

# Utjecaj neonatalne hipoksije u hipobaričnim uvjetima na ponašanje mladunaca štakora

---

**Stipan, Monika**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*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:217:124446>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-17**



*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno – matematički fakultet  
Biološki odsjek

Monika Stipan

**UTJECAJ NEONATALNE HIPOKSIJE U HIPOBARIČNIM UVJETIMA  
NA PONAŠANJE MLADUNACA ŠTAKORA**

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

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, voditelj 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).

Dr. Sara Trnski je sudjelovala u provođenju testiranja ponašanja životinja na PMF-u, a rezultati tih testiranja objavljeni su u znanstvenom radu gdje je dr. Sara Trnski prvi autor te su sastavni dio u postupku obrane doktorske disertacije i stjecanja zvanja doktora znanosti.

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/I-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.

Zahvaljujem se prof.dr.sc. Dubravki Hranilović na strpljenju, podršci i stručnom vodstvu tokom izrade diplomskog rada kao i na iznimnom trudu prilikom izlaganja nastavnog sadržaja za vrijeme studiranja (naročito kolegija Neurofiziologija). Nastavni sadržaj prenosite izvrsno i sa velikom motivacijom tako da se i ono najteže čini jednostavnim. Također zahvaljujem asistentici mag. biol. exp. Barbari Nikolić na pomoći i trudu tijekom eksperimentalnog dijela kao i prilikom pisanja ovog diplomskog rada. Na kraju zahvaljujem roditeljima i teti na duhovnoj i materijalnoj podršci tijekom cijelog perioda studiranja.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### **UTJECAJ NEONATALNE HIPOKSIJE U HIPOBARIČNIM UVJETIMA NA PONAŠANJE MLADUNACA ŠTAKORA**

Monika Stipan

Rooseveltov trg 6 , 10 000 Zagreb, Hrvatska

#### **SAŽETAK**

Prenatalni hipoksični događaj kod fetusa uzrok je mnogih neuroloških poremećaja poput epilepsije, cerebralne paralize, mentalne retardacije te poremećaja pažnje (ADHD), a uključen je i u pojavnost neurodegenerativnih bolesti. Za istraživanje utjecaja hipoksičnih prenatalnih događaja koristimo neinvazivni štakorski model. Neinvazivnim modelom izlaganja mladunaca hipoksiji u hipobaričnoj komori smanjuje se mogući utjecaj kirurških zahvata na rezultate eksperimenta, kao što je to slučaj kod invazivnih modela. Koristili smo neonatalni model štakora koji odgovara stupnju razvoja mozga ljudskog fetusa zadnjeg tromjesečja trudnoće kada najčešće dolazi do hipoksičnih događaja. Cilj ovog diplomskog rada bio je utvrditi postoje li promjene u lokomociji, socijalnosti, eksploratornom ponašanju, anksioznosti te sposobnosti učenja kod mladunaca štakora izloženih hipoksiji u hipobaričnim uvjetima prvog postnatalnog dana. Mladunce štakora smo podvrgli testovima ponašanja u otvorenom polju, ploči s rupama i T-labirintu te testu društvenog odabira, od 34. – 45. postnatalnog dana. Rezultati testova pokazuju promjene u lokomociji te eksploratornom ponašanju. U testu u otvorenom polju, hipobarični mladunci su prešli veću udaljenost, kretali se brže i podizali se na stražnje noge češće nego mladunci iz kontrolne skupine, a na ploči s rupama hipobarični mužjaci su posjetili veći broj rupa od kontrolnih mužjaka. Dobiveni rezultati upućuju na razvoj hiperaktivnosti kao moguću posljedicu izloženosti hipobaričnoj hipoksiji u neonatalno doba.

(40 stranica, 20 slika, 46 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: hipobarična komora, neinvazivni model, hiperaktivnost, eksploratorno ponašanje, otvoreno polje

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

Ocjenitelji: Dr. sc. Dubravka Hranilović, red. prof., Dr.sc. Sunčica Bosak, doc., Dr.sc. Zoran Marčić, doc.

Rad prihvaćen: 19.02.2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

### **INFLUENCE OF NEONATAL HYPOXIA UNDER HYPOBARIC CONDITIONS ON BEHAVIOUR IN YOUNG RATS**

Monika Stipan

Rooseveltova trg 6 , 10 000 Zagreb, Croatia

#### **ABSTRACT**

Prenatal hypoxic event can be the cause of many neurological conditions like epilepsy, cerebral palsy, mental retardation and attention deficit disorder (ADHD), as well as neurodegenerative diseases. We are using a non-invasive rat model to investigate the consequences of these prenatal hypoxic events. In contrast to invasive rat models that have been used before, non-invasive model reduces the possibility of surgical procedure to influence results of the experiment. Our neonatal rat brain model corresponds with the brain of human fetus during the last trimester of pregnancy when hypoxic events are most frequent. The aim of this study was to establish whether the exposure to hypobaric hypoxia on the first postnatal day causes changes in locomotion, sociability, exploratory behavior, anxiety and learning in young rats. We monitored behavior of young rats exposing them from 34.– 45. PND to following behaviour tests: open field, hole-board, T-maze and social choice. Results showed significant changes in locomotion and exploratory behaviour. In the open field test young hypobaric rats moved faster, passed longer distances and reared more compared to the control group. In the hole-board test hypobaric males visited more holes than the males from control group. The obtained results point to conclusion that hyperactivity may represent one of the possible consequences of neonatal exposure to hypobaric hypoxia.

