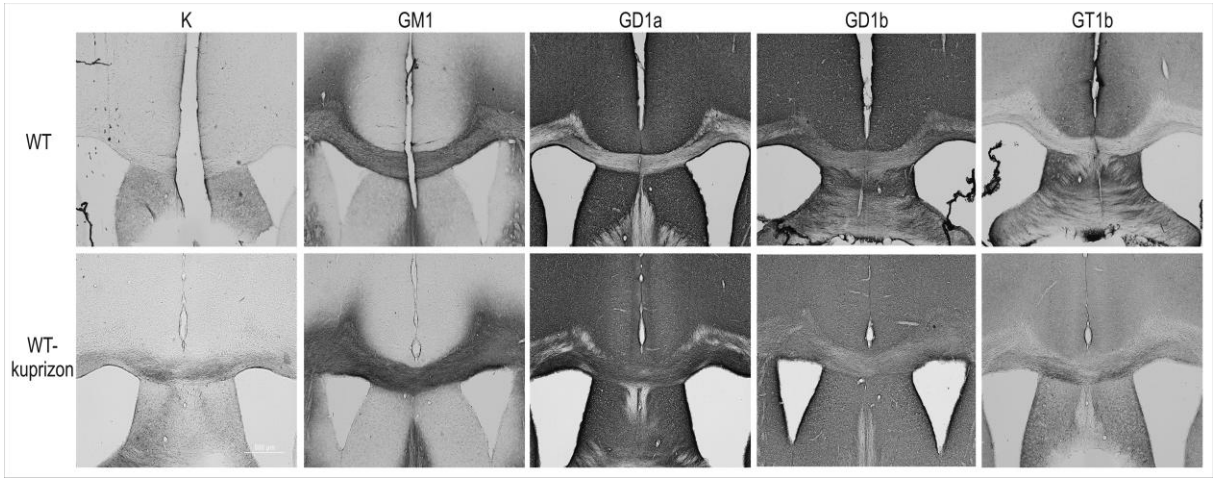
Slika 5.31 Imunohistokemijski prikaz distribucije markera fosforilacije neurofilamenata (antiSMI311 i antiSMI312) i markera mijelinizacije (antiMAG, antiMBP i antiCNPase) u mozgu miša divljeg tipa (WT) i miša tretiranog kuprizonom (WT-kuprizon) na koronarnim rezovima miša divljeg tipa i miša tretiranog kuprizonom na rezovima korteksa malog mozga. Povećanja su snimljena s ukupnim povećanjem objektiva i okulara od 50x.



Slika 5.32 Imunohistokemijski prikaz distribucije gangliozida (GM1, GD1a, GD1b i GT1b) u mozgu miša divljeg tipa (WT) i miša tretiranog kuprizonom (WT-kuprizon) na koronarnim rezovima prednjeg mozga.



Slika 5.33 Imunohistokemijski prikaz distribucije gangliozida (GM1, GD1a, GD1b i GT1b) u mozgu miša divljeg tipa (WT) i miša tretiranog kuprizonom (WT-kuprizon) na koronarnim rezovima malog mozga.



Slika 5.34 Imunohistokemijski prikaz distribucije gangliozida (GM1, GD1a, GD1b i GT1b) u mozgu miša divljeg tipa (WT) i miša tretiranog kuprizonom (WT-kuprizon) na koronarnim rezovima prednjeg mozga u razini *corpus calosum*. Strelice pokazuju pojavu reaktivnosti protutijela antiGD1a i antiGT1b na aksonima komisuralnih vlakana kod životinja tretiranih kuprizonom.

6. RASPRAVA

Hlapljivi anestetici se godinama primjenjuju u kliničkoj praksi, ali mehanizam njihovog djelovanja nije još dovoljno poznat. Brojne su hipoteze koje pretpostavljaju mjesta njihovog djelovanja.

Postoji realna mogućnost da se prilikom postizanja stanja opće anestezije inducira fiziološki proces. *Oleamid* je lipid, amid oleinske kiseline koji inducira san. Ova endogena tvar nakuplja se tijekom spavanja u cerebrospinalnom likvoru. Prvi puta je izolirana iz likvora mačaka deprimiranih snom. Vjerojatno ova tvar, kao endogeni ligand, ima dovoljni kapacitet da modulira $GABA_A$ receptor i učestvuje u depresiji mozga sisavaca, što je upravo model nalik djelovanju anestetika (111).

Iako je postojala tvrdnja o učinku anestetika na promjenu fluidnosti membrane, u pokusima u kojima je primjenjivana koncentracija HA za koju se očekivalo da je stvarno prisutna tijekom uvoda u anesteziju, nije dokazana ova tvrdnja. To je navelo na pretpostavku da HA utječu na specijalizirane lipidne strukture u blizini membranskih proteina, odnosno da umjesto djelovanja na same proteine HA djeluju na dijelove membrane oko relevantnih proteina. Prema navedenoj pretpostavci HA bi se u trenutku ulaska u stanicu ponašali poput signalnih molekula topivih u membrani koje mijenjaju okolinu membranskog proteina i poput klasičnih alosteričnih regulatora utječu na konformaciju proteina (112).

Do sada se došlo do spoznaje (Campagna, Miller i Forman) da se molekularni mehanizam hlapljivih anestetika ispoljava kroz agonističko djelovanje na $GABA_A$ i glicinske receptore, kao i antagonističko djelovanje na nikotinske acetilkolinske, AMPA i NMDA receptora (113). Također poznat je učinak anestetika na sinaptičku transmisiju što je opisano kao depresija CA1 piramidalnih neurona hipokampalne regije miševa izlaganih anesteticima (114).

U novije vrijeme vjeruje se kako lipidne signalne domene ispunjavaju sve uvijete za funkcionalne mete hlapljivih anestetika. Dokaz tome su radovi (Morgan i Sedensky) koji su na oblić, *C. Elegans*, potvrdili promjene koje nastaju u preraspodjeli i aktiviranju proteina *UNC-1* i *UNC-24 (stomatin)* kao esencijalnih elemenata u strukturi lipidnih splavi i determinaciji osjetljivosti lipidnih signalnih domena na hlapljive anestetike (12,13,15, 115).

Testiranjem vremena potrebnog za uvod u anesteziju i buđenja iz anestezije uočili smo da je potrebno dulje vrijeme uvoda kod WT miševa starosti 3 i 12 mjeseci u odnosu na WT miševe starosti 6 mjeseci. Također, uočili smo da je WT miševima 3 i 12 mjeseci potrebno kraće vrijeme buđenja iz anestezije nego li WT miševima starosti 6 mjeseci. Poznavajući dinamiku ekspresije gangliozida ovisno o starosti da se količina starenjem smanjuje, a u srednjoj dobi doživljava pik, moguće je da djelovanje hlapljivih anestetika prati tu dinamiku i o njoj

indirektno ovisi (116,117). Ne može se isključiti niti mogućnost da uvođenje u anesteziju ima veze s količinom intrakortikalnog mijelina koja također pokazuje „U“ oblik i najveća je u srednjem periodu života što je dokazano magnetskom rezonancijom u čovjeka (118, 119). Ove promjene su izražene pod djelovanjem izoflurana, dok pod djelovanjem sevoflurana nema istog utjecaja na vrijeme uvoda i buđenja ovisno o starosti miša. WT miševi starosti 3 mjeseca hranjeni kuprizonom imaju značajno duže vrijeme uvoda u anesteziju od WT miševa starosti 3 mjeseca što bi upućivalo na pretpostavku da ovaj tip demijelinizacija utječe na vrijeme koje je potrebno za uvod u anesteziju.

Poznata je činjenica da kod djece manje životne dobi kod kojih proces mijelinizacije nije još u potpunosti završen i kod bolesnika oboljelih od demijelinizirajućih bolesti poput multiple skleroze je potrebno dulje vrijeme za uvod u anesteziju. Potrebno je razlikovati demijelinizaciju u patološkim i kemijski induciranim modelima od hipomijelinizaacije dječje dobi i degenerativnih promjena mijelina u starenju (120). Mijelin dječje dobi je kompaktan, ali je sastavljen od manjeg broja namotaja, u starenju se vide mjestimične vakuolarne promjene, a u demijelinizaciji dolazi do dekompakcije.

B4galnt1 miševi starosti 12 mjeseci imaju značajno kraće vrijeme uvoda u anesteziju izofluranom i sevofluranom nego li WT miševi starosti 12 mjeseci. Uzevši u obzir da *B4galnt1* miševi ne sintetiziraju kompleksne gangliozide a, b i c serije moguće je da oni imaju važnu ulogu u mehanizmu uspavljivanja pod učinkom anestetika. Također se postavlja pitanje ima li demijelinizacija ovog specifičnog tipa ključan utjecaj na ekspresiji kompleksinih gangliozida. U svom radu *B4galnt1* miševima Pan i suradnici utvrdili su međusobnu ovisnost ekspresije gangliozida i molekule MAG-smanjenje ekspresije vodi smanjenju ekspresije MAG-a i obrnuto, a oboje vodi demijelinizaciji (121). Kuprizon je dobar model demijelinizacije ali ne odgovara u potpunosti *B4galnt1* modelu miševa koji ne sintetiziraju kompleksne gangliozide. Promjene gangliozida koje smo uočili imunohistokemijom nisu dovoljna potvrda za analognost ova dva modela demijelinizacije. Stoga ono što nam dalje ostaje za učiniti je kvantifikacija ekstrakcijom gangliozida i potvrda same demijelinizacije u kuprizonskom modelu uz pomoć elektronskog mikroskopa.

Ako razmotrimo rezultate vremena ostvarenog za indukciju u anesteziju i buđenje iz anestezije možemo zapaziti istu tendenciju dužeg buđenja nakon izlaganja izofluranu kod WT miševa tretiranih kuprizonom, miševi *B4galnt1* i WT miševa starosti 3 i 6 mjeseci.

Najduže vrijeme indukcije u anesteziju sevofluranom ili izofluranom je kod WT miševa tretiranih kuprizonom, dok je miševima *B4galnt1* i WT miševima starosti 3 i 6 mjeseci potrebno više vremena za indukciju sevofluranom.

Duže vrijeme ulaska u anesteziju pod utjecajem hlapljivog anestetika ostavlja otvorenim razmatranje mnogih mehanizama koji bi mogli objasniti gore navedeno. Ukoliko uzmemo u obzir mehanizam prolaza hlapljivog anestetika kroz stanicu putem lipidnih splavi moguće je da dužu indukciju podržava nedostatak nekih esencijalnih strukturnih komponenti signalne domene (poglavito proteina i glikolipida) ili narušavanje njihove strukturne organizacije.
Imajući u vidu skupinu miševa s defektom u sintezi gangliozida, mogli bi posumnjati da narušavanje količine i funkcije gangliozida može izmijeniti put ulaska hlapljivog anestetika. Ovu tvrdnju bi mogli potkrijepiti činjenicom da gangliozidi sudjeluju, preko sialoglikanskih elemenata stanične površine, u prepoznavanju specifičnih molekula i reguliranju aktivnosti membranskih proteina, u modulaciji enzimskih svojstava, staničnoj signalizaciji i adheziji stanice (122).
U novije vrijeme se došlo do zapažanja kako hlapljivi anestetici mijenjaju transport unutar stanice djelujući na mikrotubule citoskeleta. Stoga bi oštećenja na razini mikrotubula mogla mijenjati vrijeme indukcije i buđenja iz anestezije primjenom hlapljivog anestetika. (123)
Druga mogućnost su promjene koje mogu nastati u neuronima regija mozga odgovornih za san i budnost na razini neurotransmitera i receptora te s njima spregnutih ionskih kanala.
Poznato je da preoptička regija prednjeg hipotalamusa regulira stanja budnosti i sna, odgovora na stres, emocije, reakcije upozorenja (strah) i učenje. Veliki broj neurona ovoga područja su noradrenergički neuroni i upravo oni u trenutku izlaganja hlapljivim anesteticima mijenjaju svoju aktivnost (124, 125)

Provedenim testiranjem u testu odgovora na vidne stimulacije nema značajne razlike između niti jedne skupine miševa prije i poslije anestezije. Moguće objašnjenje ovakvog rezultata je da je ovaj test pregrub u procjeni moguće fine razlike u fenotipu *B4galnt1* i kuprizonom tretiranih miševa ili njegova primjena ne otkriva promjene do kojih možda dolazi nakon uvoda u anesteziju hlapljivim anesteticima.
Testom refleksa istezanja stražnjih udova primijećena je očekivana manja ocjena ispružanja stražnjih nogu nakon uvoda izofluranom ili sevofluranom u svim ispitivanim skupinama, a to je u skladu s poznatim djelovanjem hlapljivih anestetika na inhibiciju refleksnih podražaja (32, 126). *B4galnt1* KO miševi imaju značajno niže ocijene istezanja stražnjih nogu nakon anestezije izofluranom kao i sevofluranom u odnosu na WT miševe starosti 12 mjeseci, a također i na WT miševe starosti 3 mjeseca hranjene kuprizonom. Njihov lošiji rezultat i bez djelovanja anestezije HA opisan je u radu Pa i sur. (121) gdje je pripisan demijelinizaciji.

