

Posljedice neonatalne hipoksije na ponašanje štakora

Krizman, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:728172>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Matea Krizman

POSLEDICE NEONATALNE HIPOKSIJE NA PONAŠANJE ŠTAKORA

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad je dio istraživanja koje je inicirano, osmišljeno, financirano i provedeno u svrhu projektnog cilja „Razvoj novih eksperimentalnih in vivo modela" u okviru Znanstvenog centra izvrsnosti - Neuro (projekt „Eksperimentalna i klinička istraživanja hipoksijsko-ishemijskog oštećenja mozga u perinatalnoj i odrasloj dobi" (KK.01.1.1.01.0007, voditelja prof. dr.sc. Miloša Judaša) i projekta „Moždani izvanstanični matriks u razvitku i perinatalnoj hipoksiji" (HRZZ, IP-2019-04-3182, voditeljice prof.dr.sc. Nataše Jovanov Milošević), kojih je nositelj Medicinski fakultet, a na kojima je prof.dr.sc. Dubravka Hranilović suradnik.

Uzgoj, selekciju štakora i „in vivo" pokuse hipoksije, perinatalna biometrijska mjerenja i postnatalni monitoring štakora u Odsjeku za laboratorijske životinje na HIIM Medicinskog fakulteta u Zagrebu te izolaciju moždanih regija za daljnje molekularne i analize ekspresije gena u moždanom tkivu, izvela je Sara Trnski, dr.vet.med. temeljem projekta HrZZ „Razvoj karijere doktoranda" (DOK 2018-01-3771) pod mentorstvom prof.dr.sc. Nataše Jovanov Milošević u okviru projekata „Eksperimentalna i klinička istraživanja hipoksijsko-ishemijskog oštećenja mozga u perinatalnoj i odrasloj dobi“, (KK.01.1.1.01.0007HRZZ) i „Moždani izvanstanični matriks u razvitku i perinatalnoj hipoksiji" (IP-2019- 04-3182).

Svi in vivo pokusi i uzorkovanja na životinjama za navedena istraživanja odobreni su 2019. od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta (Ur.br. 380-59-10106-19-111/210) i Etičkog povjerenstva za zaštitu životinja koje se koriste u znanstvene svrhe Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (EP231/2019; UP/1-322-01/19.01/75, voditelj pokusa dr. Sara Trnski), a sukladno odredbama Zakona o zaštiti životinja (102/17 i 32/19) i Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN55/13; 39/17; 116/119).

Diplomski rad izrađen je pod neposrednim mentorstvom prof.dr.sc. Dubravke Hranilović u Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovna-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

POSljedICE NEONATALNE HIPOKSIJE NA PONAŠANJE ŠTAKORA

Matea Krizman

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

SAŽETAK

Prenatalna hipoksija stanje je smanjene opskrbe fetalnih tkiva kisikom koje može dovesti do oštećenja organa s dugoročnim posljedicama. Kod oštećenja mozga može doći do mentalne retardacije, cerebralne paralize, epilepsije i poremećaja ponašanja. Zbog toga se radi velik broj istraživanja u kojima važnu ulogu imaju animalni modeli, od kojih se najčešće koristi štakor. U neonatalnog štakora, stadij razvoja mozga odgovara stadiju razvoja mozga fetusa čovjeka od 23. do 34. tjedna trudnoće, kad najčešće dolazi do problema s hipoksijom. Dosadašnja istraživanja koristila su invazivne modele hipoksije kod kojih je ponekad teško zaključiti je li neka promjena rezultat hipoksije ili samog operacijskog zahvata. Stoga je cilj ovog istraživanja bio razviti neinvazivni model te utvrditi postoje li promjene u lokomotiji, anksioznom, eksploratornom i socijalnom ponašanju te učenju u mladim štakora, izloženih hipoksiji u normobaričnoj komori prvog postnatalnog dana. U ovom smo diplomskom radu mladunce štakora od 33. do 45. postnatalnog dana podvrgnuli bateriji testova ponašanja: otvoreno polje, ploča s rupama, T-labirint i društveni odabir. Razina lokomotornog gibanja, anksiozno i eksploratorno ponašanje nisu se razlikovali između skupina. U odnosu na kontrolnu skupinu, skupina izložena hipoksiji imala je značajno manji broj točnih odabira u T-labirintu, a mužjaci i produljeno vrijeme istraživanja druge jedinice u testu društvenog odabira. Rezultati upućuju na zaključak da neonatalno izlaganje štakora hipoksiji smanjuje sposobnost prostornog učenja i povećava socijalnost u mužjaka.

(32 stranice, 19 slika, 38 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: normobarična komora, neinvazivni model, socijalno ponašanje, prostorno učenje, T-labirint

Voditelj: Dr. sc. Dubravka Hranilović, red. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Dubravka Hranilović, red. prof., Dr. sc. Božena Mitić, red. prof., Dr. sc. Jasna Lajtner, izv. prof.

Rad prihvaćen: 28.02.2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

CONSEQUENCES OF NEONATAL HYPOXIA ON RAT BEHAVIOR

Matea Krizman

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

ABSTRACT

Prenatal hypoxia is a state of reduced oxygen supply to fetal tissue that can lead to organ damage with long-term consequences. Brain damage can lead to mental retardation, cerebral palsy, epilepsy and behavioral disorders. For this reason, a large amount of research has been done on animal models, especially rats. In the neonatal rat, the stage of brain development matches the stage of brain development in the human fetus from the 23rd to the 34th week of pregnancy, when problems with hypoxia most often occur. Disadvantage of previously used invasive models of hypoxia is a difficulty to conclude whether the observed changes are the result of hypoxia or the operation itself. Therefore, the aim of this study was to develop a non-invasive model and to determine possible changes in locomotion, anxiety-like, exploratory and social behavior, and learning in young rats exposed to hypoxia in the normobaric chamber on the first postnatal day. In this study, young rats underwent the battery of behavioral tests: open field, hole board, T-maze and social choice, from the 33rd to the 34th postnatal day. The level of locomotion, anxiety-like and exploratory behavior did not differ between the groups. Compared to the control group, the hypoxia-exposed group had a significantly smaller number of correct choices in the T-maze. In addition males from the experimental group displayed prolonged research time of the conspecific in the social choice test. The findings suggest that the exposure of neonatal rats to hypoxia reduces the ability of spatial learning and increases the sociability in males.

(32 pages, 19 figures, 38 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: normobaric chamber, non-invasive model, social behavior, spatial learning, T-maze

Supervisor: Dr. Dubravka Hranilović, Prof.

Reviewers: Dr. Dubravka Hranilović, Prof., Dr. Božena Mitić, Prof., Dr. Jasna Lajtner, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 28.02.2019.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Hipoksija	1
1.1.1. Fetalna hipoksija	1
1.1.2. Uzroci hipoksije	2
1.1.3. Posljedice hipoksije.....	3
1.1.4. Hipoksično-ishemična encefalopatija	5
1.2. Animalni modeli hipoksije.....	8
1.2.1. Invazivni modeli hipoksije.....	9
1.2.2. Neinvazivni modeli hipoksije	10
2. Cilj istraživanja	12
3. Materijali i metode	13
3.1. Materijali.....	13
3.1.1. Životinje	13
3.1.2. Aparatura.....	13
3.2. Metode	15
3.2.1. Testiranje u otvorenom polju	16
3.2.2. Testiranje na ploči s rupama	16
3.2.3. Testiranje u T-labirintu	16
3.2.4. Test društvenog odabira	16
3.3. Statistička obrada podataka.....	17
4. Rezultati	18
4.1. Test otvorenog polja.....	18
4.2. Test ploče s rupama.....	20
4.3. Test T-labirinta.....	21
4.4. Test društvenog odabira	22
5. Rasprava.....	24
6. Zaključak.....	27
7. Literatura.....	28
8. Životopis	31

POPIS KRATICA

ATP – adenzin trifosfat

BOK – bilateralna okluzija karotide

CIH – kronična intermitentna hipoksija (eng. *Chronic-Intermittent Hypoxia*)

HI – hipoksija-ishemija

HIE – hipoksično-ishemična encefalopatija

IUGR – intrauterini zastoj u rastu (eng. *Intrauterine Growth Restriction*)

NMDA – N-metil-D-asparaginska kiselina

PND – postnatalni dan

Pre-OL – preoligodendrociti

PVL – paraventrikularna leukomalacija

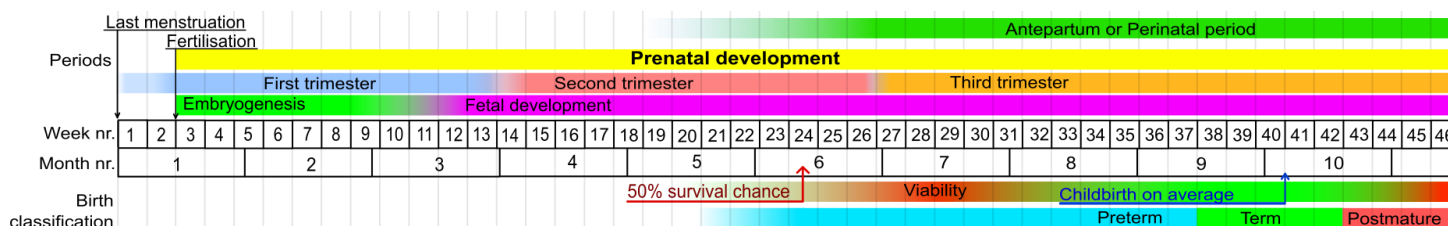
1. Uvod

1.1. Hipoksija

Hipoksija je stanje relativnog nedostatka kisika u zraku ili tkivima, a ishemija nedovoljan protok krvi kroz tkiva i organe, u ovom slučaju insuficijentan cerebralni protok krvi. Pošto se ishemija uglavnom javlja istovremeno s hipoksijom, na staničnoj razini često se koristi izraz hipoksično-ishemična ozljeda zbog intimne prirode ovih dviju komponenti u posredovanju cerebralne ozljede kod novorođenčadi. Hipoksemija se odnosi na stanje nedostatka kisika u arterijskoj krvi i na staničnoj razini. Asfiksija se odnosi na poremećaj izmjene respiratornih plinova i posljedično povišeni $p\text{CO}_2$ te acidozu u kombinaciji s hipoksijom. Zajednička svim mehanizmima (hipoksemija, ishemija i/ili asfiksija) je hipoksija i poremećaji u staničnom metabolizmu (Volpe i sur., 2018).

1.1.1. Fetalna hipoksija

Prenatalno razdoblje je vrijeme od začeća do rođenja, pri čemu se prva dva mjeseca označavaju kao embrionalno razdoblje, na koje se nadovezuje fetalno razdoblje koje traje do rođenja djeteta (Madrešić, 2013). Perinatalno razdoblje odnosi se na period od završenog 22. tjedna trudnoće (154 dana) do 7 dana nakon poroda. Porođaj može biti: prijevremen (eng. *preterm*) kada je završeno manje od 37 tjedana (manje od 259 dana) trudnoće; na vrijeme (eng. *term*) u periodu od 37 završenih tjedana do manje od 42 tjedna (259 do 293 dana) trudnoće; i kasniji (eng. *postterm*) kada je završeno 42 tjedna trudnoće ili više (294 dana ili više) (Slika 1.1) (WHO, 2001).



Slika 1.1 Tijek razvoja fetusa (https://en.wikipedia.org/wiki/Prenatal_development)

Fetalna hipoksija je stanje smanjene opskrbe fetusa kisikom, a njezina posljedica je poremećaj u funkciji organa, organskih sustava i stanica. U stanju fetalne hipoksije najugroženiji su organi koji troše najviše kisika, a to su srce, nadbubrežne žlijezde i mozak (Đelmiš i Orešković, 2014). Intrauterina hipoksija povezana je s različitim stanjima majke, placente i fetusa koji se mogu manifestirati različito i imaju različite ishode. Predloženo je da se hipoksična stanja tijekom trudnoće klasificiraju u 3 podtipa: 1) preplacentalna hipoksija, gdje su i majka i fetus hipoksični; 2)

uteroplacentalna hipoksija, gdje je oksigenacija majke normalna, ali je smanjena uteroplacentalna cirkulacija; te 3) postplacentalna hipoksija, gdje je samo fetus hipoksičan (Hutter i sur., 2010).