(40 pages, 20 figures, 46 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: hypobaric chamber, non-invasive model, hyperactivity, explorator behaviour, open field

Supervisor: Dr. Dubravka Hranilović, Prof.

Reviewers: Dr. Dubravka Hranilović, Prof., Dr. Sunčica Bosak, Asst. Prof., Dr. Zoran Marčić, Asst. Prof.

Thesis accepted: 19.02.2020.

# SADRŽAJ

<b>1. Uvod</b> .....	1
<b>1.1. Hipoksija, ishemija i asfiksija</b> .....	1
<b>1.1.1. Prenatalna hipoksija fetusa – definicija i uzroci</b> .....	2
<b>1.1.2. Sustavni i stanični učinci hipoksije – odgovor na hipoksiju</b> .....	4
<b>1.1.3. Učinak hipoksije na središnji živčani sustav (cerebralna tkivna ozljeda)</b> ....	5
<b>1.2. Hipoksično- ishemična encefalopatija (HIE)</b> .....	8
<b>1.3. Animalni modeli hipoksije</b> .....	13
<b>1.3.1. Invazivni modeli hipoksije – Kombinirani HI modeli</b> .....	14
<b>1.3.2. Neinvazivni modeli hipoksije – Modeli čiste hipoksije</b> .....	15
<b>2. Cilj istraživanja</b> .....	17
<b>3. Materijali i metode</b> .....	18
<b>3.1. Materijali</b> .....	18
<b>3.1.1. Životinje</b> .....	18
<b>3.1.2. Aparatura</b> .....	18
<b>3.2. Metode</b> .....	21
<b>3.2.1. Testiranje u otvorenom polju</b> .....	21
<b>3.2.2. Testiranje na ploči s rupama</b> .....	21
<b>3.2.3. Testiranje u T-labirintu</b> .....	21
<b>3.2.4. Testiranje u aparatu društvenog odabira</b> .....	22
<b>3.3. Statistička obrada podataka</b> .....	22
<b>4. Rezultati</b> .....	23
<b>4.1. Rezultati testa u otvorenom polju</b> .....	23
<b>4.2. Rezultati testa na ploči s rupama</b> .....	25
<b>4.3. Rezultati testa u T-labirintu</b> .....	27
<b>4.4. Rezultati testa društvenog odabira</b> .....	28
<b>5. Rasprava</b> .....	30
<b>6. Zaključak</b> .....	35
<b>7. Literatura</b> .....	36
<b>8. Životopis</b> .....	40

## **POPIS KRATICA**

ADHD – poremećaj hiperaktivnosti i deficita pažnje (eng. *Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder*)

AMPA -  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionska kiselina

ATP – adenzin trifosfat

CCH - kronična kontinuirana hipoksija (eng. *Chronic Continuous Hypoxia*)

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

CNS – središnji živčani sustav (eng. *Central Nervous System*)

HH – hipobarična hipoksija

HI – hipoksija-ishemija

HIE – hipoksično-ishemična encefalopatija

IUGR - intrauterini zastoj rasta (eng. *Intrauterine Growth Restriction*)

NMDA – N-metil-D-aspartat- $\alpha$ -aminohidroksil-5-metil-4-izoksazol propionska kiselina

NOS – dušik-monoksid sintetaza (eng. *Nitric Oxide Synthase*)

OPC - progenitorske stanice oligodendrocita (eng. *Oligodendrocyte Progenitor Cells*)

PND – postnatalni dan

Pre-OL – preoligodendrociti

PVL – periventrikularna leukomalacija



# 1. Uvod

## 1.1. Hipoksija, ishemija i asfiksija

Oksigenacija tkiva, organa i stanica najvažniji je proces za sva živa bića na Zemlji. Najvažniji element oksigenacije je kisik kojeg ima mnogo u biosferi, čak 20,9% na morskoj razini. Kisik je za sva živa bića nezamjenjiv jer djeluje kao glavno gorivo metaboličkih procesa bez kojeg nijedna stanica ne može obavljati svoje funkcije i održavati homeostazu čitavog organizma. Funkcionira kao krajnji primatelj elektrona u reakcijama proizvodnje energije, ali djeluje i kao supstrat u formiranju nekih signalnih molekula. Brojni vanjski i unutarnji faktori mogu dovesti do smanjenja njegove koncentracije u organizmu te se takvo fiziološko stanje zove hipoksija (Singer, 2007).