Mjerenjem vremena trajanja hvata prednjim udovima (test snage stiska) u različitim skupinama naših pokusnih životinja uočava se parabolička distribucija snage tijekom rasta i razvoja miša tako da miševi starosti 6 mjeseci imaju najduže vrijeme držanja prednjim udovima. *B4galnt1* miševi postupnim razvojem fenotipskih karakteristika do petog mjeseca života značajno gube snagu prednjih udova i vrijeme držanja prednjim udovima im se drastično smanjuje, tako da je ono u 12-tom mjesecu starosti značajno manje od vremena svih drugih promatranih skupina (127). Miševi hranjeni kuprizonom, starosti 3 mjeseca, ne razvijaju tako značajan deficit, iako im je vrijeme održanja na žici značajno manje od WT miševa starosti 3 mjeseca.

U testu na rotirajućoj osovini uočili smo podjednako vrijeme držanja na, u ovom slučaju, odabranom specifičnom programu rada stroja (vidjeti opis rada stroja u poglavlju materijali i metode). WT miševi starosti 12 mjeseci imaju podjednako vrijeme držanja na rotirajućoj osovini kao i WT miševi starosti 3 i 6 mjeseci, osim nakon anestezije izofluranom, kada imaju značajno kraće vrijeme držanja. Ipak *B4galnt1* KO miševi imaju izuzetno kraće vrijeme držanja na rotirajućoj osovini, značajno manje i od WT starosti 12 mjeseci. Miševi hranjeni kuprizonom starosti 3 mjeseca, naprotiv, imaju značajno dulje vrijeme držanja na rotirajućoj osovini od WT miševa starosti 3 mjeseca prije i nakon anestezije.

Očigledno je da demijelinizacija i defekt sinteze kompleksnih gangliozida u konačnici vode razvoju kompleksnih motoričkih deficita koji zahvaćaju prednje i stražnje udove, kretanje, snagu i koordinaciju (128). Defekt sinteze gangliozida vodi ka demijelinizaciji i postupnom gubitku mijelinskih proteina (129, 130) s obzirom da su gangliozidi funkcionalni sudionik interakcije s molekulom MAG (131). Indukcijom demijelinizacije kuprizonom (za koju pretpostavljamo da bi kvantitativno bila slična onoj kod *B4galnt1* KO miševa, mada izazvana drugim mehanizmom) kod WT miševa vidimo drugačije rezultate motoričkih testova.

WT miševi hranjeni kuprizonom imaju značajno manje motoričke deficite. Moguće objašnjenje te razlike je u starosti miševa, obzirom da se defekt kod *B4galnt1* miševa razvija kasno. Promatrajući rezultate WT grupa svi motorički testovi imaju zvonastu distribuciju i WT miševi starosti 6 mjeseci trebali bi u svim testovima postizati najbolje rezultate motoričkih testova. Nadalje je moguće da demijelinizacija kuprizonom nije ista kao demijelinizacija uzrokovana nedostatkom kompleksnih gangliozida. Za pretpostaviti je da demijelinizacija izazvana kuprizonom nije jednostavna i da pogađa različite subpopulacije oligodendrocita različito, te uključuje dodatne inflamacijske mehanizme o kojima se za sada malo zna. Osim toga demijelinizacija kuprizonom ne pogađa jednako različite dobne skupine

pa je tako dokazano da ima najveće posljedice na juvenilne miševe, a manje na starije miševe (132).

Demijelinizacija kod *B4galnt1* miševa uzrokovana je nedostatkom kompleksnih gangliozida i nemogućnošću održanja pravilne namotane strukture mijelinskog plašta oko aksona neurona. Pitanje je: Koliko različite populacije neurona ovise o gangliozidima u održanju strukture mijelina? Za pretpostaviti je dodatnu ulogu kompenzatornog regulacijskog mehanizma koji se vidi u povećanoj ekspresiji jednostavnih gangliozida i gangliozida serije *„0“* koji kod *B4galnt1* zamjenjuju kompleksne gangliozide (133). Također, nedostatak gangliozida ima kvantitativne posljedice na druge molekule čija je svrha održanje dinamičke strukture mijelina kao što su MAG, semaforini i drugi (130). *B4galnt1* miševi imaju izrazito loše rezutate testa na rotirajućoj osovini za razliku od WT miševa hranjenih kuprizonom koji imaju čak značajno bolje rezultate od svoje kontrolne skupine unatoč izraženom demijelinizacijskom deficitu. Riješavanje testa na rotirajućoj osovini zahtjeva kompleksne motoričke mehanizme koje uključuju interakciju *cerebeluma*, bazalnih ganglija i asocijacijskih motoričkih polja. U tom slučaju jasniji bi bio nedostatak i funkcija kompleksnih gangliozida u izvođenju kompleksnih radnji životinje, koje zahtijevaju suradnju većeg broja različitih neuronskih populacija različitog embrionalnog smjera subdiferencijacije. Obzirom da su gotovo svi testovi učinjeni na *B4galnt1* miševima bili jednostavni motorički ili kognitivno-bihevioralni testovi (121), možda bi za daljnje istraživanje fenotipa trebalo posezati za najkompleksnijim dostupnim testovima koji uključuju kako nove biheviorističke testove tako i stereološku studiju kvantifikacije broja neurona u pojedinim regijama prema funkcionalnim skupinama. Bolji rezultati miševa hranjenih kuprizonom od njihove kontrolne grupe, također, možda bi se mogli objasniti hiperaktivnošću (121). Hranjenje 0,1%-tnim kuprizonom kroz 6 tjedana ne dovodi do potpune demijelinizacije, dok primjena 0,2%-tnog i više kuprizona dovodi do gotovo potpune demijelinizacije nakon 6 tjedana (86, 87). Kuprizon uzrokuje primjetnu demijelinizaciju oko trećeg tjedna primjene, a gotovo 100%-tnu demijeinizaciju doseže oko 5 tjedna od početka primjene (87).

Učinak hlapljivih anestetika na pokretljivost i koordinaciju je očekivan, što je potvrđeno u istraživanju na *C. Elegans* i vinskoj mušici. Uočeno je da hlapljivi anestetik dovodi do promjena proteina *UNC-79, UNC-1 i UNC-24* odgovornih istovremeno za pokretljivost, ali i za osjetljivost vinske mušice ili oblića na hlapljivi anestetik. Promjene se vide kao kočenje, usporavanje i zapinjanje kretnji.Poveznica s lipidnim domenama su upravo proteini UNC-1 i

UNC-24, koji su strukturna komponenta lipidnih splavi neuronskih stanica. Ujedno oni su homologi *stomatin-u*, proteinu sisavaca. (14, 15, 115)

U kavezu za mjerenja aktivnosti WT miševi starosti 3 mjeseca imaju značajno više horizontalnih pokreta u 1. minuti prije anestezije od WT miševa starosti 6 mjeseci, što bi se moglo objasniti pojačanom znatiželjom i istraživačkim porivima mladih miševa. Nakon primjene sevoflurana WT miševi starosti 6 mjeseci imaju značajno manje horizontalnih pokreta u 1. i 4. minuti od WT miševa starosti 3 mjeseca. Ovaj učinak se ne opaža nakon primjene izoflurana pa za ovu pojavu nema adekvatnog objašnjenja. WT miševi starosti 12 mjeseci imaju značajno više vertikalnih pokreta u 4. minuti prije primjene anestezije od WT miševa starosti 3 i 6 mjeseci. Moguće je da stariji miševi više koriste vertikalne pokrete u istraživanju svoje okoline od mlađih miševa. *B4galnt1* miševi starosti 12 mjeseci imaju značajno manje horizontalnih pokreta u 4. minuti prije anestezije od WT miševa starosti 12 mjeseci. Miševi hranjeni kuprizonom starosti 3 mjeseca imaju značajno manje horizontalnih pokreta u 1. i 4. minuti nakon primjene sevoflurana od WT miševa starosti 3 mjeseca. Ovo se može objasniti motoričkim deficitom ove dvije skupine miševa, koji se bolje uočava baš ovim testom nakon anestezije HA. WT miševi starosti 12 mjeseci imaju očekivano više vertikalnih pokreta prije indukcije u anesteziju od *B4galnt1* miševa. *B4 galnt1* miševi imaju značajno manje horizontalnih pokreta u 1. i 4. minuti prije primjene anestezije i vertikalnih pokreta u 4. minuti prije anestezije od miševa hranjenih kuprizonom zbog većeg motoričkog deficita *B4galnt1* miševa. Naprotiv *B4galnt1* miševi imaju značajno više horizontalnih pokreta u 1. i 4. minuti nakon primjene sevoflurana od miševa hranjenih kuprizonom. Iz ovoga proizlazi da ne možemo isključiti postojanje mehanizma djelovanja sevoflurana putem kompleksnih gangliozida.

U testu mjerenja lokomotorne aktivnosti u otvorenom polju sve skupine miševa imaju značajan pad u broju horizontalnih pokreta u 4. minuti i vertikalnih u 1. i 4. minuti nakon anestezije hlapljivim anesteticima. Zaostajanje u broju pokreta u prvoj minuti mogli bi potkrijepiti zapažanjem kako u prvoj minuti izostaje njušenje i upoznavanje prostora. Ova reakcija upoznavanja prostora njušenjem prisutna je kao fiziološka pojava kod svih miševa, što im povećava broj pokreta kada se nađu u novom okruženju. Manji broj pokreta mogli bi objasniti kao učinak HA na pokretljivost ili na slabljene njuha. U studijama u kojima je uspoređivan osjet njuha i anesteziranih i probuđenih miševa dokazano je da visoka razina probuđenog stanja snažno povećava aktivnost inhibitornih zrnatih stanica olfaktornog bulbusa i smanjuje odašiljanje mitralnim stanicama, dok anestezija onemogućava plastičnost ovisnu o

doživljaju (134). Zaostajanje broja vertikalnih i horizontalnih pokreta prisutno je kod miševa *B4galnt1* naspram miševa hranjenih kuprizonom i WT starosti 12 mj. nakon izlaganja HA. Kako *B4galnt1* miševi imaju deficit u sintezi gangliozida, oni nakon 8. mjeseca starosti razvijaju progresivnu neuropatiju, deficite u refleksnim pokretima, snazi, koordinaciji i balansu. U odnosu na kontrolne grupe pokazuju progresivni poremećaj hoda i smanjenu mogućnost propinjanja. Stoga bi navedeno mogli optužiti i za zaostajanje pokretljivosti općenito, a ne samo nakon izlaganja hlapljivim anesteticima.