Perinatalna asfiksija je složeno stanje koje se najčešće definira kao poremećaj izmjene respiracijskih plinova u posteljici fetusa tijekom porođaja. Iako sama riječ asfiksija znači „bez pulsa“ (grčki: *a* - ne + *sphygmos* - kucanje bila), asfiksija u kliničkom smislu znači stanje novorođenčeta odmah nakon rođenja gdje dijete ne diše, ali ima očuvan ili oslabljen puls. Također se asfiksija može definirati i kao stanje narušene izmjene plinova, koje je obilježeno porastom razine laktata, ugljikovog dioksida i drugih otpadnih tvari, kao i značajnim smanjenjem koncentracije kisika u krvi. Dok se pojam asfiksija uglavnom koristi za zajedničko stanje hipoksije, hiperkapnije (povećana razina ugljikovog dioksida u krvi) i acidoze, pojam hipoksija se odnosi na stanja nedostatka kisika bez prateće acidoze (Šumanović-Glamuzina, 2007). U novije vrijeme, umjesto pojma perinatalne asfiksije, sve se češće koristi pojam hipoksično-ishemičke encefalopatije (HIE) novorođenčadi. U donošene novorođenčadi HIE jedan je od najvažnijih uzroka perinatalne ozljede mozga koja može dovesti do smrti ili ostaviti trajne posljedice na neuralni razvoj djeteta kao što su cerebralna paraliza, umna zaostalost, smetnje vida, smetnje sluha ili epilepsija. Učestalost perinatalne asfiksije u razvijenim zemljama je 2-6 na 1000 donošene novorođenčadi dok se u oko četvrtine do polovice asfiktične novorođenčadi razvije umjereno teška ili teška hipoksično-ishemična encefalopatija. U slabije razvijenim zemljama incidencija je do deset puta veća (Madrešić, 2013). Smatra se da metabolički poremećaji koji dovode do oksidativnog stresa, upalnih čimbenika i ekscitotoksičnosti mogu, uz genske faktore, pridonijeti ozljedi mozga nakon HIE. Klinička i eksperimentalna istraživanja pokazuju da HIE nije samo jedan "događaj" već proces koji se razvija. Klinički znakovi HIE odražavaju kaskadu molekularnih događaja koji su potaknuti početnim inzultom (Fatemi i sur., 2009).

1.1.2. Uzroci hipoksije

Kako navode Hutter i suradnici (2010), fetalna se hipoksija može podijeliti na tri tipa: preplacentalnu, postplacentalnu i uteroplacentalnu. Najvažniji uzroci preplacentalne hipoksije su hipoksična okolina (npr. visoka nadmorska visina) ili već postojeće bolesti majke (npr. zatajenje srca, plućna hipertenzija, cijanotična srčana greška). Do hipoksije majke *de novo* tijekom same trudnoće može doći zbog anemije, infekcije i kroničnih upalnih bolesti što također ograničava oksigenaciju i majke i fetusa. Postplacentalna hipoksija može biti posljedica smanjenog protoka krvi kroz uterinu arteriju (npr. zbog rupture, mehaničke kompresije, tromboze), progresivnog zatajenja fetalnog srca (npr. zbog potpunog srčanog bloka, kongenitalne malformacije srca) ili

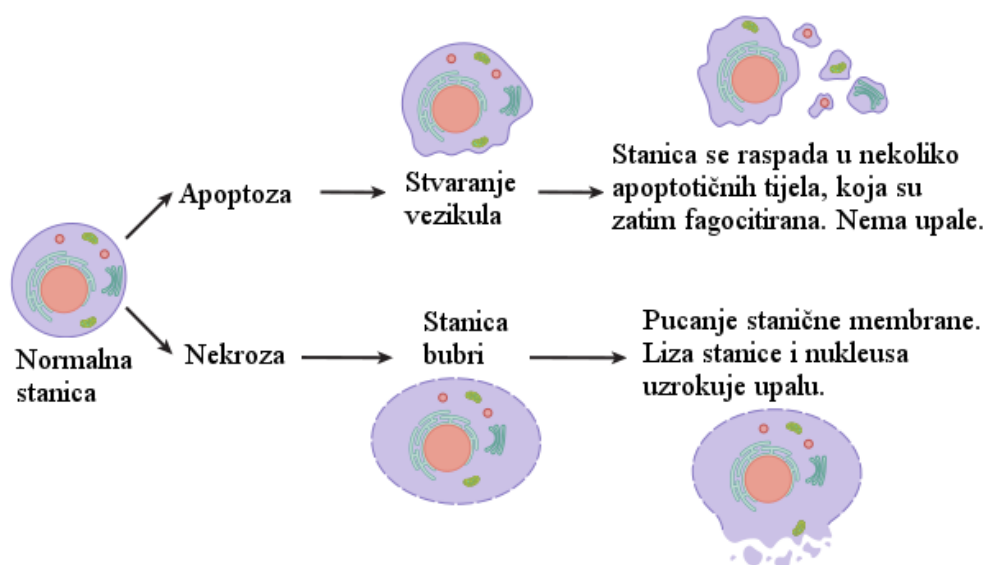
različitih genskih poremećaja. Najčešći uzroci fetalne hipoksije su upravo na razini posteljice. Uteroplacentalna hipoksija povezana je s abnormalnom placentacijom u ranoj trudnoći, a kasnije s vaskularnim abnormalnostima posteljice. U trudnoćama s intrauterinim zastojem u rastu (IUGR - eng. *intrauterine growth restriction*), gestacijskom hipertenzijom i preeklampsijom često dolazi do abnormalne placentacije (Hutter i sur., 2010).

1.1.3. Posljedice hipoksije

Glavni proces u hipoksiji je preraspodjela protoka krvi u korist vitalnih organa. Prvo dolazi do vazokonstrikcije i smanjenja protoka krvi kroz „periferni“ dio krvožilnog sustava (bubrezi, probavni trakt, koža i mišići). Nakon toga u ograničenom vremenskom periodu dolazi do porasta sistemskog krvnog tlaka što omogućuje dovoljnu perfuziju mozga, miokarda i nadbubrežnih žlijezda (tzv. faza cirkulacijske kompenzacije). U slučaju dugotrajne hipoksemije periferna vazokonstrikcija dovodi do opterećenja miokarda i smanjenja dotoka krvi u desnu pretklijetku. Posljedica toga je smanjenje srčanog minutnog volumena, sistemska hipotenzija i razvoj ishemije u svim organima (tzv. faza cirkulacijske dekompenzacije). U fazi cirkulacijske dekompenzacije dolazi do brojnih organskih oštećenja i kao posljedica nastaje multiorganski postasfiktični sindrom koji dovodi do oštećenja pojedinog sustava ili češće kombinacije oštećenja više sustava. U preko 35% oboljelih postoje znakovi disfunkcije središnjeg živčanog sustava (Šumanović-Glamuzina, 2007).

Hipoksija ima utjecaj i na staničnoj i molekularnoj razini. Nedostatak kisika i hranjivih tvari dovodi do smrti stanica. Razlikuju se dva temeljna načina stanične smrti u živčanom sustavu, kao i u drugim tkivima: nekroza i apoptoza (Slika 1.2). Danas je poznato da hipoksično-ishemijski inzulti mogu dovesti do nekroze ili apoptoze, ili češće kontinuuma, ovisno prvenstveno o težini inzulta i stanju sazrijevanja stanice. Određene karakteristike jasno razlikuju ova dva oblika stanične smrti. Tako je nekrotična stanična smrt karakterizirana bubrenjem stanica, dezintegracijom membrane, pucanjem stanica, oslobađanjem intracelularnog sadržaja i, posljedično, upalom i fagocitozom. Suprotno tome, apoptozu karakterizira kondenzacija i marginacija kromatina, skupljanje stanica, relativno očuvanje staničnih membrana i smrt bez upale. Nekrotična smrt stanice događa se tipično nakon intenzivnih, ponekad relativno kratkih inzulta, dok se apoptotska smrt stanica događa tipično nakon manje intenzivnih, duže djelujućih inzulta. Čini se da je apoptotska stanična smrt dominantan oblik tzv. odgođene stanične smrti, koja se može opaziti nakon nekoliko sati do nekoliko dana u različitim eksperimentalnim neonatalnim modelima i ljudskom mozgu. Važna intrinzična svojstva same stanice određuju način stanične smrti koji se posebno odnosi na razvojni stadij stanice. Pažljivo proučavanje neonatalne prasadi podvrgnute hipoksiji-ishemiji pokazalo je u istoj paradigmi

isključivo nekrotičnu staničnu smrt u određenim neuronskim populacijama i nekrozu i apoptozu u drugim neuronskim populacijama, ali isključivo apoptotsku staničnu smrt u nezreloj cerebralnoj bijeloj tvari. Često rana stanična smrt djeluje nekrotično, a kasnija stanična smrt apoptotično (Fatemi i sur., 2009; Volpe i sur., 2018).



Slika 1.2 Shema nekrotične i apoptotične stanične smrti (prema Volpe i sur., 2018)

Hipoksija također narušava stanični metabolizam na mnogo različitih načina. Glavnu ulogu ima ograničena rezerva glikogena. U normalnom stanju ATP daje energiju neuronskoj membranskoj pumpi koja drži unutarstaničnu koncentraciju kalija visokom, a natrija, kalcija i klora niskom. Ta ionska segregacija je fiziološka baza za interneuronsku komunikaciju. Kod nedostatka glukoze i kisika dolazi do poremećaja svih procesa ovisnih o ATP-u. Pri potpunoj hipoksiji/ishemiji stanica potroši sav svoj glikogen i sve zalihe ATP-a unutar 10 minuta. Nakon toga stanica se prebacuje na anaerobni metabolizam koji dovodi do sniženja pH. Bez ATP-a rad ionske pumpe je poremećen što dovodi do ulaska natrija i klora u stanicu uz pasivan ulazak vode. Rezultat je citotoksični unutarstanični edem zbog kojeg stanica bubri, puca i oslobađa svoj citosol u intersticijski prostor (Šumanović-Glamuzina, 2007; Volpe i sur., 2018).

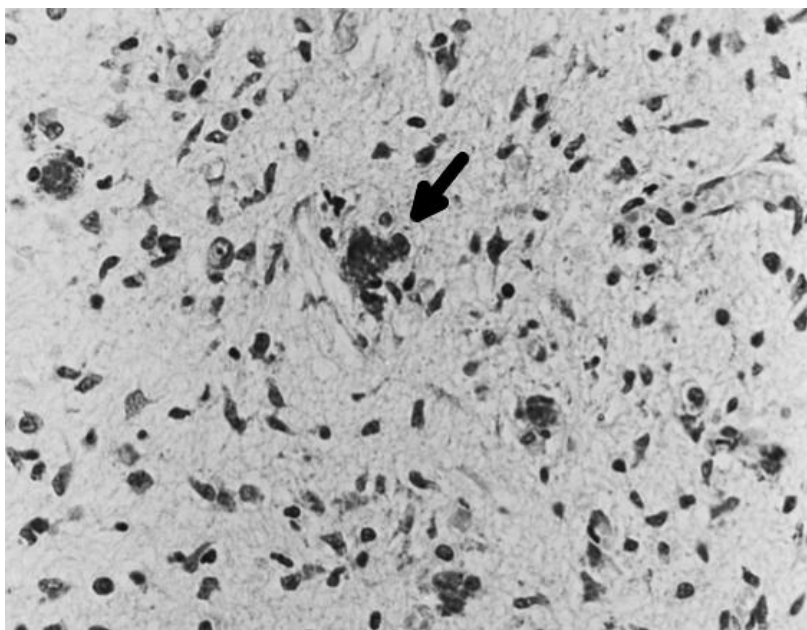
Proces koji je također važan za hipoksično-ishemičnu ozljedu je ekscitotoksičnost. On često dovodi do smrti stanice zbog pretjerane stimulacije ekscitacijskim aminokiselinama. Tijekom razvoja mozga ekscitotoksičnost ima puno veći utjecaj na neurone nego kod odraslog mozga. Za vrijeme hipoksije/ishemije u neuronima dolazi do prolongirane depolarizacije membrane koja u nekim

neuronskim populacijama vodi do oslobađanja ekscitacijskih aminokiselina, od kojih su najznačajnije glutamat i aspartat. Glutamat je najzastupljenija ekscitacijska aminokiselina u mozgu i citotoksična je za neurone. Tijekom hipoksije dolazi do depolarizacije glutamatergičkih neurona, ulaska kalcija u stanicu i otpuštanja glutamata. Daljnji pad ATP-a dovodi do održavanja povećane koncentracije glutamata u sinapsi što uzrokuje prolongiranu stimulaciju receptora. Glutamat ima barem četiri tipa receptora na postsinaptičkom neuronu, a receptor NMDA (N-metil-D-asparaginska kiselina) je posebno važan za mozak u razvoju. Ovaj receptor je važan i kao esencijalna komponenta učenja i pamćenja, ali je i bazični mehanizam hipoksično-ishemične ozljede (Johnson i sur., 2001; Šumanović-Glamuzina, 2007; Fatemi i sur., 2009).