Središnji živčani sustav (eng. *Central Nervous System*, CNS) je nedostatkom kisika najugroženiji. Mozak je metabolički vrlo aktivan organ te ne sadrži rezerve kisika (Sun, 1999). U stanju budnosti metabolizam mozga iznosi oko 15% ukupnog metabolizma u tijelu. Tijekom opsežne moždane aktivnosti metabolizam neurona se može povećati za 100-150%. Zbog intenzivnog metabolizma ne može se odvijati anaerobni metabolizam koji inače omogućava energiju većini drugih tkiva u tijelu te zbog toga nedostatak kisika predstavlja veliki problem za živčane stanice mozga (Hall, 2015). Ukoliko se u mozgu ne uspostavi normalni dotok kisika, u roku od 5 do 8 minuta dolazi do nepopravljivih oštećenja ili smrti (Sun, 1999).

U slučaju nedostatka kisika možemo razlikovati tri stanja – anoksiju, hipoksiju i ishemiju. Anoksija se često zamjenjuje sa hipoksijom, međutim ona postoji kada je unutarstanični pritisak kisika jednak nuli. Hipoksija označava smanjeni dotok kisika moždanim stanicama (bez utjecaja na moždani krvotok) dok ishemija označava smanjenu opskrbu moždanih stanica krvlju što posljedično znači i smanjenu opskrbu kisikom te hranjivim tvarima (Sun, 1999). Uz anoksiju, hipoksiju te ishemiju vrlo bitan pojam je i asfiksija. Asfiksija se može definirati kao stanje narušene izmjene plinova, koje je obilježeno porastom laktata, ugljikovog dioksida i drugih otpadnih produkata, kao i značajnim smanjenjem koncentracije kisika u krvi. Ovaj složeni klinički problem posljedica je različitih stupnjeva hipoksije te se javlja zbog poremećaja izmjene respiracijskih plinova u posteljici fetusa tijekom porođaja ili u plućima novorođenčeta nakon rođenja. U istraživanjima na životinjskim modelima mogu se posebno ispitivati mehanizmi nastanka

asfiksije, hipoksije ili ishemije, dok je u kliničkoj praksi gotovo nemoguće odvojiti ta stanja te se ona zajednički označavaju kao hipoksično-ishemična ozljeda (Šumanović-Glamuzina, 2007).

Do hipoksije dolazi zbog ograničenog pristupa kisiku (visoke nadmorske visine - hipobarična hipoksija), nedovoljne cirkulacije krvi (hemoragija, tumor mozga, srčani zastoj), respiratorne disfunkcije (zastoj u dišnom putu, nefunkcionalnost pluća, problem u neuralnoj kontroli disanja) ili upotrebom toksina. Hipoksija-ishemija (HI) izaziva razna oštećenja neurona i mitohondrija, inducira ekspresiju raznih gena te uzrokuje bihevioralne i kognitivne poremećaje (Sun, 1999).

### 1.1.1. Prenatalna hipoksija fetusa – definicija i uzroci

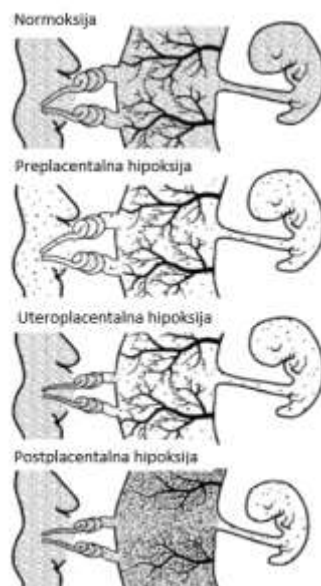
Prenatalni period ljudskog razvoja podrazumijeva fizički, kognitivni i psihički razvoj od začeca do 38. – 40. tjedna trudnoće tj. do poroda. To je doba najintenzivnijeg rasta te je podloga za budući psihološki razvoj. Prenatalna faza ljudskog života podijeljena je na germinativni (oplodnja-2.tjedan trudnoće), embrionalni (3.-8-tjedan trudnoće) i fetalni (9.tjedan-poroda) period(<https://courses.lumenlearning.com/boundless-psychology/chapter/prenatal-development/>). Germinativna faza je vrijeme implantacije te brze diobe zigote, embrionalna faza je doba brzog rasta i razvoja organa dok se u fetalnoj fazi najviše razvija mozak. Osim ove 3 faze, prenatalni period možemo podijeliti i na 3 tromjesečja trudnoće koja se vremenski ne preklapaju sa prethodne tri faze.

Kako bi se opisao razvoj trudnoće od zadnje mjesečnice, koristi se klinički termin gestacijski period (eng. „*menstrual age*“). Termin porođaja može biti: prijevremen (eng. *early term*) između 37. i 38. gestacijskog tjedna, pravovremen (eng. *full term*) između 39. i 40. gestacijskog tjedna i kasni (eng. *postterm*) više od 42.gestacijskog tjedna (Definition of term pregnancy. Committee Opinion No. 579., 2013).