Dokaz da su razlike u rezultatima testova motorike prije anestezije i u postanestezijskom vremenu posljedica učinka anestetika, a neposljedica izazvane hipomijelinizacije mogli bi objasniti uz pomoć WT miševa koji su hranjeni kuprizonom. Ovi miševi imaju značajan pad horizontalnih pokreta u 1. i 4. minuti nakon izlaganja anesteticima u odnosu na broj pokreta prije anestezije. Također smanjen broj vertikalnih pokreta mogli bi objasniti i nastalim promjenama kao što su slabljenje koordinacije i održavanja ravnoteže koji su nastupili nakon izlaganja hlapljivim anesteticima. To možemo potkrijepiti poznatom činjenicom razvoja postoperacijske kognitivne disfunkcije (POCD), kliničkim fenomenom slabljenja kognitivne funkcije uz gubitak vremenske i prostorne orijentacije, koji nastupa uz promjene u ponašanju, nakon izlaganja hlapljivom anestetiku u uvjetima veće životne dobi (135, 136) i uz postojeću predispoziciju za neurodegenerativne bolesti. Točan mehanizam POCD još nije u potpunosti jasan. Sumnja se na promjene hipokampalnog područja u smislu neurodegenerativnih oštećenja i promjena na razini sinaptičke transmisije (137, 138, 139).

U modificiranom Lahley III testu postoji trend bržeg rješavanja labirinta kod miševa starosti 12 mjeseci u odnosu na skupine mlađih miševa, iako je krivulja distribucije opet zvonasta i bolje vrijednosti testa postižu mlađi i stariji miševi. WT miševi starosti 12 mjeseci imaju značajno brže vrijeme rješavanja labirinta od WT miševa starosti 3 i 6 mjeseci, a rezultat je najizraženiji nakon primjene izoflurana. Moguće da se ovi rezultati djelomično mogu objasniti većim iskustvom prostornog snalaženja starijih miševa. Također miševi hranjeni kuprizonom u znatno kraćem vremenu rješavaju labirint od WT miševa starosti 3 mjeseca, a *B4galnt1* miševi znatno kraće rješavaju labirint od WT miševa starosti 12 mjeseci osim nakon primjene izoflurana. Nakon primjene sevoflurana *B4galnt1* imaju najkraće vrijeme rješavanja labirinta od svih promatranih skupina, iako ne statistički značajno manje, ali sa snažnim trendom značajnosti što objašnjavamo nedovoljno velikim uzorkom *B4galnt1* miševa. Utječe li demijelinizacija ili njezin učinak zajedno s primjenom anestezije na pojačanje hiperaktivnosti kod ovih skupina miševa ili se brže rješavanje labirinta kod ovih miševa može

objasniti boljim kratkotrajnim pamćenjem i boljim kognitivnim operacijama zaključivanja i prostornog snalaženja kod demijeliniziranih skupina miševa teško je razlučiti (121). Postoji mogućnost da deficit kompleksnih gangliozida ima određeni povoljni kvazikompenzatorni učinak na više kognitivne funkcije miševa.

Anestezija izofluranom ili sevofluranomu u uvjetima klinički relevantnih koncentracija i u slučaju fetalne dobi miševa, klinički mijenja njihovo pamćenje (140), a u području hipokampalnih neurona se to vidi kao porast dugotrajne potencijacije hipokampalnih neurona (LTP – engl. *Long-Term Potentiation*) (141) i promjene razine ekspresije NMDA receptora (podjedinica NR1 i NR2B) (135, 142). Proučavanje LTP hipokampalne regije u smislu sinaptičke plastičnosti doprinijelo je otkrivanju temeljnog staničnog mehanizma uključenog u procese učenja i eksplicitnog pamćenja. (143, 144). Upravo ova spoznaja mogla bi objasniti kraće vrijeme latencije kod prolaza kroz labirint i bolje pamćenje opasnosti u testu pasivnog izbjegavanja kod WT miševa starosti 3 mj., miševa *B4galnt1* KO i kuprizon modelu miša nakon izlaganja hlapljivom anestetiku. Istraživanje u kojem su miševi izlagani hlapljivom anestetiku desfluranu pokazalo je kako hlapljivi anestetici uzrokuju promjene nekih unutarstaničnih proteina koji su važni za endocitozu neurotransmiterskih receptora. Ova činjenica otvara mogućnost uključenosti signalnih lipidnih mikrodomena u mehanizme upamćivanja (145).

Treba napomenuti da je porast ekspresije NMDA receptora, podjedinica NR1 i NR2B, pod učinkom sevoflurana, isti kod mladih miševa kao i onih starosti 18 mjeseci, ali kod starijih miševa porast ekspresije korelira s padom memorije (146).

Porast ekspresije NMDA receptora prisutan je i nakon četverosatnog izlaganja miševa starosti 18 mjeseci izofluranu, međutim u tim uvjetima se opaža manja sposobnost prostornog učenja (135). U našem istraživanju bi to značilo da miševi starosti 12 mj. imaju duže vrijeme latencije prolaza kroz labirint i vraćaju se u tamnu prostoriju unatoč opasnosti u testu pasivnog izbjegavanja nakon anestezije hlapljivim anestetikom.

Iz dosadašnjih istraživanja nepobitno je dokazano kako hlapljivi anestetici utječu na hipokampalnu regiju u smislu nastanka neurodegenerativnih promjena i izmijenjenog pamćenje (147). Osobito je to zapaženo kod izlaganja fetusa miša višesatnoj anesteziji hlapljivom anestetiku u koncentracijama većim od 3 Vol/%, pri čemu je isključena mogućnost da hipotenzija ili hipoksija potiču neurodegeneraciju CA1 regije hipokampusa (138). Također, osvrćući se na kliničku praksu u kojoj se bilježe promjene u pamćenju i ponašanju nakon izloženosti hlapljivim anesteticima, osobito u starijoj dobnoj populaciji, rezultati

novijih istraživanja sugeriraju da dugotrajna ili višekratna izlaganja sevofluranu mogu poticati apoptozu hipokampalnih neurona i kognitivne promjene (146).

Da dalje istražimo ovaj učinak i vidimo je li vezan isključivo uz pamćenje primijenili smo test pasivnog izbjegavanja. *B4galnt1* miševi nakon prvog izlaganja struji prije primjene anestezije imaju najbolje preživljenje, tj. najduže se zadržavaju u svijetloj komori od svih ostalih skupina, a značajno dulje od WT miševa hranjenih kuprizonom koji su imali najlošije preživljenje od svih promatranih skupina. Nakon primjene anestezije izofluranom miševi hranjeni kuprizonom imaju značajno dulje preživljenje od *B4galnt1* miševa. Nakon primjene sevoflurana *B4galnt1* imaju opet bolje preživljenje od miševa hranjenih kuprizonom, iako ovaj put rezultat nije statistički značajan. Ovim testom utvrdili smo da *B4galnt1* miševi imaju zaista bolje kratkoročno pamćenje slično zdravim mladim miševima i izuzetno bolje od miševa kojima je demijelinizacija sličnog opsega izazvana kuprizonom. Uloga lipidnih splavi i promjena njihove dinamike vjerojatno je povezana s mehanizmima dugoročne plastičnosti i promjenama citoskeleta (147) u koji su uključeni kompleksni gangliozidi. Preliminarni rezultati našeg laboratorija pokazuju kako ima naznake da *B4galnt1* imaju drugačiji broj ili aktivnost interneurona. Moguće je da kompleksni gangliozidi imaju značajnu ulogu u različitim oblicima sinaptičke plastičnosti te da ograničavaju plastičnost posljedično određenim evolucijskim pritiskom i razvojem specifičnog načina učenja sisavaca. Slabiji rezultati *B4galnt1* miševa nakon indukcije u anesteziju izofluranom vjerojatno su povezani s njegovim mehanizmom djelovanja putem lipidnih domena.

Sasvim drugačiji učinak anestetici imaju na dugoročno pamćenje što smo ispitali ponovljenim testom nakon 14 dana. Ovaj put su WT miševi starosti 6 mj. i miševi hranjeni kuprizonom stari 3 mj. imali značajno bolje rezultate od *B4galnt1* miševa. Nakon izlaganja izofluranu i sevofluranu mlađi miševi postizali su bolje rezultate. *B4galnt1* miševi nemaju bolje dugoročne rezultate. Moguće objašnjenje ovog fenomena je da su *B4galnt1* izrazito stariji od ostalih testiranih skupina obzirom da se deficitarne karakteristike njihova fenotipa javljaju dosta kasno (nakon 6 mjeseci života) i pitanje je koliko standardne degenerativne promjene starosti imaju utjecaja na konačan rezultat testa.

Mada su u ljudi puno češće bolesti suviška gangliozida, dok je manjak sinteze kompleksnih gangliozida izrazito rijedak (148) naše istraživanje otkriva nove detalje u mehanizmu djelovanja hlapljivih anestetika i ima svoje implikacije u kliničkoj praksi. Primjenom anestetika postižemo reverzibilni gubitak osjeta boli, nelagode i svijesti. Kako bi priznali i razjasnili promjene u ponašanju koje za sobom nosi opća anestezija važno je znati mehanizme

nastanka istih. To je moguće ukoliko dobro poznajemo put ulaska hlapljivih anestetika u stanice SŽS i dalji učinak anestetika na isu stanicu. Da još uvijek nismo spremni dati odgovore na postanestezijske promjene potvrđuju i studije koje se bave POCD fenomenom.
Mnoge studije do sada pokazale su da osobito starije dobne skupine odmah po anesteziji imaju slabljenje kognitivnih funkcija kao zaboravnost, dugoročni gubitak pamćenja, loše prosudbe, čudno ponašanje, a što je povećaano kod rizičnih skupina s već prisutnom demencijom ili neurodegenerativnom bolesti poput Alzheimer-ove i Parkinson-ove bolesti (149).
Preciznije poznavanje mehanizma djelovanja hlapljivih anestetika omogućuje bolju pripremu pacijenta za anesteziju te odluku o primjeni regionalnih metoda ispred opće anestezije (smatra se kako je manji učinak na POCD lokalnog nego li hlapljivog anestetika) Eckenhoff je svojim istraživanjima potaknuo pretpostavke o vjerojatnosti razvoja neuroinflamatornog odgovora u SŽS, kao združene reakcije anestezijskog i operacijskog postupka. (150, 151)
Naše je istraživanje provedeno na životinjama koje imaju deficit u sintezi gangliozida što se klinički vidi kao progresivna neuropatija i deficit refleksnih pokreta, snage, ravnoteže i koordinaciji. Ovakve smetnje su vidljive u mnogih pacijenata s neurološkim bolestima. Stoga promjene koje smo zapazili tijekom i nakon anestezije, mogle bi poslužiti i za istraživanja u kliničkoj praksi.
Dio istraživanja je proveden na miševima hranjenim kuprizonom. Kuprizon model korelira s patohistološkim promjenama (smrt oligodendrocita i hipomijelinizacija) kod osoba oboljelih od multiple skleroze (MS) (152, 153, 154). Stoga bi zapažanja kod primjene sevoflurana ili isoflurana na ovim miševima mogla dati doprinos razumijevanju učinka istih anestetika tijekom anestezije oboljelih od MS.
Nadalje, zapaženo je da demijelinizacija zahvaća područje *corpus callosum*, ali i *pedunculli cerebellaris superior, hippocampus, striatum* (155) i *putamen.* U tekstu je već spomenuto da je hipokampalno područje mozga (156) također mjesto djelovanja hlapljivih anestetika što svakako za sobom povlači pitanje je li učinak hlapljivih anestetika kod pacijenata s demijelinizacijom hipokampalnog područja drugačiji nego kod pacijenata bez ovih promjena.