Nekroza neurona je glavna posljedica hipoksično-ishemične encefalopatije. HIE se može klasificirati kao fokalna i kao globalna ozljeda mozga. Fokalna HIE je posljedica embolijske ili trombotičke okluzije cerebralnih arterija, inflamacijske vaskulopatije ili cerebralne hemoragije. Globalna HIE je rezultat bilo kojeg poremećaja koji dovodi do narušavanja cirkulacije cijelog mozga. Kod potpune okluzije dolazi do brze smrti neurona i glija stanica u pogođenoj regiji te je proces ireverzibilan, dok kod nepotpune ishemije obično dolazi do kratkotrajnog poremećaja dotoka kisika i nutrijenata do stanice te nakupljanja toksičnih produkata u stanici (citotoksični efekt hipoksije). Nepotpuna ishemija je reverzibilan proces ako se poboljša doprema kisika i glukoze do stanice. U suprotnome, započinje progresivna patofiziološka kaskada koja obično ubija i neurone i glija stanice, pri čemu su neuroni osjetljiviji (Šumanović-Glamuzina, 2007).

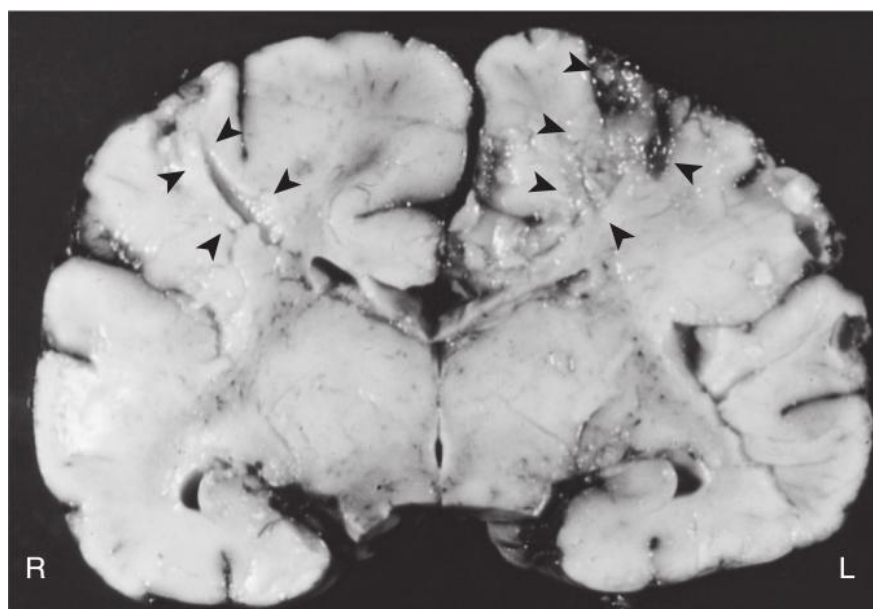
1.1.4. Hipoksično-ishemična encefalopatija

Neuropatološka obilježja neonatalne HIE značajno se razlikuju ovisno o gestacijskoj dobi djeteta, prirodi inzulta, vrstama intervencija i drugim čimbenicima koji se još trebaju definirati. Ipak, mogu se prepoznati određene osnovne lezije. Lezije do kojih dolazi tijekom HIE su: selektivna neuronska nekroza, parasagitalna ozljeda mozga, periventrikularna leukomalacija i fokalna (i multifokalna) ishemična nekroza mozga. Selektivna neuronska nekroza je najčešća vrsta ozljede u neonatalnoj hipoksično-ishemičnoj encefalopatiji. Pojam se odnosi na nekrozu neurona u karakterističnoj, iako često široko rasprostranjenoj, distribuciji (Slika 1.3). Topografija neuronske povrede u velikoj mjeri ovisi o ozbiljnosti i vremenskim karakteristikama inzulta i gestacijskoj dobi djeteta (Volpe i sur., 2018).



Slika 1.3 Selektivna nekroza neurona. Nekrotični neuron označen je strelicom, većina ostalih stanica su reaktivni astrociti i mikroglije (Volpe i sur., 2018)

Parasagitalna ozljeda mozga odnosi se na leziju moždane kore i subkortikalne bijele tvari s karakterističnom distribucijom (Slika 1.4). Ozljeda je bilateralna i, iako je obično simetrična, može biti upečatljivija u jednoj hemisferi u odnosu na drugu. Posteriorne regije moždane hemisfere, osobito parijeto-okcipitalne regije, jače su pogođene nego anteriorne. Parasagitalna cerebralna ozljeda karakterizirana je nekrozom korteksa i susjedne bijele tvari (Volpe i sur., 2018).



Slika 1.4 Parasagitalna ozljeda mozga. Područja nekroze moždanog korteksa i subkortikalne bijele tvari u parasagitalnim regijama označena su strelicama (Volpe i sur., 2018)

Središnje obilježje encefalopatije nedonoščadi je periventrikularna leukomalacija (PVL). Ta je lezija glavna komponenta encefalopatije bijele tvari i definirana je kao fokalna periventrikularna nekroza povezana s difuznijom reaktivnom gliozom i mikroglijalnom aktivacijom u okolnoj cerebralnoj bijeloj tvari. Tako PVL ima dvije komponente, fokalnu i difuznu. Povezana je s nepovoljnim kardiorespiratornim događajima i cerebralnom ishemijom u pogođene novorođenčadi, s fokalnim lezijama koje se očito pojavljuju u dubokim arterijskim graničnim zonama i krajnjim zonama u periventrikularnoj bijeloj tvari (Slika 1.5) (Volpe i sur., 2018; Volpe, 2009).



Slika1.5 Topografija pojavljivanja periventrikularne leukomalacije. Lezija se javlja u dubokim arterijskim graničnim zonama u periventrikularnoj bijeloj tvari (dijelovi označeni crnom bojom) (Volpe i sur., 2018)

Budući da se inzulti događaju u vrijeme brzog rasta mozga, postoji mogućnost utjecaja na niz razvojnih programa, što rezultira nedostacima u sazrijevanju koji u konačnici uzrokuju nastanak lezije (npr. hipoksično-ishemijska povreda koja dovodi do gubitka preoligodendrocita (pre-OL) i kasnije narušenog sazrijevanja, kao posljedicu ima narušenu mijelinizaciju). Uzrok encefalopatije nedonoščadi je multifaktorijalan i uključuje cerebralnu hipoksiju-ishemiju i sistemsku infekciju/upalu, što rezultira toksičnošću glutamata, slobodnih radikala i/ili citokina za preoligodendrocite, aksone i neurone. S obzirom na heterogenost i različite kombinacije lezija koje obuhvaćaju encefalopatiju nedonoščadi, nije iznenađujuće da je spektar neurorazvojnih

abnormalnosti u preživjele nedonošćadi širok i uključuje, često u kombinaciji, različite kognitivne, bihevioralne, socijalizacijske, i motoričke deficite. Obrasci i mehanizmi ozljeda u velikoj mjeri ovise o specifičnim fazama sazrijevanja oligodendrocita, neurona i aksona tijekom druge polovice trudnoće (tj. vremenskog okvira nastanka encefalopatije) (Volpe i sur., 2018).

Hipoksično-ishemična ozljeda mozga ima stopu incidencije od 1-2 na 1000 u donošene novorođenčadi, a smrtnost je 15% do 20%. Oko 25% do 30% preživjele nedonošćadi ima stalni neuralni poremećaj kao što su cerebralna paraliza, epilepsija, nedostatak pamćenja, mentalna zaostalost, itd. (Zhang i sur., 2013). Hipoksija je također povezana i s povećanom mogućnosti razvoja neurodegenerativnih poremećaja uključujući Parkinsonovu i Alzheimerovu bolest (Nalivaeva i sur., 2018). Zbog svega navedenog, fetalna hipoksija se opširno istražuje, a zbog nemogućnosti istraživanja na ljudskim fetusima važnu ulogu imaju animalni modeli.

1.2. Animalni modeli hipoksije

Animalni modeli perinatalne ozljede namijenjeni su imitiranju ovog široko prisutnog i još slabo shvaćenog stanja novorođenčeta. Istraživanja na animalnim modelima trebala bi (1) doprinijeti našem znanju o temeljnim mehanizmima ozljede, (2) poboljšati naše razumijevanje razvoja ozljeda i njihovog ishoda i (3) dati predložak na kojem se razvijaju i testiraju terapijske strategije. Kako bi adekvatno ispunili ove ciljeve, animalni modeli bi trebali odražavati histopatološki spektar ozljeda mozga u razvoju, oponašati etiološke osnove kroz koje se te ozljede pojavljuju i što bolje oponašati funkcionalne ishode kod novorođenčadi i djeteta (Yager, 2004). Za bolje razumijevanje uloge prenatalne hipoksije u fetalnom pre- i post-natalnom razvoju, u posljednjih nekoliko desetljeća korišteni su različiti animalni modeli i to kunići, zamorci, miševi, svinje, ovce, majmuni, a najčešće štakori (Yager, 2004; Millar i sur., 2017; Nalivaeva i sur., 2018).

Štakori, a u nešto manjoj mjeri miševi, su najčešće korišteni modeli. Razvoj štakora u posljednjem tromjesečju trudnoće odgovara razvojnem stadiju ljudskog mozga u prvom i drugom tromjesečju, a razvoj mozga štakora tijekom prva dva postnatalna tjedna odgovara trećem tromjesečju u ljudskom fetalnom mozgu (Golan i Huleihel, 2006). Kod ljudi se pojedini razvojni procesi u živčanom sustavu odvijaju tijekom razdoblja od nekoliko tjedana do mjeseci, dok se u glodavcima isti procesi odvijaju tijekom nekoliko dana. Proliferacija i migracija neurona u ljudskom mozgu odvija se između 4. i 24. tjedna trudnoće (tj. u srednjem dijelu), pri čemu se neurogeneza javlja najprije u konstrukcijama leđne moždine i moždanog debla i nakon toga napreduje te u velikoj mjeri završava do kraja srednjeg dijela trudnoće. Isti se događaji u glodavcima odvijaju od 11. do 16. gestacijskog

dana za leđnu moždinu i moždano deblo, ali se produžuju do 15 postnatalnog dana za neokorteks i limbički sustav. Kod ljudi, sinaptogeneza, neurobiološki supstrat za komunikaciju između stanica, počinje postupno tijekom prvih nekoliko mjeseci trudnoće, dostiže svoj vrhunac od prve do druge godine života i sazrijeva tijekom nekoliko godina sve do adolescencije. Kod glodavaca se taj proces događa tijekom kasnijeg dijela trudnoće pa do prva 3 tjedna postnatalnog života (Yager, 2004).