Tijekom trudnoće, embriogeneza se odvija u hipoksičnom okolišu prvih 10 tjedana jer je tlak kisika u placenti mnogo niži od tlaka u okolnom endometriju. U tom periodu tzv. proces "začepljenja" štiti rastući embrij i placentalne resice od oksidativnog oštećenja, a antioksidativni enzimi nisu eksprimirani prije 8.-9. tjedna trudnoće (Hutter i sur., 2010). U tom periodu trudnoće kao i za vrijeme poroda kada je prisutan izvjestan stupanj hipoksije i acidoze može se tolerirati nedostatak kisika. Ova su kolebanja plinova u arterijskoj krvi ipak blaga i reverzibilna pa se vjeruje da imaju fiziološku ulogu u pripremi fetusa za početak normalnog

disanja (Šumanović-Glamuzina, 2007). Tijekom 2. i 3. tromjesečja trudnoće, kada se odvija intenzivan rast fetusa, oksigenacija postaje bitan faktor razvoja. Kronična prenatalna hipoksija dovodi do zastoja u rastu između 25. i 31. gestacijskog tjedna, kada bi on trebao biti eksponencijalan (Hutter i sur., 2010).

Prenatalna hipoksija rezultat je raznih kliničkih stanja majke i fetusa. Vrlo bitan faktor je pravilan razvoj placente čijim narušavanjem može doći do asfiksije (gušenja), zastoja rada organa, intrauterinog zastoja rasta (eng. *intrauterine growth restriction*-IUGR), ranijeg poroda te smrti pri porođaju, a postnatalno do cerebralne paralize, gubitka sluha te kroničnih plućnih bolesti. Budući da pravilan prijenos kisika fetusu ovisi o razvoju i ravnotežnoj cirkulaciji između placente i maternice te placente i fetusa predložene su 3 kategorije fetalne hipoksije: (1) preplacentalna hipoksija, gdje placenta i fetus postaju hipoksični zbog smanjene koncentracije kisika u majčinoj krvi, (2) utero-placentalna hipoksija, u kojoj je majčina krv normalno oksigenirana međutim utero-placentalna cirkulacija je smanjena te (3) post-placentalna hipoksija, u kojoj je samo fetus hipoksičan, što je povezano sa smanjenim protokom arterijske krvi kroz maternicu zbog mehaničke kompresije, rupture, trombonične okluzije, progresivnog zatajenja srca ili zbog genetičkih abnormalnosti. Ovaj tip je više povezan s bolestima fetusa nego s utjecajem hipoksije na fetus (Slika 1.1.). Izloženost vanjskim hipoksičnim uvjetima u okolišu (visoka nadmorska visina – hipobarična hipoksija) te unutarnja klinička stanja majke (cijanotična bolest srca, zastoj srca, plućna hipertenzija, anemija, infekcije i kronične upale) dovode do preplacentalne hipoksije. Kronična izloženost visokim nadmorskim visinama povećava rizik za preeklampsiju iako u većini slučajeva do hipoksije dolazi zbog gestacijske hipertenzije. U slučaju utero-placentalne hipoksije također dolazi do preeklampsije, a najčešće je povezana s poremećajem u implantaciji tijekom rane faze trudnoće. Preeklampsija je kompleksan sistemski poremećaj koji se u trudnoći manifestira hipertenzijom te proteinurijom majke. Uzroci preeklampsije mogu biti povezani sa sistemskim upalnim odgovorom majke (Kingdom i Kaufmann, 1997; Hutter i sur., 2010).



**Slika 1.1.** Podrijetlo fetalne hipoksije. Stupanj osjenčanosti predstavlja stupanj oksigenacije (jača osjenčanost – više oksigenirano tkivo) (prema Kingdom i Kaufmann, 1997)