Da bi smo postigli demijelinizaciju istog obima kao što je kod *B4Galt1*, miševi divljeg tipa tretirani su kuprizonom. Demijelinizacija na životinjskom modelu može se izazvati alergijskim encefalomijlitisom, virusnom infekcijom, fizičkom ozljedom te izlaganjem toksinima (157). Model opće demijelinizacije u kuprizonskom modelu najbolje odgovara slici demijelinizacije u *B4Galt1* miševe jer uključuje gubitak mijelinskih proteina MBP i MAG.

U dosada opisanim studijama na modelu štakora zamijećeno je kako je demijelinizacija prije vidljiva u korteksu nego u subkortikalnoj bijeloj tvari (158) što smo potvrdili u našem radu služeći se protutijelma antiMAG i antMAB. Orijentirajući se prema markeru za neuronske jezgre zaključujemo kako je demijelinizacija na našem modelu miša soja C57black/6 posebno opsežna u površinskim slojevima korteksa (I-III) te da prvo dolazi do smanjenja količine MBP proteina, a zatim i do smanjenja MAG proteina. Istovremeno veliki snopovi vlakana u moždanom deblu ne pokazuju značajnije promjene količine mijelinskih proteina. Gudi i suradnici primijetili su kako do demijelinizacije strukture *corpus callosum* dolazi tek nakon 4,5-5 tjedana hranjenja miševa 0,2% kuprizonom (159). Da stvarno u tom roku dolazi do demijelinizacije najveće komisure mozga može se dokazati i protutijelima SMI311 odnosno SMI312 koja prepoznaju nefosforilirane i fosforilirane epitope na neurofilamentima. Nakon istog perioda hranjenja miševa kuprizonom kao u spomenutoj studiji, na rezovima tkiva miševa iz naše studije protutijelo SMI311 reagira s vlaknima u *corpus callosum* što smo protumačili kao znak pojave demijeliniziranih vlakana. Isti marker pokazuje kako nisu sve moždane komisure jednako osjetljive na tretman kuprizonom pa prednja komisura ima značajno manji broj demijeliniziranih vlakana.

U našoj studiji više nas je zanimala moguća promjena u ekspresiji kompleksnih gangliozida eventualno izazvana kuprizonom. Do sada nema podataka u literaturi koji bi upućivali na to da demijelinizacija izazvana ovim toksinom posredno ima utjecaja na količinu gangliozida u mozgu tretiranih životinja. Naprotiv, poznato je da blok u sintezi gangliozida izazvan umetanjem neokazete u gen *B4Galgt1* posredno djeluje na količinu proteina MAG (106) koji je njihov komplementarni ligand. Naši rezultati pokazuju kako kuprizon utječe na distribuciju gangliozida. Autori koji su do sada opisivali distribuciju gangliozida u mozgu miša nisu opisali pojavu gangliozida GD1a i GT1b u velikim snopovima vlakana (108, 110). Ovo je bilo kontradiktorno s dokazima kako su upravo ta dva gangliozida najbolji receptor molekule MAG koji su dobiveni radom na staničnim kulturama (160, 161). Smatramo da je pojava gangliozida u *corpus callosum* miševa divljeg tipa koje smo tretirali kuprizonom slučajno otkriće tehnike kojom se može dokazati kako su MAG i njegovi receptor stvarno kolokalizirani na snopovima mijeliniziranih vlakana. Naime, kako upotreba detergenata nije dozvoljena kod imunohistokemije gangliozida radi pojave artefakata (109, 162) ovo je jedini način da se otkrije glikolipidni antigen na kriptičnom mjestu. Ne možemo isključiti niti mogućnost da kuprizon izaziva promjene u distribuciji nekim specifičnim mehanizmom, ali pretpostavljamo da bi imunoelektronska mikroskopija mogla dati konačan odgovor na ovo pitanje.

Nedovoljno je poznato možemo li pokretanjem mehanizama djelovanja hlapljivih anestetika utjecati na promjene, kako pozitivne tako i negativne, kod bolesnika s demijelinizacijskim bolestima (multipla skleroza, bolesti nakupljanja gangliozida i bolesti deficita sinteze gangliozida).

Nedavno istraživanje u kojem su WT miševi imunizirani MOG proteinom (mijelin oligodendrocitni glikoprotein), model miša s Multiplom sklerozom, izlagani anesteziji sevofluranom u koncentraciji 2,5 Vol%, potvrdilo je prethodna izvješća u kojima se učinak sevoflurana vidi kao smanjenje aktivnosti T stanica kod oboljelih od autoimunih bolesti kao što je MS, što u krajnjem ishodu usporava kliničku progresiju bolesti (163).

U daljim istraživanjima svakako bi se trebalo razmotriti trajanje indukcije u anestetziju HA kod pacijenata oboljelih od demijelinizacijskih bolesti.

Anestici imaju široko područje djelovanja i ostaju još mnoga pitanja o mehanizmu djelovanja na koja nemamo odgovor. Vjerujemo kako će buduća istraživanja lipidnih domena pomoći u njihovom rješavanju.

7. ZAKLJUČAK

Nakon provedenih testova motorike kod miševa sa isključenim genom za sintezu kompleksnih gangliozida *(B4galnt1)*, nakon tretiranja hlapljivim anestetikom isofluranom ili sevofluranom zapažena je slabija pokretljivost u odnosu na divlji tip miša i miša tretiranog kuprizonom, dok u kognitivnim testovima nakon anestezije hlapljivim anesteticima *B4galnt1* miševi postižu značajno bolje rezultate u odnosu na divlji tip miša. Također *B4galnt1* miševi brže podliježu učinku anestetika nego li ostali miševi.

Kako je imunohistokemijski vidljiva promjena u distribuciji gangliozida u snopu komisuralnih vlakana *corpus calosum*-a velika je vjerojatnost da su razlike testova u ovih miševa nakon izlaganja hlapljivim anesteticima posljedica promjene raspodjele gangliozida barem na nekim kortikalnim strukturama, a ne samo hipomijelinizacije.

8. SAŽETAK

Hlapljivi anestetici se godinama primjenjuju u kliničkoj praksi, iako mehanizma njihovog djelovanja još nije dovoljno poznat. Brojne hipoteze ukazuju na mjesta njihovog djelovanja. Uz do sada ispitivane mogućnosti uključenosti $GABA_A$ i NMDA receptora u novije vrijeme se vjeruje kako hlapljivi anestetici djeluju i na lipidne signalne domene. Lipidne splavi su lokalizirane lipidne građevine sa visokim sadržajem kolesterola i glikosfingolipida. Lipidne splavi kao signalne platforme, uklopljene u fluidne membrane, sudjeluju u predaji signala unutar stanice. U radu je sposobnost hlapljivih anestetika da djeluju na signalne domene ispitana *in vivo* na modelu miša *B4galnt1* koji imaju promijenjenu sposobnost stvaranja lipidnih domena uslijed bloka u sintezi kompleksnih gangliozida, WT miševima i WT miševima hranjenim kelatorom bakra kuprizonom.

Miševi su podvrgnuti kognitivnim i motoričkim testovima prije i nakon anestezije izofluranom i sevofluranom. Mjereno je vrijeme potrebno za uvod u anesteziju i buđenje iz anestezije. *B4galnt1* miševi imaju značajno kraće vrijeme uvodau anesteziju izofluranom ($p<0,001$) i sevofluranom ($p<0,001$) od WT miševa hranjenih kuprizonom. WT miševi hranjeni kuprizonom postižu značajno duže vrijeme održanja na rotirajućoj osovini od *B4galnt1* miševa prije indukcije anestezije ($p<0,001$). U testu pasivnog izbjegavanja zadatka, 84.6 % *B4galnt1* miševa i 25 % miševa hranjenih kuprizonom odgodilo je ulazak u tamnu prostoriju. *B4galnt1* miševi imaju značajno manje horizontalnih pokreta u 1. ($p=0,002$) i 4. ($p<0,001$) minuti te značajno manje vertikalnih pokreta u 1. ($p<0,001$) i 4. ($p<0,001$) minuti prije uvoda u anesteziju od WT miševa hranjenih kuprizonom.

Razlike izmjerene u kognitivnim testovima i testovima motorike prije i poslije anestezije prije su posljedica su promijenjenog sastava lipida u *B4galnt1* mišu, a ne hipomijelinizacije koja postoji i kod kuprizonom tretiranih miševa i kod *B4galnt1*.

Ključne riječi: lipidne splavi, *B4galnt1* miševi, izofluran, sevofluran, hipomijelinizacija, kuprizon.

9. SUMMARY

INFLUENCE OF VOLATILE ANAESTHETICS ON THE COMPOSITION AND DISTRIBUTION OF MEMBRANE LIPID RAFTS

Volatile anaesthetics have been in use for years in clinical practice, although mechanism of their action is not yet fully understud. There are many hypotheses suggesting the site of their action. With so far investigated possible involvements of GABA and NMDA receptors, recent researches indicate possible action of volatile anaesthetics on lipid signalling domains. Lipid rafts are localized lipid structures with large quantity of cholesterol and glycosphingolipids. Lipid rafts function as *signalling platforms,* incorporated in the fluid membrane, in the transmission of signals inside the cell.

This disertation presents a research on the ability of volatile anaesthetics to act on lipid rafts signalling domains. Tests were conducted *in vivo,* using the *B4galnt1* mouse model. This mouse model has a modified ability to produce lipid domains due to the blocked synthesis of complex gangliosides. Tests included both mice strains, C57BL/6 and C57BL/6J fed with Cuprizone.

Mice were exposed to different tests before and after anaesthesia with sevoflurane and isoflurane. Tests included Visual placing response, Hindlimb extension reflex, Forelimb grip strength, RotaRod, Activity cage, modified Lashley III maze, and passive avoidance task. The induction and recovery times from anaesthesia were observed and measured.

The research results suggest that B4galnt1 mice have significantly shorter induction time of anaesthesia using isoflurane ($p<0.001$) and sevoflurane ($p<0.001$), compared to the WT mice fed with Cuprizone. WT mice fed with Cuprizone had significantly longer time in maintaining RotaRod, than *B4galnt1* mice before induction of anaesthesia ($p<0.001$).

Under Passive Avoidance test, 84.6% of *B4galnt1* mice and 25% of Cuprizone fed mice models postponed entrance into the dark room. *B4galnt1* mice have significantly less horizontal movement in the first ($p = 0.002$) and fourth ($p<0.001$) minute, as well as significantly less vertical movement in the first ($p <0.001$) and fourth ($p <0.001$) minute before induction time of anaesthesia compared to WT mice fed with Cuprizone.

The differences in the results of cognitive and motor skills tests before and after anaesthesia were caused by changes in composition of lipid domains, and not by hypomyelinisation.

Key words: lipid rafts, *B4galnt1* mice, volatile anesthetics, hypomyelinisation, Cuprizone.