1.2.1. Invazivni modeli hipoksije

Invazivni modeli su oni kod kojih je na mladuncima izveden kirurški zahvat kako bi se izazvala hipoksija-ishemija (HI). Zahvati koji se koriste su unilateralna ili bilateralna ligacija karotide i bilateralna okluzija karotide (BOK) u kombinaciji s izlaganjem hipoksiji u hipoksičnoj komori (Rumajogee i sur., 2016).

Prvi i najbolje proučavani HI neonatalni model je Rice-Vannuccijev štakorski model HI (Rice i sur., 1981). Ovaj model je omogućio proučavanje fundamentalnih mehanizama HI-vezanog oštećenja mozga tijekom razvoja i jedan je od najproduktivnijih do sad opisanih modela perinatalne ozljede mozga. Ovaj model koristi neonatalne štakore 7. postnatalnog dana (PND7), a opće je prihvaćeno da štakor PND7 ima zrelost mozga ekvivalentnu zrelosti mozga ljudskog fetusa blizu/u vrijeme poroda. Ukratko, mladunci se PND7 podvrgnu unilateralnoj ligaciji lijeve karotide te se nakon 4-8 sati izlože hipoksičnom zraku (8% kisika) tijekom 3,5 h (Slika 1.6a). U izvornoj publikaciji, oštećenje mozga opaženo je nakon 50 h u ipsilateralnoj hemisferi, ali ne i u kontralateralnoj. Koristeći ove eksperimentalne uvjete, sama hipoksija (bez okluzije karotide) ne dovodi do oštećenja mozga, također niti sama karotidna unilateralna okluzija (bez hipoksije). Kod većine životinja (90%) ozljede utječu na moždanu koru, duboku sivu tvar (striatum i talamus), subkortikalnu i periventrikularnu bijelu tvar te hipokampus (Rice i sur., 1981, Rumajogee i sur., 2016).

Posljednjih godina razvijeno je nekoliko optimizacija Rice-Vannuccijevog modela kako bi se uskladili s patofiziološkim procesima koji su u pozadini ozljede mozga i posljedicama koje su uočene kod ljudi. Jednog od poznatijih razvili su Sheldon i sur. (1996) ligacijom desne karotide u štakora PND1 te naknadnim izlaganjem hipoksiji (6% O₂) tijekom 3.5 h. U ovim eksperimentalnim uvjetima dolazi do teške unilateralne ozljede, nekroze korteksa i stanjenja anteriornog dijela korpusa kalozuma. Također su pokazali da progresija oštećenja mozga nakon HI uključuje progresivni gubitak neurona, stanjivanje bijele tvari, aktivaciju mikroglija i makrofaga. U mozgu štakora s ovom ozljedom javlja se infarkt, nekrotična područja i cistične lezije slične onima u dojenčadi s teškim oblicima PVL-a (Rumajogee i sur., 2016).

Poznat je i model u kojem je PND5 napravljena bilateralna okluzija karotide bez izlaganja životinja hipoksičnim uvjetima (Uehara i sur., 1999). 91% životinja pokazalo je blage do teške lezije bijele tvari u korpusu kalozumu i subkortikalnoj bijeloj tvari dok su kortikalni neuroni bili pošteđeni. U narednim godinama objavljena su još dva modela BOK (Cai i sur., 2001; Fan i sur., 2005). U prvom modelu operacija je provedena na mladuncima štakora PND1 i nisu primijenjeni hipoksični uvjeti. Blaga difuzna ozljeda bila je slična onoj koja je opažena u ljudi s PVL. Konkretnije, ozljeda je bila ograničena na bijelu tvar i karakterizirana smanjenim brojem nezrelih i zrelih oligodendrocita, te aktivacijom makrofaga i mikroglija. U drugom modelu, operacija je provedena na štakorima PND4, a osim bilateralne arterijske okluzije, štakori su bili izloženi hipoksiji s 8% O₂ tijekom 10-15 minuta. Došlo je do teških oštećenja sive i bijele tvari s nekrotičnim područjima, gubitkom zrelih oligodendrocita i stanjivanjem korpus kalozuma (Northington, 2006; Rumajogee i sur., 2016).

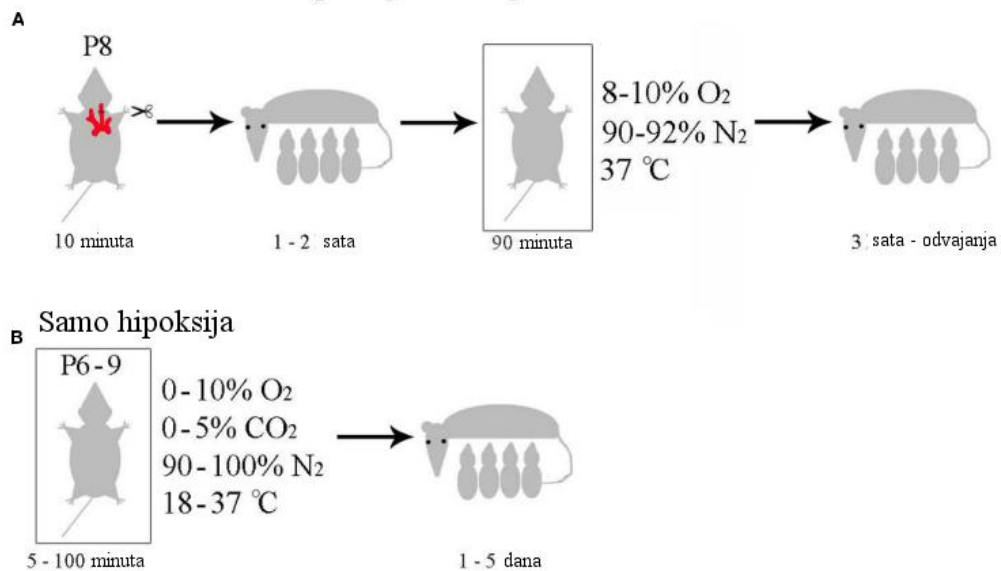
1.2.2. Neinvazivni modeli hipoksije

Neinvazivni hipoksijski modeli (eng. *hypoxia-only models*) su modeli kod kojih je hipoksija inducirana isključivo pomoću komore za deprivaciju kisika, bez prethodne ishemijske procedure (Slika 1.6 b). Ovi modeli nisu tako široko korišteni kao Rice-Vannuccijska metoda, ali imaju potencijal izbjeći nefiziološku okluziju karotidne arterije i opisati blaže ozljede (Millar i sur., 2017).

Kod štakora se prenatalna hipoksija može postići smještanjem trudnih štakorica u komoru sa smanjenim sadržaja kisika u komori (normobarična komora) i postepenom zamjenom kisika inertnim plinom (obično dušikom). Hipoksija se također može proizvesti u komori s hipobaričnim uvjetima (hipobarična komora), koji modeliraju hipoksiju velike nadmorske visine, ili izlaganjem trudnih štakorica kroničnim blagim koncentracijama ugljikovog monoksida (Nalivaeva i sur., 2018). Za istraživanje kronične intermitentne hipoksije (CIH - eng. *Chronic-Intermittent Hypoxia*) koristi se tzv. intermitentna komora u kojoj se izmjenjuju uvjeti normalne i smanjene količine kisika. U CIH modelima, životinje su povremeno izložene hipoksiji od 6-10% O₂ u nekoliko uzastopnih dana. Taj relativno blagi inzult obično dovodi do suptilnih funkcionalnih i bihevioralnih promjena bez prisutnosti nekrotične stanične smrti. CIH model s 10% O₂, 5% CO₂ i 85% N₂ u PND7 – PND11 štakora doveo je do dugotrajne hiperlokomocije, oštećenja radne memorije i abnormalnosti cirkadijanog ritma (Hefter i sur., 2018).

Najkorišteniji model neinvazivne hipoksije je onaj koju su razvili Nalivaeva i sur.(2018) izlažući štakorice normobaričnoj hipoksiji u različitim danima trudnoće. Hipoksični uvjeti postignuti su zamjenom kisika dušikom do koncentracije O₂ od 7% tijekom 10 minuta, i zadržavanjem na toj razini tijekom 3 h. Trenutno u literaturi ne postoji opisan neinvazivni model neonatalne hipoksije.

Rice-Vannucci hipoksija ishemija



Slika 1.6 Rice-Vannucci i hipoksijski model neonatalne HI (prema Millar i sur., 2017)

2. Cilj istraživanja

Ovaj diplomski rad dio je sveobuhvatnijeg istraživanja u kojem se pokušava razviti štakorski model neonatalne hipoksije i istražiti histološke, molekularne i bihevioralne posljedice na razvoj mozga izloženog hipoksiji.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi postoje li promjene u lokomociji, anksioznom, eksploratornom i socijalnom ponašanju te učenju u mladim štakora, izloženih hipoksiji u normobaričnoj komori prvog postnatalnog dana.

U tu su svrhu mladunci eksperimentalne i kontrolne skupine štakora bili podvrgnuti bateriji testova ponašanja: otvoreno polje (eng. *Open field*), ploča s rupama (eng. *Hole board*), T-labirint (eng. *T-maze*) i društveni odabir (eng. *Social choice*).

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Životinje

U istraživanju je korišteno 24 štakora soja Wistar okoćenih od 4 majke, od kojih je, nakon nasumičnog odabira, 12 (6 mužjaka i 6 ženki) bilo podvrgnuto hipoksiji, a 12 (6 mužjaka i 6 ženki) nije. Parenje, okot mladunaca i izlaganje hipoksiji provelo se na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga. Mladunci štakora iz eksperimentalne skupine (PND1) stavljeni su u normobaričnu hipoksijsku komoru (8% O₂, temp. 25 °C), a kontrolni mladunci u kavez s normoksičnim uvjetima (temp. 25 °C). Nakon 2 h su obje skupine vraćene u kaveze s majkama. U Zavod za animalnu fiziologiju mladunci su dopremljeni nakon odvajanja od majki (PND28). Po 6 mladunaca istog spola bilo je smješteno u jednom kavezu uz slobodan pristup hrani i vodi, osim tijekom provođenja testiranja u T-labirintu. Kavezi su se nalazili u prostoriji kontrolirane temperature (22 ± 2 °C) i svjetlosnim ciklusima od po 12 h (svjetlo se palilo u 09 h, a gasilo u 21 h).

3.1.2. Aparatura

●Aparat otvoreno polje (Slika 3.1) je kutija od bijelog pleksiglasa veličine 80 cm x 80 cm x 70 cm s crnom drvenom pločom na dnu.



Slika 3.1 Aparat otvoreno polje

●Aparat ploča s rupama (Slika 3.2) je kutija od bijelog pleksiglasa veličine 80 cm x 80 cm x 70 cm. Na dnu se nalazi drvena ploča sa 16 ravnomjerno postavljenih rupa (4 x 4) promjera 4 cm. Rupe su fiktivno podijeljene na rubne (12 rupa uz stjenke kutije) i centralne (4 rupe u središnjem dijelu aparature).



Slika 3.2 Aparat ploča s rupama

●T- labirint (Slika 3.3) je labirint oblika slova T, napravljen od pleksiglasa crne boje. Veličina središnjeg kraka je 70 cm x 35 cm x 10 cm, a postranih krakova 55 cm x 35 cm x 10 cm.

●Aparat za testiranje društvenog odabira (Slika 3.4) je prozirna kutija od pleksiglasa s crno obojanim vanjskim stranicama veličine 90 cm x 90 cm x 50 cm. Sastoji se od tri odjeljka (90 cm x 30 cm x 50 cm) spojenih vratima.

●Za snimanje video snimki korištena je kamera (model RYK – 2B93L2/1P, YOKO Technology Corp., New Taipei City, Tajvan)

●Za analizu video snimki korišten je program EthoVisionXT13 (Noldus Information Technology Inc., Leesburg, VA , SAD).