### 1.1.2. Sustavni i stanični učinci hipoksije – odgovor na hipoksiju

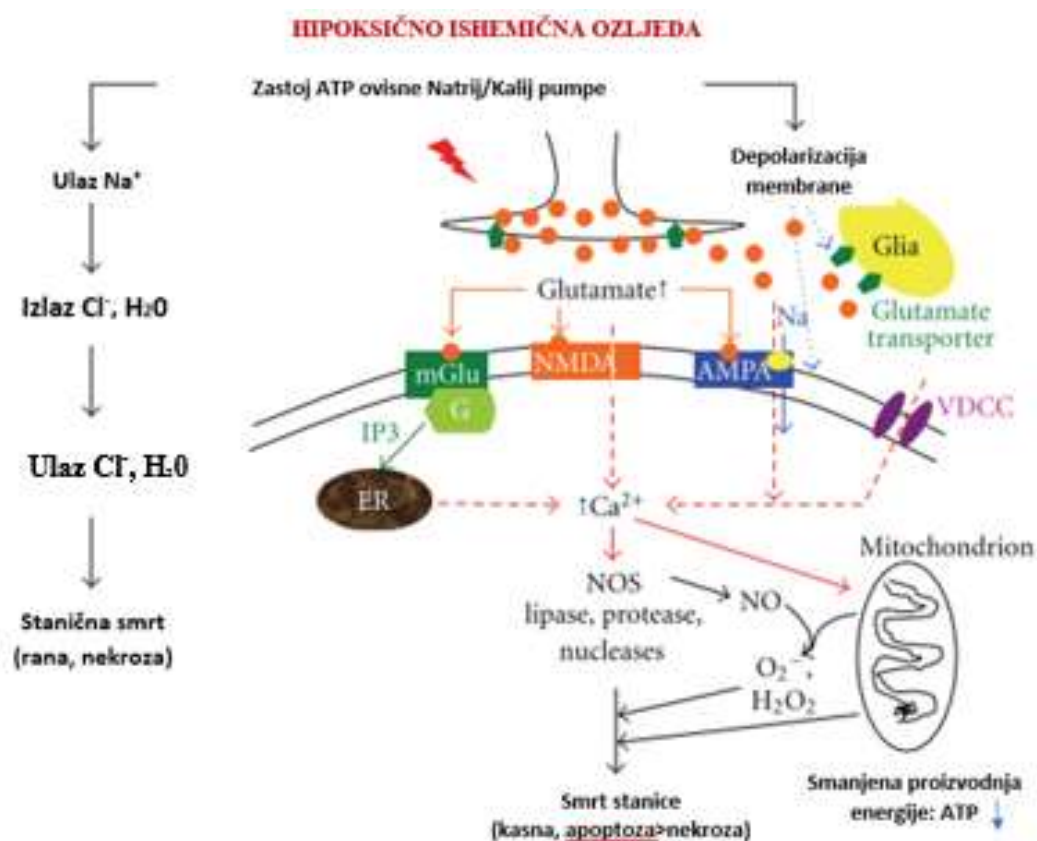
Tijekom HI stresa u fetusu nastaju razni mehanizmi kardiovaskularne i metaboličke adaptacije na ozljedu. U početnim fazama hipoksije fetus se može adaptirati na novonastalu situaciju smanjenjem oksigenacije tako da se omogući dotok nutrijenata i kisika vitalnim organima (mozak, miokard te nadbubrežne žlijezde) pri čemu dolazi do vazokonstrikcije i smanjenja protoka krvi kroz periferne krvne žile (bubrezi, probavni trakt, koža, mišići). Uslijed toga dolazi do porasta sistemskog krvnog tlaka (tzv. faza cirkulacijske kompenzacije). U slučaju dugotrajne hipoksije periferna vazokonstrikcija opterećuje miokard i smanjuje dotok krvi u desnu pretklijetku te dolazi do smanjenja srčanog minutnog volumena (pojava aritmije), sistemske hipotenzije i razvoja ishemije u svim organima (tzv. faza cirkulacijske dekompenzacije). Tijekom faze tzv. cirkulacijske dekompenzacije dolazi do oštećenja mnogih organskih sustava (Šumanović-Glamuzina, 2007). Hipoksija aktivira povećanu proizvodnju NO u stanicama miokarda. NO je biološki glasnik uključen u fiziološke procese kao što su neurotransmisija, kontrola krvnog tlaka, zgrušavanje krvi te imunološki odgovor. U kardiovaskularnom sustavu i mozgu NO djeluje kao vazodilatant (Depré, Fiérain i Hue, 1997). Dugotrajna hipobarična hipoksija uslijed izloženosti visokim nadmorskim visinama uzrokuje proliferaciju glatkih mišićnih stanica plućnih arterija kod fetusa. To dovodi do remodeliranja plućnih arterija te plućne hipertenzije novorođenčeta (Yang i sur., 2012).

Hipoksija dovodi i do narušavanja staničnog metabolizma. U normalnim aerobnim uvjetima glikolizom i oksidativnom fosforilacijom iz jedne molekule glukoze nastaje 32 molekula ATP-a. ATP daje energiju neuronskoj membranskoj pumpi koja drži unutarnju koncentraciju kalija visokom, a natrija, kalcija i klorida niskom (Sherwood i sur., 2012). Ta ionska izmjena je fiziološka podloga za prijenos živčanog signala. Nedostatkom glukoze i kisika, kod potpune hipoksije stanica potroši svoj glikogen i sve zalihe ATP-a unutar 10 minuta te se prebacuje na anaerobni metabolizam (proizvodi samo dvije molekule ATP-a iz svake molekule glukoze). Bez ATP-a natrij i klor ulaze u stanicu, voda pasivno slijedi, stanica bubri, puca i oslobađa svoj citosol u intersticijski prostor (Šumanović-Glamuzina, 2007).