10. LITERATURA

1. Hu H, Wu M. Mechanism of Anesthetic Action: Oxygen Pathway Perturbation Hypothesis. Medical Hypotheses. 2001;57:619-627.
2. Meyer, H. H. Welche eigenschaft der anasthetica bedingt inre Narkotische wirkung? Arch. Exp. Pathol. Pharmakol. 1899;42:109 –118.
3. Deamar DW, Kleinzeller A, Fambrough DM. Membrane Permeability (100 Years since Ernest Overton). Academic Press. 1999;1:11-18.
4. Miller K W. The nature of the site of general anaesthesia. Int. Rev. Neurobiology. 1985; 27:1-61.
5. Weinrich M, Nanda H, Worcester DL, Majkrzak CF, Maranville BB, Bezrukov SM. Halothane Changes the Domain Structure of a Binary Lipid Membrane. Langmuir. 2012; 28:4723–4728.
6. Seeman P. The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. Pharmacol Rev. 1972;24:583.
7. Simons K, Ehehalt R. Cholesterol, lipid rafts, and diseas. The Journal of Clinical Investigation. 2002;110:597-603.
8. Trudell JR. A unitary Theory of anesthesia based on lateral phase separations in nerve membranes. Anesthesiology. 1977;46:5-10.
9. Pang K. Y. Y , Braswell L. M., Chang L., Sommer T. J., Miller K. W. The perturbation of lipid bilayers by general anesthetics: A quantitative test of the disordered lipid hypothesis. Mol. Pharmacol. 1980;18:84-90.
10. Ye Sh, Strzalka J, Churbanova IY, Zheng S, Johansson JS, Blasie JK. A Model Membrane Protein for Binding Volatile Anasthetics. Biophysical Journal. 2004;87:4065-4074.
11. Coyne L, Lees G. Ligand Gated Ion channels: crucial targets for anaesthetics?. Current Anaesthesia & Critical care. 2002;13:334-342.
12. Morgan PhG. The Online Review of *C. elegans* Biology. Pasadena (CA): WormBook. 2005;1551-8507
13. Morgan PhG, Sadensky MM. Lipid Rafts and Anesthetic Sensitvity in C. Elegans. Anesthesiology. 2001;95:A118.
14. Humphrey JA, Sadensky MM, Morgan PhG. Understanding anesthesia: making genetic sense of the absence of senses. Human Molecular Genetics. 2002;11:1241-1249.
15. Sedensky M M, Siefker J M. A stomatin and a degenerin interact in lipid rafts of the nervous system of Caenorhabditis elegans. AJP Physiology. 2004;287:468-474.

16. Gottschalk A, Chevillet M. Computational Models of Volatile Anesthetic Action on Thalamic Networks. Anesthesiology. 2004;101:A116.
17. Cameron J Weir. The Molecular Mechanisms of general anaesthesia: dissecting the $GABA_A$ receptor. Oxford journals.2006; 49-53.
18. Berg-Johnsen J, Langmoen IA. Isoflurane hyperpolarizes neurones in rat and human cerebral cortex. Acta Physiologica Scandinavica. 1987;130:679-685.
19. Hemmings HC. Sodium channels and the synaptic mechanisms of inhaled anaesthetics. Jr. British Journal of Anaesthesia. 2009;103:61–9.
20. Franks NP.General Anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. Nat. Rev. Neurosciens. 2008;9:370-386.
21. Nietken GW, Honemann CW, Chan CK, Kanatchi GL, Durieux ME. Volatile anaesthetics have differential effects an recombinant m1 and m3 muscarinic acetycholine receptor function. British Journal of Anaesthesia. 1998;81:565-577.
22. Coyne L, Lees G. Ligand Gated Ion channels: Crucial targets for anaesthetics?. Current Anaesthesia & Critical Care. 2002;13:334-342.
23. Tao Y-X, Johns R A. A neuronal PDZ Domains: A promising New Molecular Target for Inhaled Anesthetics. Molecular interventions. 2004;4:215-221.
24. Newman S, Stygal J, Hirani S, Shaefi S, Maze M. Postoperative cognitive dysfunction after non cardiac surgery: a systematic review. Anesthesiology. 2001;106:372-390.
25. Mandala P K, Fodaleb V. Smaller molecular-sized anaesthetics oligomerize Ab peptide simulating Alzheimer's disease: a relevant issue. European Journal of Anaesthesiology. 2009;26:805–806.
26. Preckel B. Pharmacology of modern volatile anaesthetics. Best Practice & Research Clinical anaesthesiology. 2005;19:331-348.
27. Deady JE, Koblin D D, Eger EI II, Heavner JE, Aoust BD. Anesthetic Potencies and the Unitary Theory of narcosis. Anesthesia Analgesia. 1981;60:380-384.
28. Gonsowski CT, Laster MJ, Eger EI II et al. Toxicity of compound A in rats. Effect of increasing duration of administration. Anesthesiology. 1994;80:566.
29. Edwards DA, Shah H P, Cao W, Gravenstein N, Seubert ChN, Martynyuk AE. Bumetanide Alleviates Epileptogenic and Neurotoxic Effects of Sevoflurane in Neonatal Rat Brain. Anesthesiology. 2010;112:567–75.
30. Nietken GW, Honemann CW, Chan CK, Kanatchi GL, Durieux ME. Volatile anaesthetics have differential effects an recombinant m1 and m3 muscarinic acetycholine receptor function. British Journal of Anaesthesia. 1998;81:565-577.

31. Moe MC., Bains R, Vinje ML, Larsen GA, Kampenhaug EG, Berg-Johnsen J. Sevoflurane depolarizes pre-synaptic mytochondria in the central nervous system. Acta Anaethesiologica Scandinavica. 2004;48:562-568.
32. Campagna JA, Miller KW, Forman SA. Mechanisam of action of inhaled Anesthetica. NE Engl. J. Med. 2003;318:2110-2124.
33. Zhiyi Z. Are volatile anesthetics neuroprotective or neurotoxic? Zuo Medical Gas Research. 2012;2:1-10.
34. Dong Y. The Comon Inhalational Anesthetic Sevoflurane Induces Apoptosis and Increases β-Amyloid Protein Levels. Arch Neurol. 2009;66:620-631.
35. Lu Y, Wu X, Dong Y, Xu Z, Yiying Z, Xie Z. Anesthetic Sevoflurane Causes Neurotoxicity Differently in Neonatal Naïve and Alzheimer's Disease Transgenic Mice. Anesthesiology. 2010;112:1404–1416.
36. Wu Sh-X Han LCh, Zhang H, Wang W, Wei Y-Y, Sun X-X, Yanagawa Y, Li Y-Q, Xu L-Xl. The Effect of sevoflurane Inhalation on GABAergic Neurons activation: Observation on the GAD67-GFP Knock-In Mouse. The Anatomical Record. 2010; 293:2114-2122.
37. Lu Y . Anesthetic Sevoflurane Causes Neurotoxicity Differently in Neonatal Naïve and Alzheimer's Disease Transgenic Mice. Anesthesiology. 2010;112:1404–1416.
38. Seeman CR, Murat I. Sevoflurane and epileptiform EEG changes. Pediatric Anesthesia. 2005;15:266–274.
39. Baines D. Convulsive movements with sevoflurane. Anaesthesia Intensive Care. 1998; 26:329.
40. Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK. Clinical Anesthesia. 5th edition Lippincott Williams & Wilkins Publishers. 2009;12:281-307.
41. Song J H, Kim M, Park SW, Chen SC, Pitson SwM, Lee HT. Isoflurane via TGF-β1 release increases caveolae formation and organizes sphingosine kinase signaling in renal proximal tubules. American Journal Physiology Renal Physiol. 201;298:F1041-F1050.
42. Bickler PhE, Zhan X, Fahlman ChS. Isoflurane Preconditions Hippocampal Neurons against Oxygen-Glucose Deprivation. Role of Intracellular Ca2+ and Mitogen-activated Protein Kinase Signaling. Anesthesiology. 2005;103:532-539.
43. Nishimura K, Suzuki T, Akamatu N, Kugimiya T, Miyazak T. Neuroprotective Action of Isoflurane Using Electrophysiological Recodings at Striatal Neurons of Mouse. Anesthesiology. 2004;101:A121.

44. Qiu-jun W, Ke-zhong L, Shang-long Y, Zhi-hua L, Shun-suo L. Different effects of isoflurane and sevoflurane on cytotoxicity in primary cortical neurons of rats. Chinese Medical Journal. 2008;121:341-346.
45. Wei H, Liang G, Wang Q, Hawkins B, Madesh M, Wang S, Eckenhoff RG. The common inhalational anesthetic isoflurane induces apoptosis via activation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. Anesthesiology. 2008;108:251-260.
46. Hapfelmeier SG, Kochs E, Zieglgansberger W, Rammes G. Isoflurane blocks synaptic plasticity in the mouse: hyppocampus. Anesthesiology. 2001;94:1038-1063.
47. Culley DJ, Baxter MG, Yukhananonv R, Crosby G. Long-term impairment of acquisition of on spacial memory task following isoflurane-nirous oxide anesthesia in rats. Anesthesiology. 2004;100:309-314.
48. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy. Physiol. Rev. 2001; 81:741-746.
49. Berg-Johnsen J, Langmoen IA. Isoflurane hyperpolarizes neurones in rat and human cerebral cortex. Acta Physiologica Scandinavica. 1987;130:679-685.
50. Winegar BD, Maclver MB. Isoflurane depresses hippocampal CAI glutamate nerve terminals without inhibiting fiber volleys. BMC Neuroscience. 2006;7:1-9.
51. Vereb G, Szollosi J, Matko J, Nagy P, Farkas T, Vıgh L, Ma tyus L, Waldmann TA, Damjanovich S. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer–Nicolson model. Contributed by T. Farkas. 2003;100:8053-8058.
52. Pike LJ. Lipid rafts: bringing order to chaos. Journal of Lipid Research. 2003;44:655-667.
53. Tsui-Pierchala BA, Encians M, Milbrandt J, Johnson EM. Lipid rafts in neuronal signaling and function. Trends in Neurosciences. 2002;25:412-417.
54. Calder Ph C, Yaqoob P. Lipid Rafts-Composition, Characterization, and Controversies. J Nutr.2007;137:548–553.
55. Pike L J. The challenge of lipid rafts. J Lipid Res. 2009;50:S323–S328.
56. Hao M., Mukherjee S, Maxfield F R. Cholesterol depletion induces large scale domain segregation in living cell membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001;98:13072–13077.
57. Prior IA, Muncke C, Parton RG, Hancock JF. Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. J. Cell Biol. 2003;160:165–170.
58. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2000;1:31–41.

59. Smart EJ, Graf GA, Mc Niven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. Mol. Cell. Biol. 1999;19:7289–7304.
60. Anderson RGW. The caveolae membrane system. Annu. Rev. Biochem.1998;67:199–225.
61. Ikonen E, Parton RG. Caveolins and cellular cholesterol balance. Traffic. 2000;1:212–217.
62. Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. Sciens. 2010;327: 46-50.
63. Kuhn R, Wiegandt H. Die Konstitution der Ganglio-Ntetraose und des Gangliosides GI. Chemische Berichte. 1963;96:866–880.
64. Svennerholm L. The gangliosides. Journal of Lipid Research.1964;5:145–155.
65. Svennerholm L. Chromatographic separation of human brain gangliosides. Journal of Neurochemistry.1963;10:613–623.
66. Chester MA. "Nomenclature of glycolipids". Pure and Applied Chemistry. 1997;69:2475–2487.
67. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature of glycolipids Recommendations 1997. Eur. J. Biochem. 1998;257:293-298.
68. Kolter Th. Ganglioside Biochemistry, Review Article. ISRN Biochemistry. 2012;ID 506160:1-36.
69. Sonnino S, Mauri L, Chigorno V, Prinetti A. Gangliosides as components of lipid membrane domains. Glycobiology. 2006;17:1R–13R.
70. Lopez PH, Schnaar RL. Gangliosides in Cell Recognition and Membrane Protein Regulation. Curr. Opin. Struct. Biol. 2009;19:549-557.
71. Wang B. Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition. Annual Review of Nutrition. 2009;29:177–222.
72. Iwamori M, Shimomura J, Tsuyuhara S, Naga Y.Gangliosides of various rat tissues: distribution of ganglio-N-tetraose-containing gangliosides and tissue-characteristic composition of gangliosides. Journal of Biochemistry. 1984;95:761–770.
73. Kwak DH, Seo BB, Chang KT, Choo YK. Roles of gangliosides in mouse embryogenesis and embryonic stem cell differentiation. Experimental and Molecular Medicine. 2011;43:379–388.