●Za statističku analizu podataka korišteni su programi GraphPad InStat 3.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, SAD) i JMP 11.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, SAD).



Slika 3.3 Aparat T- labirint



Slika 3.4 Aparat za testiranje društvenog odabira

3.2. Metode

Nakon nekoliko dana adaptacije, štakori su (PND 34) podvrgnuti bateriji testova: lokomotornog gibanja u otvorenom polju, eksploratornog i anksioznog ponašanja na ploči s rupama, učenja u T-labirintu te društvenog ponašanja u testu društvenog odabira. Svi testovi su se proveli u

poslijepodnevnim satima između 13 h i 17 h, a nakon svakog štakora aparatura je oprana antiseptikom. Tijekom testa u otvorenom polju i testa društvenog odabira, štakori su snimani kamerom, a mjereni parametri su naknadno analizirani pregledom snimki.

3.2.1. Testiranje u otvorenom polju

U testu otvorenog polja svakog štakora stavilo se u sredinu polja i snimalo 5 minuta te nakon toga pomoću računalnog programa izračunalo duljinu prijeđenog puta (cm), vrijeme provedeno u gibanju (s), brzinu kretanja (cm/s) i broj propinjanja (prednje šape ne dodiruju podnu ploču, a tijelo je uspravno).

3.2.2. Testiranje na ploči s rupama

U testu ploče s rupama svakog štakora stavilo se na sredinu ploče i tijekom 5 minuta mjerio se ukupan broj posjećenih rupa (pokazatelj eksploratornog ponašanja) i izračunao postotak posjećenosti unutarnjih rupa (pokazatelj stupnja anksioznosti). Posjet rupi bilježio se kada je štakor uronio glavu u rupu do iznad razine očiju.

3.2.3. Testiranje u T-labirintu

Testiranje učenja u T-labirintu provodilo se jednom dnevno 5 dana za redom. Dan prije testiranja štakorima se uklonila hrana te su štakori dobivali hranu samo tijekom jednog sata nakon testiranja, kako bi bili motivirani za pronalaženje hrane u labirintu. Prvi pokušaj nazvan je "nulti", njime se odredio prirodni odabir štakora jednog kraka labirinta te mu se u svim sljedećim pokušajima nagrada (komadić hrane) stavljala u suprotni kraku. Svakog dana štakor bi imao 10 pokušaja u nizu, od po 60 sekundi, da pronađe hranu. Nakon što bi pronašao hranu u 8 od 10 pokušaja smatralo bi se da je naučio gdje se nalazi hrana.

3.2.4. Test društvenog odabira

U testu društvenog odabira u jedan krajnji odjeljak kutije postavljen je predmet, a u drugi krajnji odjeljak nepoznati štakor istog spola (iza metalne rešetke da se ne bi mogao gibati). Testirani štakor je postavljen na 3 minute u središnji odjeljak, uz zatvorena vrata prema krajnjim odjeljcima, kako bi se priviknuo na kavez, a zatim su se otvorila vrata drugih odjeljaka te je štakor mogao istraživati predmet i drugog štakora tijekom 5 minuta. Mjerilo se vrijeme (s) provedeno u istraživanju predmeta i vrijeme (s) provedeno u istraživanju drugog štakora.

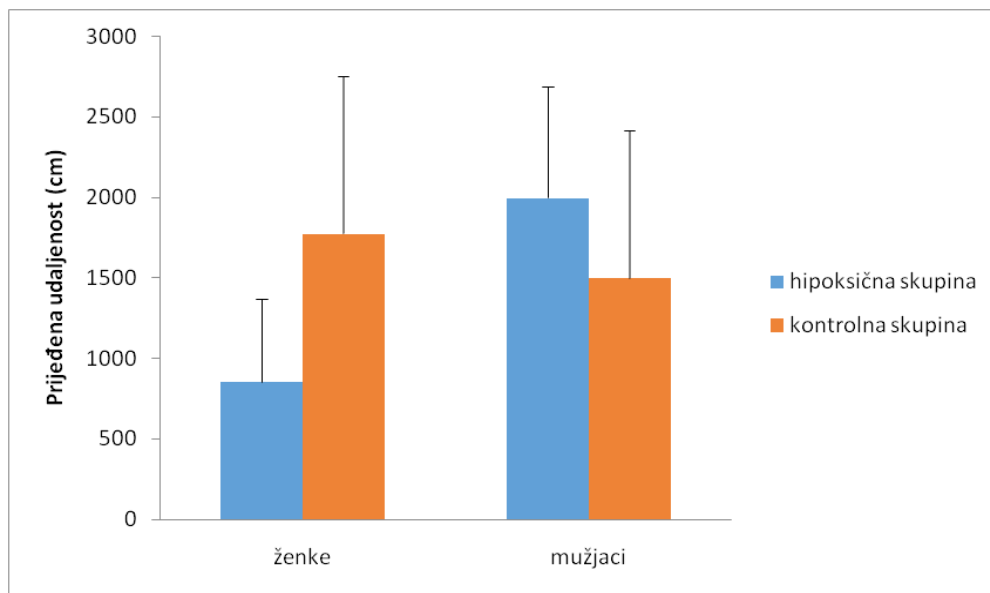
3.3. Statistička obrada podataka

Rezultati dobiveni u testovima statistički su obrađeni. Normalnost raspodjele izmjerenih vrijednosti testirana je pomoću metode Kolmogorova i Smirnova. Ovisno o normalnosti raspodjele, na originalnim ili logaritamski transformiranim vrijednostima provela se dvostruka analiza varijanci (eng. *Two-way ANOVA*) kako bi se provjerio utjecaj tretmana i spola na mjerene varijable. Analiza varijanci ponovljenih mjerenja (eng. *Repeated measures ANOVA*) korištena je za analizu učenja u T-labirintu. Za post-hoc analizu korišten je Tukey-ev test (eng. *Tukey's honest significance test – HST*). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost (M) $\pm$ standardna devijacija (SD). Značajnost rezultata je prihvaćena kod $p < 0,05$.

1.4. Rezultati

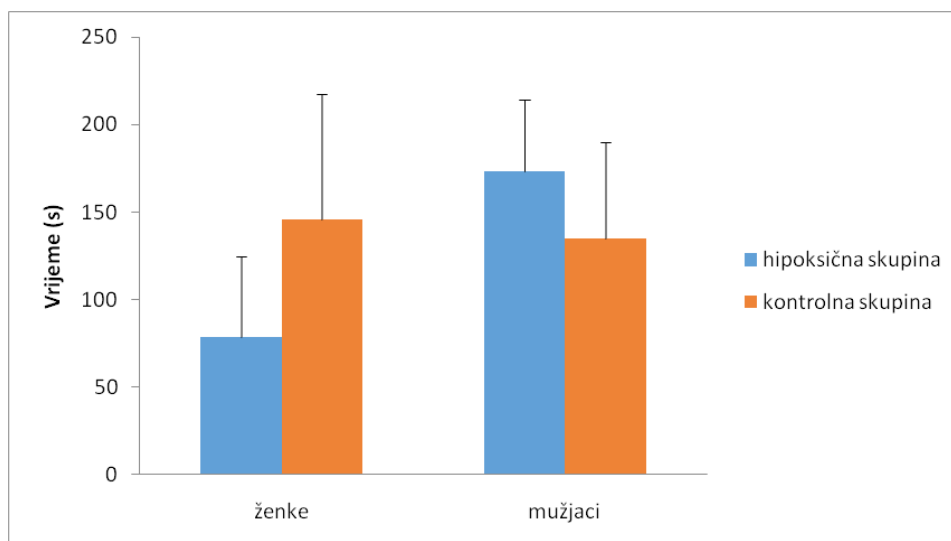
4.1. Test otvorenog polja

U testu otvorenog polja mjerili smo ukupnu udaljenost koju je štakor prešao tijekom trajanja testa (Slika 4.1), vrijeme provedeno u kretanju (Slika 4.2), brzinu kretanja (Slika 4.3) i broj propinjanja (Slika 4.4).



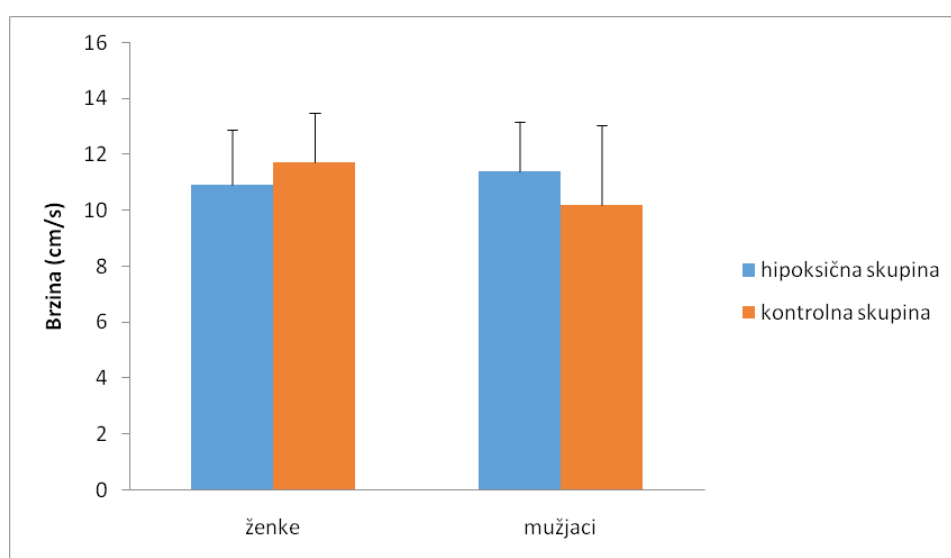
Slika 4.1 Ukupno prijeđena udaljenost ($M \pm SD$) u testu otvorenog polja štakora iz hipoksične ($N=6$ ženki, 6 mužjaka) i kontrolne ($N=6$ ženki, 6 mužjaka) skupine životinja.

Iako su kontrolne životinje prešle nešto veću udaljenost od eksperimentalnih (1,6 m naspram 1,4 m) te mužjaci nešto veću udaljenost od ženki (1,8 m naspram 1,3 m), utjecaj skupine i spola na ukupno prijeđenu udaljenost nije bio statistički značajan.



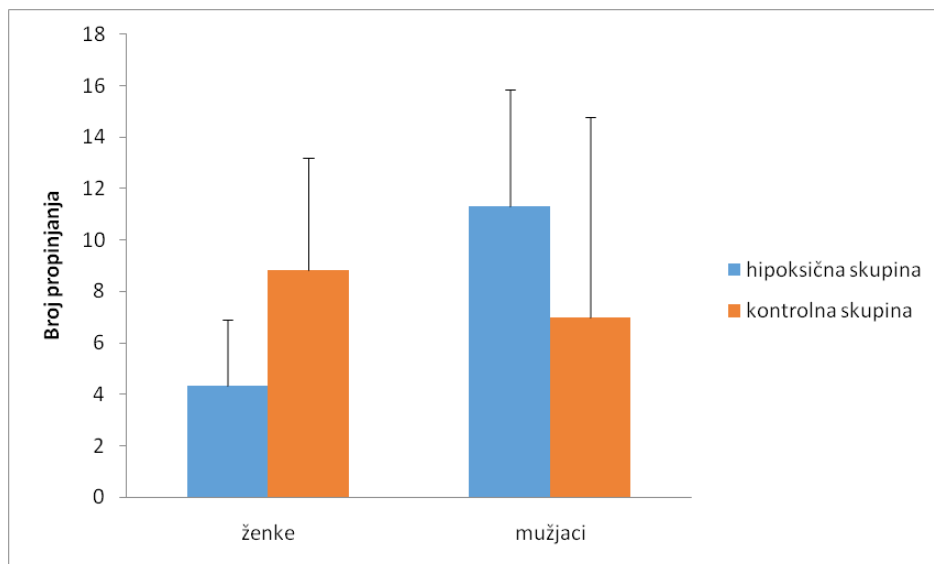
Slika 4.2 Vrijeme provedeno u kretanju ($M \pm SD$) tijekom testa otvorenog polja štakora iz hipoksične ($N=6$ ženki, 6 mužjaka) i kontrolne ($N=6$ ženki, 6 mužjaka) skupine životinja.