### **1.1.3. Učinak hipoksije na središnji živčani sustav (cerebralna tkivna ozljeda)**

Hipoksični događaj u tkivu mozga može uzrokovati pad razine ATP-a od 90% u manje od 5 min. Smanjenje koncentracije ATP-a rezultira ulazom  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  te vode u stanicu što posljedično vodi nekrozi stanice. Kod manje ozbiljnih ozljeda dolazi do odgođene stanične smrti, apoptoze. Uzastopna depolarizacija membrane dovodi do pretjeranog otpuštanja presinaptičkog glutamata, ukidanja glutamatnog transporta u glija stanice te natrag u presinaptički završetak, aktivacije NMDA receptora te AMPA receptora. Uslijed ovih događaja dolazi do povećanog ulaska  $\text{Ca}^{2+}$  u stanicu i serije  $\text{Ca}^{2+}$  posredovanih kaskada za staničnu smrt. Štetan učinak citosolnog  $\text{Ca}^{2+}$  je višestruk: (1) degradacija celularnih lipida aktivacijom fosfolipaze, (2) aktivacija nukleaza te (3) povećanje stvaranja slobodnih radikala i NO (dušikovog monoksida) kroz povećanje NOS (sintetaza dušikovog oksida) (Slika 1.2.) (Yang i Lai, 2011). Izlaz glutamata u sinapsu izaziva ekscitotoksičnost tj. oštećivanje i odumiranje neurona zbog pretjerane stimulacije ekstracelularnim ekscitacijskim aminokiselinama (Mukandala i sur., 2016). U mozgu fetusa neuroni su osjetljiviji na ekscitotoksičnost više nego u odraslom mozgu. Najznačajnije ekscitacijske aminokiseline su glutamat i aspartat. Glutamat je citotoksičan u neuronskim i moždanim stanicama. Lučenjem glutamata, ulaskom kalcija u stanicu te depolarizacijom u hipoksiji dolazi do aktivacije neurona. Pad razine ATP-a dovodi do održavanja povećane koncentracije glutamata što dovodi do produljene stimulacije receptora. Jedan od 4 postsinaptička receptora za glutamat koji je važan za nezreli mozak je NMDA (N-metil-D-aspartat- $\alpha$ -aminohidroksil-5-metil-4-isoxazol propionska kiselina) receptor. NMDA receptor je esencijalna komponenta učenja i memorije, a kod hipoksije dolazi do njegove modifikacije. Budući da su NMDA receptori povezani s kanalima koji osiguravaju

ulazak natrija i kalcija, njihova aktivacija dovodi do ulaska kalcija u neuron, što štetno djeluje na stanično preživljavanje (Šumanović-Glamuzina, 2007). Jedna od posljedica porasta razine  $Ca^{2+}$  je povezana s oštećenjem i preopterećenjem mitohondrija te izlaskom citokroma c u citosol. Citokrom c ubija stanice na 2 načina: (1) aktivira citosolne kaspaze te (2) onemogućava oksidativnu fosforilaciju promovirajući proizvodnju slobodnih radikala (Sun, 1999). Slobodni radikali su vrlo reaktivni u prisutnosti masnih kiselina mozga kao što je arahidonska kiselina. Oni peroksidiraju staničnu membranu, ulaze preko krvno-moždane barijere te ometaju sintezu DNA. U konačnici remete stanični metabolizam a neuronska infrastruktura je uništena (Gieron-Korthals i Colón, 2005). Oštećenje mitohondrija centralni je događaj u sudbini stanice koja je pogođena hipoksijom/ishemijom. Upravo vrsta ozljede mitohondrija određuje način smrti stanice (nekroza ili apoptoza, tj. programirana smrt). Ako je ozljeda intenzivna, ona brzo dovodi do gašenja mitohondrijske funkcije, gubitka proizvodnje ATP-a i eksplozivne rupture jezgrine i citoplazmatske membrane što vodi u nekrozu (Šumanović-Glamuzina, 2007).