74. Garofalo T, Tinari A, Matarrese P, Giammarioli AM, Manganelli V, Ciarlo L, Misasi R, Sorice M, Malorni W. Do mitochondria act as ”cargo boats” in the journey of GD3 to the nucleus during apoptosis?. FEBS Letters. 2007;581:3899–3903.
75. Ledeen R, Wu G. New findings on nuclear gangliosides: overview on metabolism and function. Journal of Neurochemistry. 2011;116:714–720.
76. Segler Stahl K, Webster JC, Brunngraber EG. Changes in the concentration and composition of human brain gangliosides with aging. Gerontology. 1983;29:161–168.
77. Yamazaki T, Suzuki M, Irie T, Watanabe T, Mikami H, Ono S. Amyotrophic lateral sclerosis associated with IgG anti-GalNAc-GD1a antibodies. Clinical Neurology and Neurosurgery. 2008;110:722–724.
78. Li YT, Maskos K, Chou CW, Cole RB, Li SC. Presence of an unusual GM2 derivative, taurine-conjugated GM2, in Tay-Sachs brain. The Journal of Biological Chemistry. 2003;278:35286–35291.
79. Liu Y, Wada R, Kawai H, Sango K, Deng Ch, Tai T, McDonald MP, Araujo K, Crawley JN, Bierfreund U, Sandhoff K, Suzuki K, Proia RL. A genetic model of substrate deprivation therapy for a glycosphingolipid storage disorder. The Journal of clinical investigation. 1999;103:497-505.
80. Sheikh K A, Sun J, Liu Y, Kawai H, Crawford T O, Proia R L, Griffin J W; Schnaar R L. Mice lacking complex gangliosides develop Wallerian degeneration and myelination defects. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1999;96:7532-7537.
81. Yamashita T, Wu Y-P, Sandhoff R, Werth N, Mizukami H, Ellis JM. Interruption of ganglioside synthesis produces central nervous system degeneration and altered axon–glial interactions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005;102:2725-2730.
82. Chiavegatto S, Sun J, Nelson RJ, Schnaar RL. A Functional Role for Complex Gangliosides: Motor Deficits in GM2/GD2 Synthase Knockout Mice. Experimental Neurology. 2000;166:227-34.
83. Hiremath MM, Saito Y, Knapp GW, Ting JP-Y, Suzuki K, MatsushimaGK, Matsushima GK, Ting JP. Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. Journal of Neuroimmunology. 1998:38-49.
84. JM W. Copper. Not to little, not to much, but just right. J r Coll Phys Lond. 1995:280-283.

85. Zlotkin SH, Atkinson S, Lockitch G. Trace elements in nutrition for premature infants. Clin Perinatol. 1995:22:223-240.
86. Matsushima GK, Morell P. The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. Brain Pathology. 2001;11:107-16.
87. Hiremath M, Saito Y, Knapp G, Ting J-Y, Suzuki K, Matsushima G.Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. Journal of neuroimmunology. 1998;92:38-49.
88. Torkildsen O, Brunborg L, Myhr KM, Bø L. The Cuprizone model for demyelination. Acta Neurologica Scandinavica. 2008;188:72-76.
89. Dickie MM. Universal Mouse Numbering System. Keeping Records, Biology of the Laboratory Mouse. New York: Dover Publications, prvo izdanje. 1975.
90. Tobias JD. Administration of sevoflurane using other agent-specific vaporizers. American journal of therapeutics. 1998;5:383-385.
91. Coert J. Zuurbier VME, Can Ince. Hemodynamics of anesthetized ventilated mouse models: aspects of anesthetics, fluid support, and strain. American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology. 2001;282:H2099-H2105.
92. Flecknell PA. Laboratory Animal Anesthesia, Third Edition. Academic Press, San Diego, CA, 2009.
93. G.K. Matsushima PM. The neurotoxicant, Cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. Brain Pathology. 2001;9:107-116.
94. Chiavegatto S, Sun J, Nelson RJ, Schnaar RL. A Functional Role for Complex Gangliosides: Motor Deficits in GM2/GD2 Synthase Knockout Mice. Experimental Neurology. 2000;166:227–234.
95. Voltava M, Kršiak M, Moravec V. Effects of Alprazolam and Fluoxetine on Morphine Sensitization in Mice. 2002;51:417-423.
96. Doležal T, Kršiak M. Guaifenesin enhances the analgesic potency of paracetamol in mice. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology. 2002;366;551-554.
97. Dunham N, Miya T. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. Journal of the American Pharmaceutical Association. 1957;46:208-209.
98. Jones B, Roberts D. The quantitative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an accelerating rotarod. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 1968;20:302-304.

99. Bressler A, Blizard D, Andrews A. Low-stress route learning using the Lashley III maze in mice. Journal of visualized experiments. 2010;39:1-7.

100. Asbury ET, Fritts ME, Horton JE, Isaac WL. Progesterone facilitates the acquisition of avoidance learning and protects against subcortical neuronal death following prefrontal cortex ablation in the rat. Behavioural brain research. 1998;97:99-106.

101. Speiser Z, Shved A, Gitter S. Effect of propranolol treatment in pregnant rats on motor activity and avoidance learning of the offspring. Psychopharmacology. 1983;79:148-154.

102. Ikuo K, Osamu N, Tadashi T. Antibody responses to ganglio-series gangliosides in different strains of inbred mice. Molecular immunology. 1992;29:625-632.

103. Lunn M, Johnson LAA, Fromholt SE, Itonori S, Huang J, Vyas AA Hildreth JE, Griffin JW, Shnaar RL, Sheikh KA. High-Affinity Anti-Ganglioside IgG Antibodies Raised in Complex Ganglioside Knockout Mice. Journal of neurochemistry. 2000;75:404-412.

104. Sprinkle T. 2,3-cyclicnucleotide 3-phospodiesterase, an Oligodendrocyte-Schwann cell and myelin-associated enzyme of the nervus system. Critical reviews in neurobiology. 1989;4:235-301.

105. Jahn-Eimermacher A, Lasarzik I, Raber J. statistical analysis of latency outcomes in behavioral experiments. Behavioural brain research. 2011;22:271-275.

106. Sun J, Shaper NL, Itonori S, Heffer-Lauc M, Sheikh KA, Schnaar RL. Myelin-associated glycoprotein (Siglec-4) expression is progressively and selectively decreased in the brains of mice lacking complex gangliosides. Glycobiology. 2004;14(9):851-7.

107. Ulfig N, Nickel J, Bohl J. Monoclonal antibodies SMI 311 and SMI 312 as tools to investigate the maturation of nerve cells and axonal patterns in human fetal brain. Cell Tissue Res. 1998;291(3):433-43.

108. Kotani M, Tai T. An immunohistochemical technique with a series of monoclonal antibodies to gangliosides: their differential distribution in the rat cerebellum. Brain Res Brain Res Protoc. 1997;1(2):152-6.

109. Heffer-Lauc M, Lauc G, Nimrichter L, Fromholt SE, Schnaar RL. Membrane redistribution of gangliosides and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in brain tissue sections under conditions of lipid raft isolation. Biochim Biophys Acta. 2005;1686(3):200-8.

110. Vajn K, Viljetić B, Degmečić IV, Schnaar RL, Heffer M. Differential distribution of major brain gangliosides in the adult mouse central nervous system. PLoS One. 2013;8(9):e75720.

111. Lerner, Richard A., et al. "Cerebrodiene: a brain lipid isolated from sleep-deprived cats." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91.20 (1994): 9505-9508.

112. Franks, N. P., and W. R. Lieb. "The structure of lipid bilayers and the effects of general anaesthetics: an x-ray and neutron diffraction study." *Journal of molecular biology* 133.4 (1979): 469-500.

113. Campagna JA, Miller KW, Forman SA. Mechanisms of actions of inhaled anesthetics. N Engl J Med. 2003;348:2110–2124.

114. Sasaki R, Hirota K, Roth SH, Yamazaki M. Extracellular magnesium ion modifies the actions of volatile anesthetics in area CA1 of rat hippocampus in vitro. Anesthesiology. 2002; 96:681–687.

115. Morgan Ph G, Sadensky MM. Two Cation Channels Interact with Lipid raft Proteins to Control anesthetic sensitivity in *C. Elegans.* Anesthesiology. 2005;103:A667.

116. Svennerholm L, Boström K, Jungbjer B. Changes in weight and compositions of major membrane components of human brain during the span of adult human life of Swedes. Acta Neuropathol. 1997;94(4):345-52.

117. Svennerholm L, Boström K, Jungbjer B, Olsson L. Membrane lipids of adult human brain: lipid composition of frontal and temporal lobe in subjects of age 20 to 100 years. J Neurochem. 1994;63(5):1802-11.

118. Grydeland H, Walhovd KB, Tamnes CK, Westlye LT, Fjell AM. Intracortical Myelin Links with Performance Variability across the Human Lifespan: Results from T1- and T2-Weighted MRI Myelin Mapping and Diffusion Tensor Imaging. J Neurosci. 2013;33(47):18618-30.

119. Haller S, Kövari E, Herrmann FR, Cuvinciuc V, Tomm AM, Zulian GB, Lovblad KO, Giannakopoulos P, Bouras C. Do brain T2/FLAIR white matter hyperintensities correspond to myelin loss in normal aging? A radiologic-neuropathologic correlation study. Acta Neuropathol Commun. 2013;1(1):14.

120. Peters A. The effects of normal aging on myelin and nerve fibers: a review. J Neurocytol. 2002;31(8-9):581-93.

121. Pan B, Fromholt SE, Hess EJ, Crawford TO, Griffin JW, Sheikh KA, Schnaar RL. Myelin-associated glycoprotein and complementary axonal ligands, gangliosides,

mediate axon stability in the CNS and PNS: neuropathology and behavioral deficits in single- and double-null mice. Exp Neurol. 2005;195(1):208-17.

122. Ohmi Y, Ohkawa Y, Yamauchi Y, Tajima O, Furukawa K, Furukawa K. Essential roles of gangliosides in the formation and maintenance of membrane microdomains in brain tissues. Neurochem Res. 2012;37(6):1185-91.

123. Craddock TJA, St. George M, Freedman H, Barakat KH, Damaraju S, Hameroff S, Tuszynski JA. Computational Predictions of Volatile Anesthetic Interactions with the Microtubule Cytoskeleton: Implications for Side Effects of General Anesthesia. PLoS ONE. 2012;7: e37251.

124. Simon W, Hapfelmeier G, Kochs E, Zieglgansberger W, Rammes G. Isoflurane blocks synaptic plasticity in the mouse hippocampus. Anesthesiology. 2001;94:1058–1065.

125. Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature. 1993;361:31–39.

126. Engelhardt T, Lowe PR, Galley HF, Webster NR. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase reduces isoflurane MAC and motor activity even in nNOS knockout miceBritish. Journal of Anaesthesia. 2006;96(3):361–6.

127. Kujirai ByT, Caramia MD, Rothwell JC, Day BL, Thomson PD, Ferbert A, Wroe S, Asselman P, Marsden CD. Corticocortical inhibition in human motor cortex. Journal of Physiology.1993;471:501-519.