Utjecaj skupine i spola na vrijeme provedeno u kretanju nisu bili statistički značajni iako su se kontrolne životinje kretale nešto više od eksperimentalnih (140 s naspram 126 s), a mužjaci nešto više od ženki (154 s naspram 112 s). Ipak, uočen je značajan utjecaj interakcije skupina x spol ($p=0,03$) zbog značajno duljeg vremena provedenog u kretanju između mužjaka i ženki (173 s naspram 79 s) unutar eksperimentalne, ali ne i kontrolne (135 s naspram 147 s) skupine.



Slika 4.3 Brzina ($M \pm SD$) kojom su se tijekom testa otvorenog polja kretali štakori iz hipoksične ($N=6$ ženki, 6 mužjaka) i kontrolne ($N=6$ ženki, 6 mužjaka) skupine životinja.

Pripadnost skupini i spolu nije utjecala na brzinu kretanja životinja – ona je u svim podskupinama iznosila oko 11 cm/s.

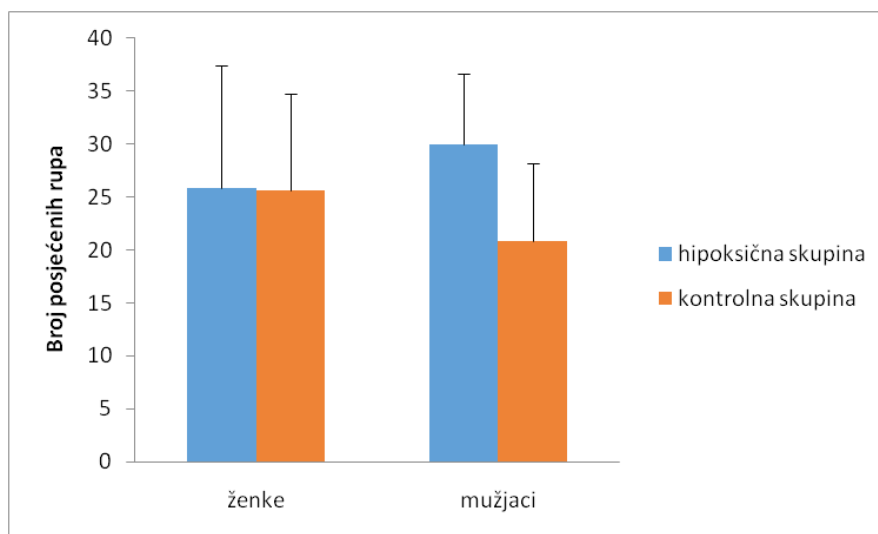


Slika 4.4 Broj propinjanja ($M \pm SD$) koje su tijekom testa otvorenog polja napravili štakori iz hipoksične ($N=6$ ženki, 6 mužjaka) i kontrolne ($N=6$ ženki, 6 mužjaka) skupine životinja.

Broj propinjanja se nije razlikovao između kontrolne i eksperimentalne skupine (7,9 naspram 7,8), dok su se mužjaci propinjali nešto češće nego ženke (9,2 naspram 6,5) iako ta razlika nije bila statistički značajna.

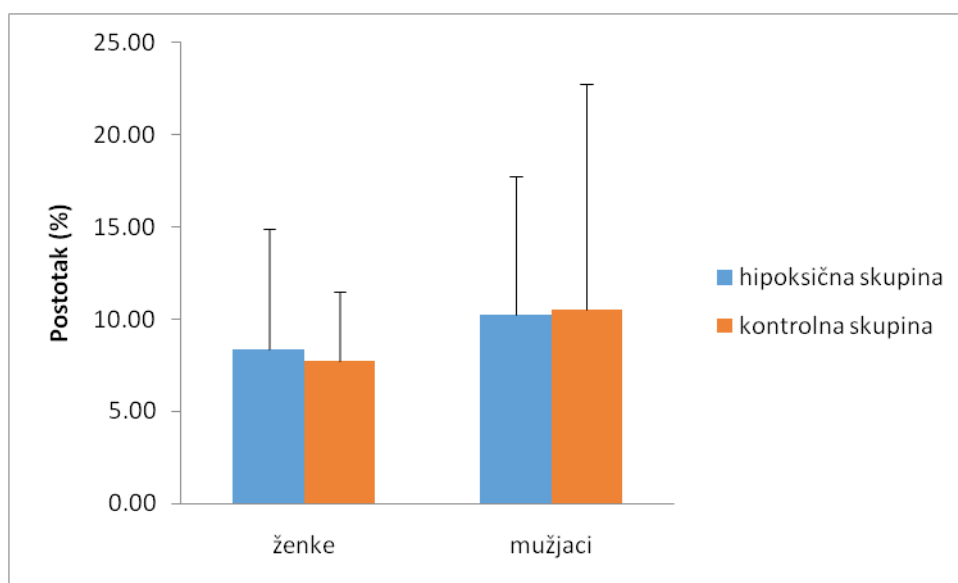
4.2. Test ploče s rupama

U testu ploča s rupama mjerili smo ukupan broj posjećenih rupa (Slika 4.5) što pokazuje eksploratorno ponašanje štakora i postotak posjećenosti unutarnjih rupa (Slika 4.6) što pokazuje stupanj anksioznosti kod štakora.



Slika 4.5 Ukupan broj rupa ($M \pm SD$) koje su tijekom testa ploča s rupama posjetili štakori iz hipoksične ($N=6$ ženki, 6 mužjaka) i kontrolne ($N=6$ ženki, 6 mužjaka) skupine životinja.

Utjecaj skupine i spola na ukupan broj posjećenih rupa nisu bili statistički značajni. Eksperimentalne životinje posjetile nešto više rupa od kontrolnih (27,5 naspram 22,6), dok su i ženke i mužjaci posjetili prosječno 25 rupa.

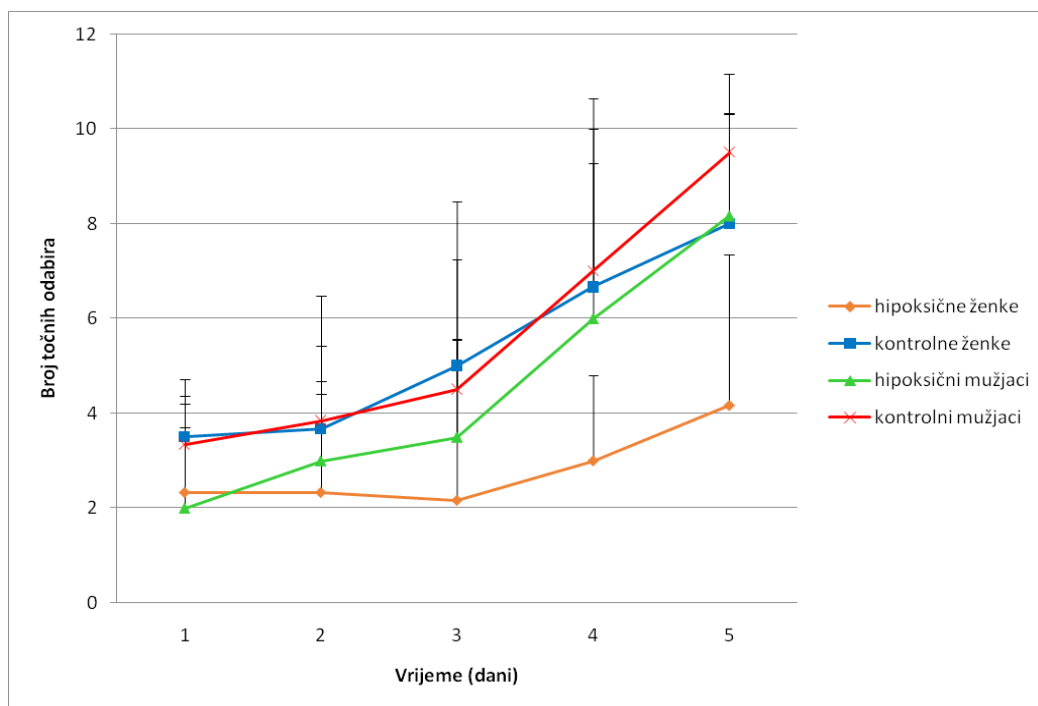


Slika 4.6 Postotak posjećenosti unutarnjih rupa ($M \pm SD$), u testu ploča s rupama, od strane štakora iz hipoksične ($N=6$ ženki, 6 mužjaka) i kontrolne ($N=6$, ženki 6 mužjaka) skupine životinja.

Utjecaj skupine i spola na postotak posjećenosti unutarnjih rupa također nije bio statistički značajan - u obje skupine životinja iznosila je 9%, a kod mužjaka je bila neznatno veća nego kod ženki (10,2% naspram 8,0%).

4.3. Test T-labirinta

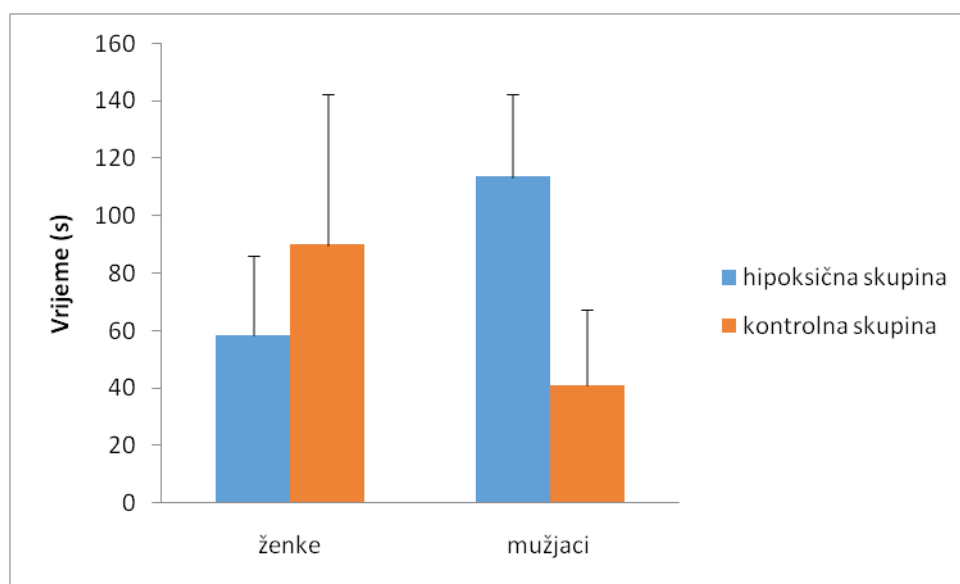
U ovom smo testu mjerili broj točnih odabira kraka T-labirinta u kojem je bila postavljena nagrada (Slika 4.7), što pokazuje sposobnost prostornog učenja. Utjecaj dana testiranja na broj točnih odabira bio je značajan ($p < 0,0001$). Broj točnih odabira s vremenom se povećavao u obje skupine i to značajno više četvrti dan u odnosu na prva tri dana (5,7 naspram 2,8, 3,2 i 3,8) te peti dan značajno više u odnosu na četvrti (7,5 naspram 5,7). Utjecaj spola na učenje nije bio statistički značajan iako su mužjaci imali nešto veći prosječan broj točnih odabira od ženki (5,1 naspram 4,1). Kod utjecaja skupine na učenje uočena je značajna razlika zbog većeg prosječnog broja točnih odabira kod kontrolne skupine u odnosu na eksperimentalnu (5,5 naspram 3,7, $p = 0,03$).