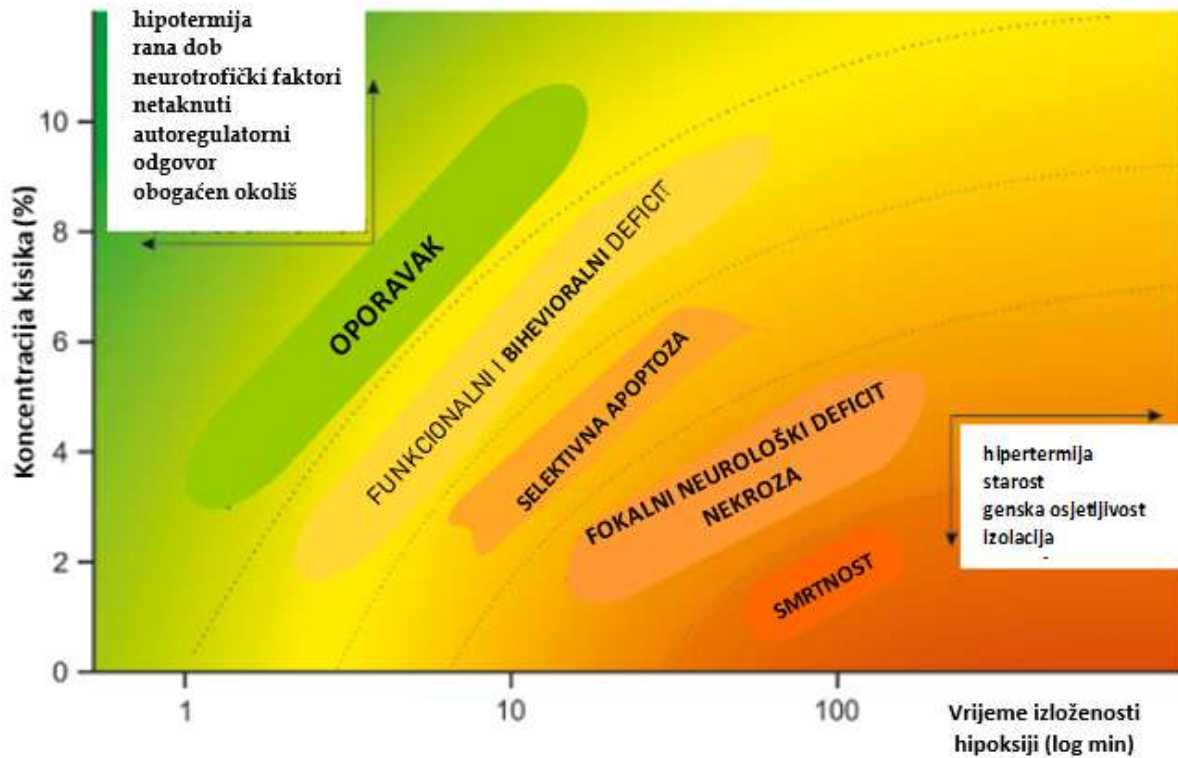


**Slika 1.2.** Neuronska osnova HI ozljede mozga. Središnju ulogu imaju ATP, depolarizacija membrana, glutamatom posredovana ekscitacija, voltažno-ovisni i glutamatom aktivirani kanali kalcijevih iona (Yang i Lai, 2011).

Stanice koje ne dobivaju dovoljno hranjivih tvari i kisika odumiru nekrozom ili apoptozom. Nekrotičnu smrt karakterizira bubrenje stanice, dezintegracija membrane, pucanje stanice, oslobađanje unutarstaničnog sadržaja te na kraju upala i fagocitoza. Apoptozu karakterizira kondenzacija i marginacija kromatina, skupljanje stanica, relativno očuvanje staničnih membrana i smrt bez upale. Nekrotična smrt stanice događa se nakon intenzivnih, ponekad relativno kratkih ozljeda, dok se apoptotska smrt stanica događa nakon manje intenzivnih, duže djelujućih ozljeda. Čini se da je apoptotska stanična smrt dominantan oblik tzv. odgođene stanične smrti, koja se može opaziti nakon nekoliko sati do nekoliko dana nakon ozljede. Način smrti stanice ovisi o njenom razvojnom stadiju te o tkivu kojem pripada. Tako se npr. hipokampus i duboki slojevi korteksa degradiraju ranije tijekom HI te pokazuju nekrozu dok apoptotsku staničnu smrt pokazuju stanice nezrele cerebralne bijele tvari (Balduini i sur., 2009; Kinney i Volpe, 2018a). Nakon HI ozljede također se aktivira autofagija kao odgovor na stres nakon ozljede glave ili fokalne cerebralne ishemije. Autofagija podupire apoptozu, programiranu smrt koja treba energiju da bude izvršena te usporava nekrozu. Ako dođe do ponovnog protoka krvi kroz tkivo i stanice dobiju energiju, one možda prežive, međutim, ako apoptoza nije prekinuta, stanice odumiru i uklanjaju ih makrofagi. Ukoliko dođe do nekoliko ozljeda mozga istovremeno, taj sustav uklanjanja odumrlih stanica neće biti moguć te mnoge stanice neće imati dovoljno energije da izvrše apoptozu ili mogu biti oštećene autofagijom. Stoga, apoptoza može prijeći u nekrozu, što rezultira hibridnim fenotipovima stanične smrti (Balduini i sur., 2009). Novije studije pokazuju da je u nezrelom mozgu, u regijama cerebralnog korteksa i bazalnih ganglija, veći broj apoptotičnih nego nekrotičnih stanica u razdoblju od preko sedam dana nakon hipoksične ozljede (Šumanović-Glamuzina, 2007). Dakle, mehanizmi neuronske stanične smrti nakon hipoksije su, ovisno o ozbiljnosti ozljede, stupnja zrelosti i fenotipa stanica: nekroza, apoptoza, autofagija i hibridna stanična smrt.

Odgovor organizma na hipoksiju te stupanj težine HI ozljede ovisi o raznim unutarnjim i vanjskim (perifernim) faktorima (Slika 1.3.). Neki od unutarnjih faktora su genetička predispozicija te tip stanice i regija mozga na koji djeluje hipoksija kao i stupanj razvijenosti i faza diobe u kojoj se nalaze stanice. Zbog razlika u metabolizmu postoji različita osjetljivost pojedinih dijelova mozga na hipoksiju npr. takvu vrst posebne osjetljivosti pokazuju Purkinjeove stanice cerebeluma, CA1 stanice hipokampusa i kaudatne jezgre, 3., 5. i 6. sloja neokorteksa u djece, dok su granulozne stanice dentatnog girusa vrlo otporne na ovakve tipove ozljeda. Također, razni periferni faktori kao što su gestacijska dob, tjelesna temperatura, rezerve kisika, mehanizam regulacije kardiovaskularnog sustava, imunološki i hormonalni odgovori,

lijekovi dati majci uvelike utječu na težinu HI ozljede (Šumanović-Glamuzina, 2007; Hefter i sur., 2018). Iako je mozak fetusa otporan na hipoksiju, sam proces autoregulacije nije; stoga, gubitak autoregulacije dovodi do ishemije što na kraju rezultira perinatalnom asfiksijom te hipoksično-ishemičnom encefalopatijom (Gieron-Korthals i Colón, 2005; Mukandala i sur., 2016).