128. Chiavegatto S, Sun J, Nelson RJ, Schnaar RL. A functional role for complex gangliosides: motor deficits in GM2/GD2 synthase knockout mice. Exp Neurol. 2000;166(2):227-34.

129. Sheikh KA, Sun J, Liu Y, Kawai H, Crawford TO, Proia RL, Griffin JW, Schnaar RL. Mice lacking complex gangliosides develop Wallerian degeneration and myelination defects. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(13):7532-7.

130. Sun J, Shaper NL, Itonori S, Heffer-Lauc M, Sheikh KA, Schnaar RL. Myelin-associated glycoprotein (Siglec-4) expression is progressively and selectively decreased in the brains of mice lacking complex gangliosides. Glycobiology. 2004;14(9):851-7.

131. Vyas AA, Patel HV, Fromholt SE, Heffer-Lauc M, Vyas KA, Dang J, Schachner M, Schnaar RL. Gangliosides are functional nerve cell ligands for myelin-associated glycoprotein (MAG), an inhibitor of nerve regeneration. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(12):8412-7.

132. Wang H, Li C, Wang H, Mei F, Liu Z, Shen HY, Xiao L. Cuprizone-induced demyelination in mice: age-related vulnerability and exploratory behavior deficit. Neurosci Bull. 2013;29(2):251-9.

133. Liu Y, Wada R, Kawai H, Sango K, Deng C, Tai T, McDonald MP, Araujo K, Crawley JN, Bierfreund U, Sandhoff K, Suzuki K, Proia RL. A genetic model of substrate deprivation therapy for a glycosphingolipid storage disorder. J Clin Invest. 1999;103(4):497-505.

134. Kato HK, Chu MW, Isaacson JS, Komiyama T. Dynamic sensory representations in the olfactory bulb: modulation by wakefulness and experience. Neuron. 2012;76(5):962-75.

135. Mawhinney LJ, de Rivero Vaccari JP, Alonso OF, Jimenez CA, Furones C, Moreno WJ, Lewis MC, Dietrich WD, Bramlett HM. Isoflurane/nitrous oxide anesthesia induces increases in NMDA receptor subunit NR2B protein expresion in the aged rat brain. Brain Res. 2012;1431:23-34.

136. Kong F, Chen Sh, Cheng Y, Ma L, Lu H, Zhang H. Minocycline Attenuates Cognitive Impairment Induced by Isoflurane Anesthesia in Aged Rats. PLOS one. 2013;8:e61385.

137. Wang Sh, Peretich K, Zhao Y, Liang G, Meng Q, Wei H. Anesthesia-induced neurodegeneration in fetal rat brains. Pediatr Res. 2009;66:435–440.

138. Zhao Y, Liang G, Chen Q, Joseph DJ, Meng Q, Eckenhoff RG, Eckenhoff MF, Wei H. Anesthetic-Induced Neurodegeneration Mediated via Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors. The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2010;333:14–22.

139. Jevtovic-Todorovic V, Boscolo A, Sanchez V, Lunardi N. Mini Reviw article. Anesthesia-induced developmental neurodegeneration: the role of neuronal organelles. 2012; 3:1-7.

140. Li Y, Liang G, Wang S, Meng Q, Wang Q, Wei H. Effects of fetal exposure to isoflurane on postnatal memory and learning in rats. Neuropharmacology. 2007;53:942–950.

141. Hasender R, starker L, Berkman J, Kellermann K, Jungwirth B, Blobner M, Eder M, Kochs E, Rammes G. Sevoflurane Anesthesia iproves Kognitive Performance in Mice, but Does not Influence *in vitro L*ong-Term Potentiation in Hippocampus CA1 Stratum Radiatum. PLOS one. 2013;8:e6732.

142. Cain D P. LTP, NMDA, genes and learning. Curr Opin Neurobiol. 1997;7:235–242.

143. Alkire MT, Nathan SV, McReynolds JR**.** Memory enhancing effect of low-dose sevoflurane does not occur in basolateral amygdala-lesioned rats. Anesthesiology. 2005;103:1167–1173.

144. Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. AnnuRevNeurosci. 2000;23:649–711.

145. Zhao Y, Liang G, Chen Q, Joseph DJ, Meng Q, Eckenhoff RG, Eckenhoff MF, Wei H. Anesthetic-Induced Neurodegeneration Mediated via Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors. The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2010;333:14–22.

146. Chen G, Gong M, Yan M, Zhang X. Sevoflurane Induces Endoplasmic Reticulum Stress Mediated Apoptosis in Hippocampal Neurons of Aging Rats. PLOS one. 2013;8: e57870.

147. Head BP, Patel HH, Insel PA. Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: Impact on signaling and function: Membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. Biochim Biophys Acta. 2013 Jul 27. pii: S0005-2736(13)00258-7. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.07.018. [Epub ahead of print].

148. Boukhris A, Schule R, Loureiro JL, Lourenço CM, Mundwiller E, Gonzalez MA, Charles P, Gauthier J, Rekik I, Acosta Lebrigio RF, Gaussen M, Speziani F, Ferbert A, Feki I, Caballero-Oteyza A, Dionne-Laporte A, Amri M, Noreau A, Forlani S, Cruz VT, Mochel F, Coutinho P, Dion P, Mhiri C, Schols L, Pouget J, Darios F, Rouleau GA, Marques W Jr, Brice A, Durr A, Zuchner S, Stevanin G. Alteration of ganglioside biosynthesis responsible for complex hereditary spastic paraplegia. Am J Hum Genet. 2013;93(1):118-23.

149. Papon M-A, Whittington RA, El-Khoury NB, Planel E. Alzheimer's disease and anesthesia. Frontiers in Neurosciens. review article. 2011;4:272.

150. *uvrhttp://www.alzheimersreadingroom.com/2011/10/study-links-surgery-and-anesthesia-with.htmledu na mozgu.*

151. Eckenhoff RG, Johansson JS, Wei H, Carnini A, Kang B, Wei W, Pidikiti R, Keller JM, Eckenhoff MF. Inhaled anesthetic enhancement of amyloid-beta oligomerization and cytotoxicity. Anesthesiology. 2004;101(3):703-9.

152. Mandal P K, Schifilliti D, Mafrica F, Fodale V. Inaled Anesthesia and cognitive performance. Drugs of Today. 2009; 45: 47-54.

153. Torkildsen O, Brunborg LA, Myhr KM, Bø L. The cuprizone model for demyelination. Acta Neurol Scand Suppl. 2008;188:72-76.

154. Veto S, Acs P, Bauer J, Lassmann H, Berente Z, Sumegi B, Komoly S, Gallyas F Jr, Illes Z. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) is activated in multiple sclerosis pattern III lesions and its inhibition prevents experimental demyelination and oligodendrocyte death. Journal of Neuroimmunology. 2010;22216-16.

155. Steelman AJ, Thompson JP, Li J. Demyelination and remyelination in anatomically distinct regions of the corpus callosum following cuprizone intoxication. Neurosci Res. 2012;72(1):32–42.

156. Koutsoudaki PN, Skripuletz T, Gudi V, Moharregh-Khiabani D, Hildebrandt H, Trebst C, Stangel M. Demyelination of the hippocampus is prominent in the cuprizone model. Neurosci Lett. 2009;451(1):83-8.

157. Franklin RJ. Why does remyelination fail in multiple sclerosis? Nat Rev Neurosci. 2002;3(9):705-14.

158. Silvestroff L, Bartucci S, Pasquini J, Franco P. Cuprizone-induced demyelination in the rat cerebral cortex and thyroid hormone effects on cortical remyelination. Exp Neurol. 2012;235(1):357-67.

159. Gudi V, Moharregh-Khiabani D, Skripuletz T, Koutsoudaki PN, Kotsiari A, Skuljec J, Trebst C, Stangel M. Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced demyelination. Brain Res. 2009;1283:127-38.

160. Collins BE, Kiso M, Hasegawa A, Tropak MB, Roder JC, Crocker PR, Schnaar RL. Binding specificities of the sialoadhesin family of I-type lectins. Sialic acid linkage and substructure requirements for binding of myelin-associated glycoprotein, Schwann cell myelin protein, and sialoadhesin. J Biol Chem. 1997;272(27):16889-95.

161. Collins BE, Yang LJ, Mukhopadhyay G, Filbin MT, Kiso M, Hasegawa A, Schnaar RL. Sialic acid specificity of myelin-associated glycoprotein binding. J Biol Chem. 1997;272(2):1248-55.

162. Heffer-Lauc M, Viljetić B, Vajn K, Schnaar RL, Lauc G. Effects of detergents on the redistribution of gangliosides and GPI-anchored proteins in brain tissue sections. J Histochem Cytochem. 2007;55(8):805-12.

163. Polak PE, Dull RO, Kalinin S, Sharp AJ, Ripper R, Weinberg G, Schwarz DE, Rubinstein I, Feinstein DE. Sevoflurane reduces clinical disease in mause model of multiple sclerosis. Journal of Neuroinflamation. 2012;9:272.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime:

Ozana Katarina Tot

Obrazovannje:

Doktor medicine

Specijalist anestezije, reanimacije i intenzivnog liječenja

Adresa:

Kuća/

Sprečanska 1, Brijest

31000 Osijek

Posao/

KBC Osijek

Josipa Huttlera 4

31000 Osijek

Telefon:

Mob/

099 69 43 285

Posao/

031 51 15 11

e-mail:

Ozana_katarina@yahoo.com

Ozana Katarina Tot rođena je 21.06.1971. u Novom Sadu u Vojvodini, gdje je provela dio svojih mlađih dana.

Pohađala je Prirodoslovno-matematičku gimnaziju „J.J. Zmaj“ u Novom Sadu, a uz srednjoškolsko obrazovanje pohađala je i dodatni smjer pomočnog istraživača u biologiji.

Studirala je na Medicinskom fakultetu u Novom sadu, a dijelom u Osijeku. Diplomirala je dana 28. lipnja 1999. god. na Medicinskom fakultetu u Osijeku. Liječnički pripravnički staž obavila je u Kliničkoj bolnici Osijek 1999/2000 god. nakon čega je položila državni ispit za doktora medicine 24.siječnja 2001. u Zagrebu. Prva radna iskustva stekla je u Hitnoj Medicinskoj Pomoći Đakovo i Osijek u razdoblju od 2001 do 2003 god.

Pohađala je Poslijediplomski znanstveni studij iz biomedicine i zdravstva 2003/2006 god.

Specijalizaciju iz anestezije i intenzivno liječenja započela je 2003/2007 god. u bolnici u Osijeku, gdje je obavila i specijalizantski staž, a specijalistički ispit uspješno položila 5.12.2007. u Zagrebu.

Učestvovala je na više međunarodnih i tuzemnih kongresa i poslijediplomskih tečajeva trajne izobrazbe liječnika.

Godine 2002 završila je tečaj liječenja akupunkturom, te nakon stečene licencu za samostalni rad ovom metodom liječenja uključena je u rad ambulante za liječenje boli pri Klinici za Anesteziju i intenzivno liječenje KBC Osijek. Član je Hrvatskog Društva liječenja boli i učestvuje u tečaju: „Akupunktura u kliničkoj praksi“.

Od 27. travnja 2009 god. uključena je u nastavu kao asistent na Katedri za Anesteziju i intenzivno liječenje Medicinskog fakultetu u Osijeku.

Trenutačno radi kao anesteziolog na Klinici za anesteziju i intenzivno liječenje Kliničkog bolničkog centra Osijek. Od 2010 god.u funkciji je pomoćnice bolničkog transplantacijskog koordinatora u postupku eksplantacije donora humanih organa, u sklopu čega je pohađala više tečajeva edukacije s međunarodnim sudjelovanjem u tuzemstvu i inozemstvu.