Slika 4.7 Dinamika učenja položaja nagrade u T-labirintu ($M \pm SD$) štakora iz hipoksične ($N=6$ ženki, 6 mužjaka) i kontrolne ($N=6$ ženki, 6 mužjaka) skupine životinja

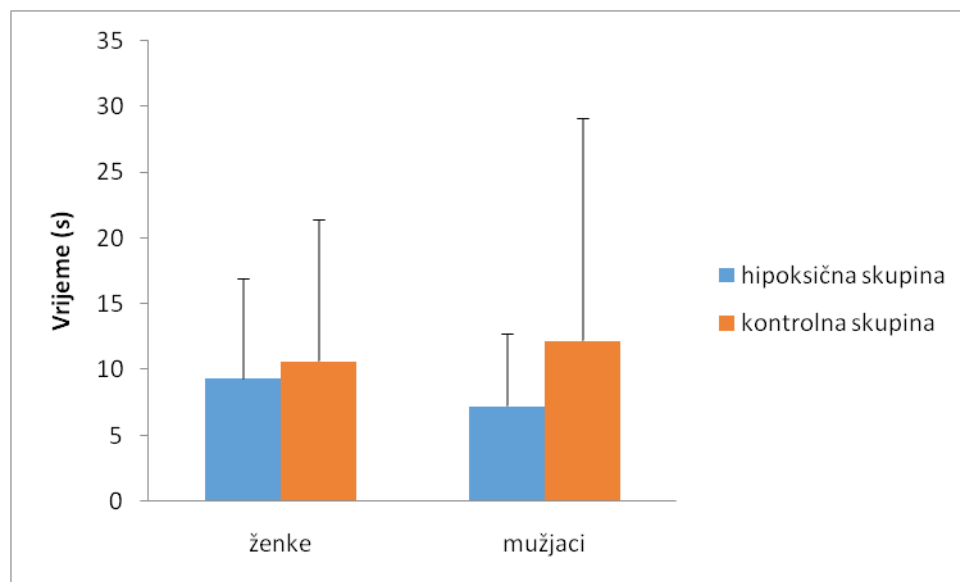
4.4. Test društvenog odabira

U testu društvenog odabira mjerili smo vrijeme provedeno u istraživanju drugog štakora (Slika 4.8) i vrijeme provedeno u istraživanju predmeta (Slika 4.9).



Slika 4.8 Vrijeme ($M \pm SD$) koje su tijekom testa društvenog odabira štakori iz hipoksične ($N=6$ ženki, 6 mužjaka) i kontrolne ($N=6$ ženki, 6 mužjaka) skupine životinja proveli u istraživanju drugog štakora.

Utjecaj skupine i spola na vrijeme provedeno u istraživanju drugog štakora nisu bili statistički značajni iako su eksperimentalne životinje provele nešto više vremena u istraživanju od kontrolnih (86 s naspram 66 s), a mužjaci nešto više od ženki (77 s naspram 74 s). Ipak, uočen je značajan utjecaj interakcije skupina x spol ($p=0,005$) zbog značajno duljeg vremena provedenog u istraživanju mužjaka eksperimentalne nego kontrolne skupine (114 s naspram 41 s), ali ne i između ženki eksperimentalne i kontrolne (58 s naspram 90 s) skupine.



Slika 4.9 Vrijeme ($M \pm SD$) koje su tijekom testa društvenog odabira štakori iz hipoksične ($N=6$ ženki, 6 mužjaka) i kontrolne ($N=6$ ženki, 6 mužjaka) skupine životinja proveli u istraživanju predmeta.

Utjecaj skupine na vrijeme provedeno u istraživanju predmeta nije bio statistički značajan iako su kontrolne životinje nešto više vremena provele u istraživanju od eksperimentalnih (11 s naspram 8 s). Pripadnost spolu nije utjecala na vrijeme istraživanja predmeta te je ono i kod mužjaka i kod ženki iznosilo oko 10 s.

5. Rasprava

Iako su glodavci najkorišteniji model za hipoksijsko-ishemijske ozljede u fetusa, ne postoji jedinstveni stav o tome koji model najbolje odražava njihove posljedice, s obzirom na mehanizam i razdoblje indukcije ozljede.

Invazivni modeli hipoksije koriste invazivne kirurške metode zbog čega postoji mogućnost da stres uzrokovan operacijom i sam oporavak utječu na konačne rezultate. Zbog invazivnosti metode teško je zaključiti je li neka promjena rezultat hipoksije ili samog operacijskog zahvata (Zhang i sur., 2013). Također, neka istraživanja ističu mogućnost utjecaja anestezije na jačinu ozljede s obzirom na duljinu izloženosti ili vrstu anestezije (Rumajogee i sur., 2016). Zbog toga se pokazala potreba za razvojem manje invazivnog hipoksičnog modela.

Kako je proveden veliki broj istraživanja koja koriste HI model, pojavila se i mogućnost povećane varijabilnosti rezultata zbog korištenja različitih sojeva glodavaca, koji se međusobno razlikuju s obzirom na osjetljivost na ozljedu, stopu smrtnosti i plastičnost mozga nakon ozljede. Započeta su istraživanja za dobivanje reproducibilnih HI modela glodavaca s kontroliranim i standardiziranim stupnjevima oštećenja mozga. Tako se pokušao napraviti model koristeći CD1, 129Sv i CB57 sojeve miševa (Sheldon i sur., 1998). Kod štakorskih modela korišteni su sojevi Wistar i Long-Evans. Ipak, rezultati ovih modela variraju ovisno o tehnici korištenoj za postizanje hipoksije (Rumajogee i sur., 2016).

Rice-Vannuccijev model je bio prvi model neonatalne hipoksije-ishemije. Njegova prednost je ta što kontralateralna hemisfera izložena hipoksiji u odsutnosti ishemije, izgleda normalno, osiguravajući kontrolnu hemisferu unutar eksperimentalnog mozga. Također temeljita karakterizacija ponašanja podupire dugoročne posljedice ovog modela koje oponaša neonatalnu HI (Millar i sur., 2017). Međutim, unatoč velikoj uporabi, ovaj model ne oponaša ljudsko stanje na optimalan način. Konkretno, stupanj razvoja bijele tvari u štakora PND7 i vrsta proizvedene ozljede nisu slični onima u ljudi. Još jedna stvar koju treba uzeti u razmatranje uključuje vrstu ozljede koju model želi reproducirati. Većina slučajeva PVL-a koji su rezultirali cerebralnom paralizom povezani su s difuznim apoptotičnim i relativno malim nekrotičnim područjima u mozgu dojenčadi, koji utječu uglavnom na bijelu tvar, dok Rice-Vannuccijev model često rezultira teškom ozljedom s višestrukim infarktima koji uključuju i bijelu tvar i sivu tvar, što čini manje od 5% slučajeva PVL-a. Također treba napomenuti da kod ovog modela samo 56% životinja ima moždani udar, što upućuje na varijabilnost u tehnici (Rice i sur., 1981; Rumajogee i sur., 2016).

Za razliku od invazivnih hipoksijskih modela, neinvazivni modeli ne koriste kirurške metode, što bolje odražava prirodan nastanak prenatalne hipoksije. Do sada je napravljen mali broj istraživanja koja koriste neinvazivne hipoksijske modele i ne postoje objavljeni pregledni članci ili meta-analize istraživanja neinvazivnih hipoksijskih modela. Uz to, postoji jedan značajan problem kod ovih modela, a to je nedostatak metodološkog jedinstva između različitih eksperimentatora. Postoji slabi konsenzus oko optimalne starosti životinja, soja, parcijalnog tlaka kisika, vremena izlaganju hipoksiji ili temperature okoline tijekom izlaganja (Millar i sur., 2017). Unatoč tome, nedavno istraživanje je pokazalo da ne postoji značajna razlika između hipoksične skupine i ishemijsko-hipoksične skupine testiranih štakora te da je sam nedostatak kisika dovoljan da proizvede simptome hipoksične ozljede mozga u svinja, slične onima kod životinja koje su podvrgnute kombiniranom postupku ligacije karotida i uskraćivanja kisika. Stoga se može zaključiti da je sam hipoksični tretman jednako učinkovit kao ishemijsko-hipoksični postupak u stvaranju ozljeda mozga (Zhang i sur., 2013).

U našem istraživanju koristili smo neonatalni model hipoksije, koji ima dvojaku prednost nad ranije spomenutim prenatalnim modelom. Naime, rana postnatalna dob štakora odgovara početku trećeg tromjesečja gestacije ljudskog fetusa, kada su hipoksijski insulti najčešći (Yager, 2004; Volpe i sur., 2018). Osim toga, postnatalni tretman omogućuje razdvajanje mladunaca iz istog legla na eksperimentalnu i kontrolnu skupinu, čime se eliminira eventualni utjecaj majčinstva na ponašanje mladunaca u bihevioralnim testovima.

U prijašnjim istraživanjima pokazano je da hipoksija u donošene i nedonošene djece može dovesti do dugotrajnih motoričkih, bihevioralnih i kognitivnih posljedica (Sukhanova i sur., 2018). Zbog toga smo pomoću testova ponašanja htjeli utvrditi postoje li promjene u lokomociji, anksioznom, eksploratornom i socijalnom ponašanju te učenju u mladim štakora izloženih hipoksiji u normobaričnoj komori.

Testom otvorenog polja ispituje se lokomotorna aktivnost, odnosno opća aktivnost štakora, kao i nepravilnosti poput hiperaktivnosti ili slabe pokretljivosti (Crawley, 2007). U nekoliko istraživanja neinvazivnih modela pokazano je da hipoksija dovodi do hiperaktivnosti (Shimomura i Ohta, 1988; Dell'Anna i sur., 1991; Speiser i sur., 1991; Decker i sur., 2005). Također Rotstein i sur. (2006) u svom su radu pokazali slabu pokretljivost kod skupine izložene hipoksiji u odnosu na kontrolnu skupinu. Rezultati dobiveni u našem istraživanju pokazuju da nema razlike u ukupno pređenoj udaljenosti, brzini ni broju propinjanja između eksperimentalne i kontrolne skupine životinja. Jedina razlika primijećena je u vremenu provedenom u kretanju između mužjaka i ženki eksperimentalne skupine životinja.

Eksploratorno ponašanje i razinu anksioznosti štakora testirali smo na ploči s rupama. Štakori imaju prirodnu tendenciju ka istraživanju novog prostora u kojem se nađu pa zabadaju glavu u rupice na podu testnog aparata, što predstavlja eksploratorno ponašanje. Pri tome preferiraju rupe uz stijenke aparature (tzv. vanjske rupe). Unutarnje rupe (na sredini aparature) štakorima predstavljaju otvoreni, nezaštićeni prostor, pa boravak u njemu predstavlja stres. Štakori izbjegavaju otvorene prostore (tzv. tigmotaksija), te sukladno tome, oni anksiozniji manje posjećuju unutarnje rupe (Brown i Nemes, 2008). Smanjeni stupanj anksioznosti može također ukazati na poremećaj u ponašanju. Takada i sur. (2016), koristeći plus labirint, pokazali su smanjeni stupanj anksioznosti kod štakora izloženih hipoksiji u odnosu na kontrolnu skupinu. U našim eksperimentalnim uvjetima, eksperimentalna i kontrolna skupine životinja nisu se razlikovale u ukupnom broju posjećenih rupa niti postotku posjećenosti unutarnjih rupa, što ukazuje na nepromijenjeno eksploratorno i anksiozno ponašanje.

Testom T-labirinta htjeli smo ispitati sposobnost prostornog učenja štakora. Nekoliko istraživanja pokazalo je razliku u sposobnosti učenja u Morrisovom vodenom labirintu, pri čemu su štakori izloženi hipoksiji sporije učili od kontrolne skupine (Speiser i sur., 1998; Rotstein i sur., 2006; Raveendran i Skaria, 2012; Mikati i sur., 2005) dok istraživanje Wanga i sur. (2015) nije pokazalo značajnu razliku između skupina. Rezultati dobiveni u našem istraživanju pokazali su utjecaj dana testiranja na broj točnih odabira. S vremenom se broj točnih odabira povećavao i to značajno više četvrti i peti dan. Razlika u učenju među spolovima nije pokazana, ali je uočena razlika između eksperimentalne i kontrolne skupine. Eksperimentalna skupina imala je značajno manji broj točnih odabira od kontrolne skupine, što bi moglo značiti da dolazi do poremećaja u učenju nakon izlaganja hipoksiji.