Učestvovala je u EUSOS (European Surgical Outcomes Study) studiji „Mortality after surgery Europe: a 7 day cohort study“ tijekom 2012. godine. Lancet, 2012; Vol 380: 1059-65.

Popis objavljenih znanstvenih i stručnih radova:

Kvolik S, Kristek J, Šakić K, Tot O K. Complikations of intercostal catheter analgesia vs. Intercostal nerve blockade for posthoracotomy pain relief. European Journal of Anaesthesiology. 2005; 34:104-105.

Tot O K, Ivić D, Došen G. Oporavak iz anestezije u bolesnika s kroničnom bubrežnom insuficijencijom. Pharmaca. 2005; 43:199-206.

Tot O K, Ivić D, Kvolik S, Pajtler M, Šagovac Z, Tot N, Pelc B. Effectiveness and side effects of unilateral vs. Bilateral spinal anaesthesia. Liječnički Vjesnik. 2005;127:149-150.

Tot O K, Ivić D, Ivić J, Šagovac Z, Pelc B. Abstract, Case report: Cardiac arrest after surgical operation in prone position. Neurologia Croatica. 2005;54:113.

Tot O K, Ivić D, Šagovac Z, Ivić J, Došen G. abstract, Recovery mechanism from anaesthesia in patient with renal failure. Neurologia Croatica. 2005;54:113-114.

Pavić R, Tvrdeić A, Tot O K, Heffer-Lauc M. Activity cage as a method to analyze functional recovery after sciatic nerve injury in mice. Somatosensory and Motor Research. 2007;24:213–219.

Pavić R, Pavić M L, Tot O K, Benešić M, Heffer-Lauc M. Side distinct sciatic nerve recovery differences between rats and mice. Somatosensory and Motor Research. 2008; 25:163–170.

Pavi R, Pavić M L, Tvrdeić A, Tot O K, Heffer M. Rat sciatic Nerve Crush Injury and Recovery Tracked by Plantar Test and Immunohistochemistry Analysis. Collegium Antropologicum. 2011;35:93-100.

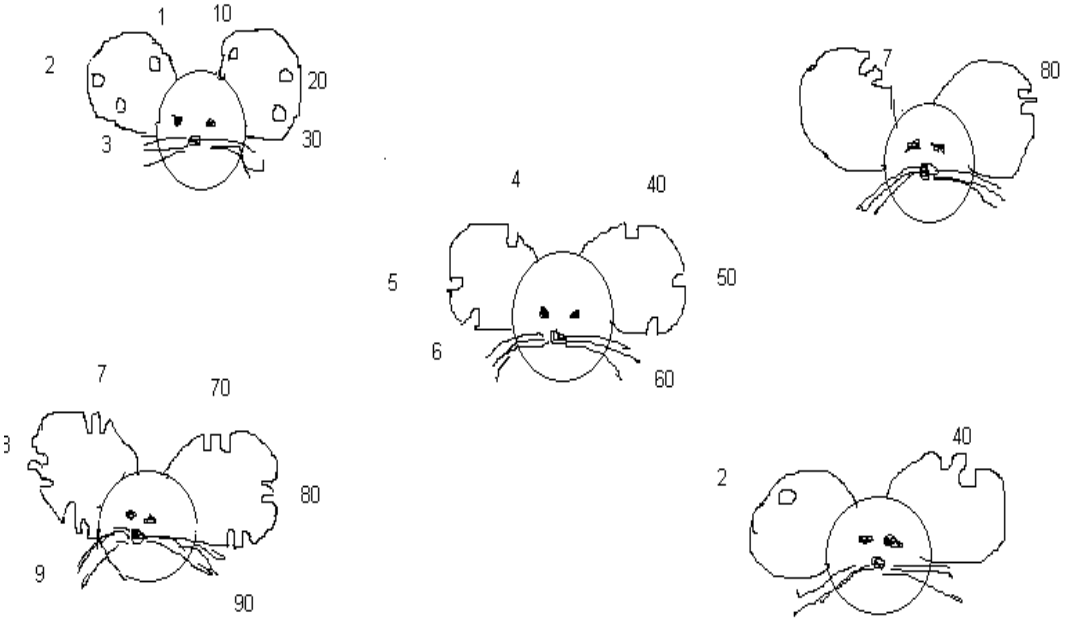
Ružman T., Tot O. K., Ivić D., Gulam D., Ružman N., Burazin J. In-hospital cardiac arrest: can we change something?. Wiener Klinische Wochenschrift, 2013;125:516-523.

PRILOZI

1. MARKIRANJE METODOM KONTINUIRANE SERIJE BROJEVA
2. KARAKTERISTIKE SKUPINA MIŠEVA UKLJUČENIH U ISTRAŽIVANJE
3. BBB SKALA (Basso-Beatie-Bresnahen locomotor rating scale)

1. MARKIRANJE METODOM KONTINUIRANE SERIJE BROJEVA

Radi prepoznavanja životinje su označene urezom/rupicom na lijevom i/ili desnom uhu metodom Univerzalnog sustava označavanja miševa (Universal Mouse Numbering System, Dickie, MM 1975. Keeping Records, Biology of the Laboratory Mouse).



2. KARAKTERISTIKE SKUPINA MIŠEVA UKLJUČENIH U ISTRAŽIVANJE

br.miša	Br.kaveza	spol	BBB	masa/g	lokacija	tip miša
1c	I	f	17	16,39	Osijek	WT kuprizon 3mj
2c	I	f	17	15,52	Osijek	WT kuprizon 3mj
3c	I	f	17	16,37	Osijek	WT kuprizon 3mj
4c	I	f	17	15,87	Osijek	WT kuprizon 3mj
1c	II	m	17	18,17	Osijek	WT kuprizon 3mj
2c	II	m	17	18,54	Osijek	WT kuprizon 3mj
3c	II	m	17	17,38	Osijek	WT kuprizon 3mj
4c	II	m	17	18,35	Osijek	WT kuprizon 3mj
1c	III	f	17	20,6	Rijeka	WT kuprizon 3mj
2c	III	f	17	18,85	Rijeka	WT kuprizon 3mj
3c	III	f	17	20,25	Rijeka	WT kuprizon 3mj
4c	III	f	17	20	Rijeka	WT kuprizon 3mj
1c	IV	f	17	21,6	Rijeka	WT kuprizon 3mj
2c	IV	f	17	20,9	Rijeka	WT kuprizon 3mj
3c	IV	f	17	21	Rijeka	WT kuprizon 3mj
4c	IV	f	17	19,4	Rijeka	WT kuprizon 3mj
1k	I	f	21	21,25	Rijeka	WT kuprizon 3mj
2k	I	f	21	21,1	Rijeka	WT kuprizon 3mj
3k	I	f	21	21,1	Rijeka	WT kuprizon 3mj
4k	I	f	21	20,2	Rijeka	WT kuprizon 3mj
1k	II	f	21	21	Rijeka	WT kuprizon 3mj
2k	II	f	21	21,5	Rijeka	WT kuprizon 3mj
3k	II	f	21	21,7	Rijeka	WT kuprizon 3mj
4k	II	f	21	19,2	Rijeka	WT kuprizon 3mj
V1	1	F	21	23.00	Osijek	WT 6mj
V2	1	F	21	22.74	Osijek	WT 6mj
V3	1	F	21	22.00	Osijek	WT 6mj
V4	1	F	21	20.66	Osijek	WT 6mj
V5	1	F	21	18.16	Osijek	WT 6mj

V6	1	F	21	23.54	Osijek	WT 6mj
V7	2	F	21	20.28	Osijek	WT 6mj
V8	2	F	21	22.37	Osijek	WT 6mj
V9	2	F	21	21.16	Osijek	WT 6mj
V10	2	F	21	18.00	Osijek	WT 6mj
V11	2	F	21	20.87	Osijek	WT 6mj
V12	2	F	21	20.61	Osijek	WT 6mj
V13	9	M	21	32.61	Osijek	WT 6mj
G1	3	F	12	21.87	Osijek	B4Galnt1 12 mj
G2	3	F	12	25.61	Osijek	B4Galnt1 12 mj
G3	3	F	12	19.00	Osijek	B4Galnt1 12 mj
G4	3	F	12	22.36	Osijek	B4Galnt1 12 mj
G5	3	F	12	21.87	Osijek	B4Galnt1 12 mj
G6	4	M	12	20.94	Osijek	B4Galnt1 12 mj
G7	4	M	12	20.64	Osijek	B4Galnt1 12 mj
G8	4	M	12	20.57	Osijek	B4Galnt1 12 mj
G9	4	M	12	30.92	Osijek	B4Galnt1 12 mj
G10	5	M	12	25.88	Osijek	B4Galnt1 12 mj
G11	5	M	12	34.31	Osijek	B4Galnt1 12 mj
G12	5	M	12	30.13	Osijek	B4Galnt1 12 mj
G13	5	M	12	32.61	Osijek	B4Galnt1 12 mj
M1	6	F	21	15.48	Osijek	WT 3mj
M2	6	F	21	19.21	Osijek	WT 3mj
M3	6	F	21	15.36	Osijek	WT 3mj
M4	6	F	21	16.68	Osijek	WT 3mj
M5	6	F	21	19.20	Osijek	WT 3mj
M6	6	F	21	16.84	Osijek	WT 3mj
M7	6	F	21	17.24	Osijek	WT 3mj
M8	6	F	21	17.56	Osijek	WT 3mj
M9	7	M	21	26.24	Osijek	WT 3mj
M10	7	M	21	21.28	Osijek	WT 3mj
M11	7	M	21	24.64	Osijek	WT 3mj
M12	7	M	21	21.26	Osijek	WT 3mj

M13	8	M	21	24.55	Osijek	WT 3mj
M14	8	M	21	22.00	Osijek	WT 3mj
M15	8	M	21	23.00	Osijek	WT 3mj
1	III	M	19	24.86	Pecsuh	B4Galnt 3 mj
1	I	M	19	33.60	Pecsuh	WT 12 mj
2	I	M	21	30.99	Pecsuh	WT 12 mj
1	II	F	21	32.43	Pecsuh	WT 12 mj
2	II	F	21	27.65	Pecsuh	WT 12 mj

U istraživanje je uključeno, 47 ženki i 23 mužjaka, ukupno 70 miševa srednje tjelesne mase 21,7g (15,36g - 34,41g). Skupina od 14 (5 ženki i 9 mužjaka) miševa *B4galnt1* , 40 (30 ženki i 10 mužjaka) miševa WT i 16 (14 ženki i 10 mužjaka) WT miševa tretiranih kelatorom bakra, Kuprizonom.

Iz nastambe za životinje Medicinskog fakulteta Osijek je 49 miševa, 16 iz Vivarija Medicinskog fakulteta Rijeka i 5 iz Vivarija Medicinskog fakulteta Pecsuh, Mađarska.

3. BBB SKALA (Basso-Beatie-Bresnahen locomotor rating scale)

Grubi motorički status miša procjenjuje se bodovanjem od 0 do 2 s najvećim brojem bodova 22 i to svake ponaosob slijedećih osobina:

1. plantarni korak
2. stabilnost trupa
3. podizanje repa
4. predominantna pozicija šape
5. pokreti lijeva stražnja šapa-lijeva prednja šapa
6. odupiranje o podlogu
7. stabilnost hoda
8. dorzalni korak
9. razmak prstiju
10. položaj stražnjih nogu
11. tremor trupa životinje

Bodovanje lokomotornog sustava miševa primjenom BBB (Basso, Journal of Neurotrauma, 1995) skale pokazuje najnižu vrijednosti 12 kod miševa *B4galnt1*, 17 kod WT miševa tretiranih kelatorom bakra Kuprizonom, a najveće vrijednosti 22 je kod WT miševa.