Test društvenog odabira testira odabir socijalne interakcije nad istraživanjem neživog objekta (tj. eksploratornog ponašanja) (Belzung i sur., 2005). U literaturi ne postoje rezultati istraživanja socijalne interakcije na neinvazivnim hipoksijskim modelima pa je dobivene rezultate nemoguće usporediti. U našem istraživanju nije pokazana razlika između eksperimentalne i kontrolne skupine u vremenu provedenom u istraživanju predmeta, što potvrđuje rezultat testa u ploči s rupama. Razlika u duljini vremena provedenog u istraživanju jedinke uočena je samo između mužjaka eksperimentalne i kontrolne skupine, dok se kod ženki nije razlikovala. Dulje vrijeme istraživanja kod mužjaka eksperimentalne skupine moglo bi ukazati na povećanu socijabilnost nakon izlaganja hipoksiji.

U daljnjim istraživanjima proučit će se eventualne strukturne promjene u regijama mozga uključenim u učenje i pamćenje, prvenstveno hipokampusu, kao i promjena ekspresije gena odgovornih za nastajanje i reorganizaciju sinapsi.

6. Zaključak

1. Između skupine izložene hipoksiji i kontrolne skupine nismo uočili značajnu razliku u lokomotornom gibanju te anksioznom i eksploratornom ponašanju.
2. U odnosu na kontrolnu skupinu, skupina izložena hipoksiji imala je značajno manji broj točnih odabira u T-labirintu, a mužjaci i produljeno vrijeme istraživanja druge jedinke u testu društvenog odabira.
3. Dobiveni rezultati upućuju na zaključak da neonatalno izlaganje štakora hipoksiji smanjuje sposobnost prostornog učenja i povećava socijabilnost u mužjaka.

7. Literatura

- Belzung C., Leman S., Vourc'h P., Andres C. (2005): Rodent models for autism: A critical review. *Drug discovery today: disease models*, **2**: 93–101.
- Brown G.R., Nemes C. (2008): The exploratory behaviour of rats in the hole-board apparatus: Is head-dipping a valid measure of neophilia?. *Behavioural Processes*, **78**: 442–448.
- Cai Z., Pang Y., Xiao F., Rhodes P.G. (2001): Chronic ischemia preferentially causes white matter injury in the neonatal rat brain. *Brain Research*, **898**: 126–135.
- Crawley J.N. (2007): What's wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice. A John Wiley & Sons, Inc., Publication, Hoboken, New Jersey
- Decker M.J., Karra J.A., Solomon I.G., Keating G.L., Rye D.B. (2005): Reduced Extracellular Dopamine and Increased Responsiveness to Novelty: Neurochemical and Behavioral Sequelae of Intermittent Hypoxia. *SLEEP*, **28**: 169–176.
- Dell'Anna M.E., Calzolari S., Molinari M., Iuvone L., Calimici R. (1991): Neonatal anoxia induces transitory hyperactivity, permanent spatial memory deficits and CA1 cell density reduction in developing rats. *Behavioural Brain Research*, **45**: 125–134.
- Delmiš J., Orešković S. (2014): Fetalna medicina i opstetricija. Medicinska naklada, Zagreb
- Fan L.W., Lin S., Pang Y., Lei M., Zhang F., Rhodes P.G., Cai Z. (2005): Hypoxia-ischemia induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat. *Behavioural Brain Research*, **165**: 80–90.
- Fatemi A., Wilson M.A., Johnston M.V. (2009): Hypoxic-Ischemic Encephalopathy in the Term Infant. *Clinics in Perinatology*, **36**: 835–858.
- Golan H., Huleihel M. (2006): The effect of prenatal hypoxia on brain development: short- and long-term consequences demonstrated in rodent models. *Developmental Science*, **9**: 338–349.
- Hefter D., Marti H.H., Gass P., Inta D. (2018): Perinatal hypoxia and ischemia in animal models of schizophrenia. *Frontiers in Psychiatry*, **9**: 1–7.
- Hutter D., Kingdom J., Jaeggi E. (2010): Causes and Mechanisms of Intrauterine Hypoxia and Its Impact on the Fetal Cardiovascular System : A Review. *International Journal of Pediatrics*, **2010**: 1–9.
- Johnson M.V, Trescher W.H., Ishida A., Nakajima W. (2001): Neurobiology of Hypoxic-Ischemic Injury in the Developing Brain. *Pediatric research*, **49**: 735–741.
- Madrešić D., Barić I. (2013): Pedijatrija. Osmo izdanje. Školska knjiga, Zagreb

- Mikati M.A., Zeinieh M.P., Kurdi R.M., Harb S.A., El Hokayem J.A., Daderian R.H. (2005): Long-term effects of acute and of chronic hypoxia on behavior and on hippocampal histology in the developing brain. *Developmental Brain Research*, **157**: 98–102.
- Millar L.J., Shi L., Hoerder-Suabedissen A., Molnár Z. (2017): Neonatal Hypoxia Ischaemia: Mechanisms, Models, and Therapeutic Challenges. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **11**: 78.
- Nalivaeva N.N., Turner A.J., Zhuravin I.A. (2018): Role of Prenatal Hypoxia in Brain Development, Cognitive Functions, and Neurodegeneration. *Frontiers in Neuroscience*, **12**: 825.
- Northington F.J. (2006): Brief update on animal models of hypoxic-ischemic encephalopathy and neonatal stroke. *ILAR Journal*, **47**: 32–38.
- Raveendran A.T., Skaria P.C. (2012): Learning and cognitive deficits in hypoxic neonatal rats intensified by BAX mediated apoptosis: Protective role of glucose, oxygen, and epinephrine. *International Journal of Neuroscience*, **123**: 80–88.
- Rice J.E., Vannucci R.C., Brierley J.B. (1981): The Influence of Irmnahty on Hypoxic-Ischemic Brain Damage in the Rat. *Annals of Neurology*, **9**: 131–141.
- Rotstein M. (2006): NAP Enhances Neurodevelopment of Newborn Apolipoprotein E-Deficient Mice Subjected to Hypoxia. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **319**: 332–339.
- Rumajogee P., Bregman T., Miller S.P., Yager J.Y, Fehlings M.G. (2016): Rodent hypoxia-ischemia models for cerebral palsy research: A systematic review. *Frontiers in Neurology*, **7**: 57.
- Sheldon R.A., Sedik C., Ferriero D.M. (1998): Strain-related brain injury in neonatal mice subjected to hypoxia- ischemia. *Brain Research*, **810**: 114–122.
- Sheldon R.A., Chuai J., Ferriero D.M. (1996): A rat model for hypoxic-ischemic brain damage in very premature infants. *Biol Neonate*, **69**: 327–41.
- Shimomura C., Ohta H. (1988): Behavioral abnormalities and seizure susceptibility in rat after neonatal anoxia. *Brain and Development*, **10**: 160–163.
- Speiser Z., Katzir O., Rehavi M., Zabarski T., Cohen S. (1998): Sparing by rasagiline (TVP-1012) of cholinergic functions and behavior in the postnatal anoxia rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **60**: 387–393.
- Speiser Z., Uziel J., Defrin-Assa R., Gitter S., Urca G. (1991): Different behavioral deficits are induced by anoxia/hypoxia in neonatal and senescent rats: blockade by MK-80. *Behavioural Brain Research*, **42**: 187–199.
- Sukhanova I.A., Sebentsova E.A., Khukhareva D.D., Manchenko D.M., Glazova N.Y., Vishnyakova P.A., Inozemtseva L.S., Dolotov O.V., Vysokikh M.Y., Levitskaya N.G. (2018): Gender-dependent changes in physical development, BDNF content and GSH redox system in a model of acute neonatal hypoxia in rats. *Behavioural Brain Research*, **350**: 87–98.

Šumanović-Glamuzina D. (2007): Proupalni citokini, vazodilatatorski prostaglandini i dušični oksid (NO) u perinatalnoj hipoksiji. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet, Sveučilište u Mostaru

Takada S.H., Motta-Teixeira L.C., Machado-Nils A.V., Lee V.Y., Sampaio C.A., Polli R.S., Malheiros J.M., Takase L.F., Kihara A.H., Covolan L., Xavier G.F., Nogueira M.I. (2016): Impact of neonatal anoxia on adult rat hippocampal volume, neurogenesis and behavior. *Behavioural Brain Research*, **296**: 331–338.

Uehara H., Yoshioka H., Kawase S., Nagai H., Ohmae T., Hasegawa K., Sawada T. (1999): A new model of white matter injury in neonatal rats with bilateral carotid artery occlusion. *Brain Research*, **837**: 213–220.

Volpe J.J., Inder T.E., Darras B.T., de Vries L.S., du Plessis A.J., Neil J.J., Perlman J.M. (2018): Volpe's Neurology of the Newborn. Sixth Edit. Elsevier, Philadelphia

Volpe J.J. (2009): The encephalopathy of prematurity-brain injury and impaired brain development inextricably intertwined. *Seminars in pediatric neurology*, **16**: 167–78.

Wang S., Zhang X.Q., Song C.G., Xiao T., Zhao M., Zhu G., Zhao C.S. (2015): In vivo effects of bumetanide at brain concentrations incompatible with NKCC1 inhibition on newborn DGC structure and spontaneous EEG seizures following hypoxia-induced neonatal seizures. *Neuroscience*, **286**: 203–215.

WHO (2001): Definitions and indicators in family planning maternal & child health and reproductive health used in the WHO regional office for Europe. Reproductive, Maternal and Child Health European Regional Office, World Health Organisation

Yager J. Y. (2004): Animal Models of Hypoxic-Ischemic Brain Damage in the Newborn. *Seminars in Pediatric Neurology*, **11**: 31–46.

Zhang Q., Ding Y., Yao Y., Yu Y., Yang L., Cui H. (2013): Creating Rat Model for Hypoxic Brain Damage in Neonates by Oxygen Deprivation. *Plos one*, **8**: 1–14.

https://en.wikipedia.org/wiki/Prenatal_development (04.01.2019.)

8. Životopis

OSOBNİ PODACI

Ime i prezime: Matea Krizman

Datum i mjesto rođenja: 12.08.1994., Varaždin

ŠKOLOVANJE

2009. - 2013. Druga gimnazija Varaždin, Varaždin

2013. - 2016. Prediplomski studij biologije, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu; Tema završnog rada: Ograničenja života na velikim visinama i fiziološke prilagodbe kod životinja

2016. - 2019. Diplomski studij eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija. Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

RADNO ISKUSTVO

ožujak 2016. – lipanj 2016. Studentska praksa

Laboratorij za histologiju i histokemiju, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

- Histološke i histokemijske metode, obrada životinjskog tkiva

2016. - 2017. Studentski demonstrator

Kolegij Histologija i histokemija, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

lipanj 2018. - kolovoz 2018. Erasmus+ stručna praksa

Institut za imunologiju i istraživanje infekcije, Sveučilište u Edinburghu, Edinburgh, Ujedinjeno Kraljevstvo

- Proučavanje infekcije na vinskih mušicama, rad na konfokalnom i fluorescentnom mikroskopu, protočna citometrija, bakteriološke metode i qPCR

ZNANJA I VJEŠTINE

Rad na računalu: osnovno znanje korištenja alata MS office

Strani jezici: Engleski - C1

Vozačka dozvola: B kategorija

DODATNE INFORMACIJE

Projekti

Sudjelovanje na BIUS-ovom projektu proučavanja vrsta PP Papuk 2015.

Sudjelovanje na manifestaciji „Noć biologije“ 2016. i 2017.

Članstva

Član udruge studenata biologije BIUS, sekcija za proučavanje sisavaca 2014. - 2017.