**Slika 1.3.** Kvalitativni učinci hipoksije ovisno o ozbiljnosti i trajanju hipoksije. Zeleno je prikazano kako ozljeda uzrokovana hipoksijom nije dugotrajna ili čak u nekim slučajevima može biti protektivna. Kroz narančastu i crvenu boju prikazano je sve ozbiljnije stanje funkcionalnih i strukturalnih deficita te smrtnost (crveno). Protektivni faktori su nabrojani u gornjem lijevom kutu a štetni u donjem desnom kutu (Hefter i sur., 2018).

## 1.2. Hipoksično- ishemična encefalopatija (HIE)

Zbog ozljeda mozga uslijed prenatalne hipoksije, kod djece rođene u terminu dolazi do hipoksično-ishemične encefalopatije (HIE). HIE je podskupina šireg pojma neonatalne encefalopatije čija je klinička definicija asfiksija dotoka krvi fetusu kroz pupčanu vrpцу u dobi od 36.gestacijskog tjedna na više. Neonatalna HI je najčešći uzrok smrti i poremećaja kod

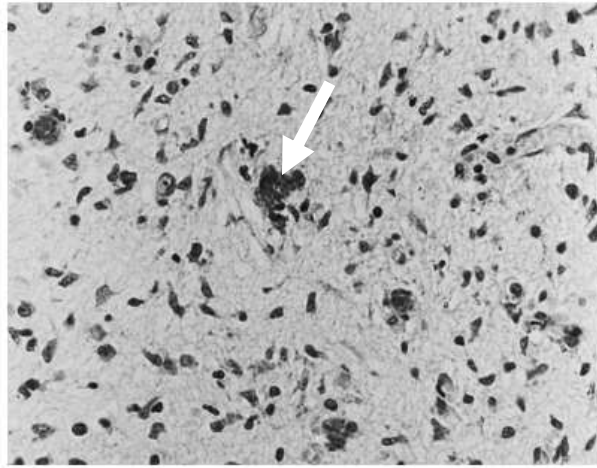


novorođenčadi. Od djece koja prežive neonatalnu HI njih 5-10% ima deficite motoričkog sustava, 20-50% senzoričkog sustava i kognicije koji se nastavljaju sve do puberteta (Hadžimuratović, 2013; Millar i sur., 2017).

Osnovna podloga hipoksično-ishemične encefalopatije je nekroza neurona koja je odraz teške hipoksije te se obično razvija u prva 72 sata života. Autorski tim Sarnat i Sarnat (1976) definirao je „sindrom HIE“ u tri stupnja: blaga HIE (stupanj I), umjerena HIE (stupanj II) te ozbiljna HIE (stupanj III). Stupanj I HIE obično traje manje od 24 sata a neuroloških oštećenja u kasnijoj dobi nema. Od 20-40% djece iz druge kategorije HIE razvija neurološka oštećenja, posebice ako abnormalna neurološka simptomatologija traje dulje od jednog tjedna. Sva novorođenčad s neurološkim poremećajem iz treće kategorije (stupanj III. HIE) imaju ozbiljne neurološke posljedice, npr. cerebralnu paralizu, epilepsiju, mentalnu retardaciju ili mikrocefaliju.

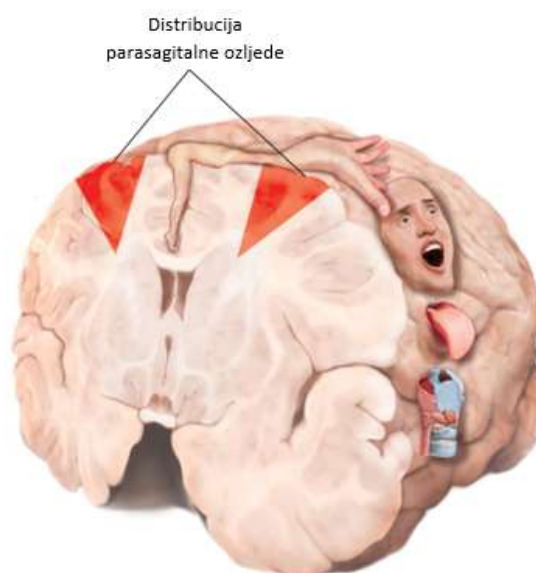
HIE se može klasificirati kao fokalna i globalna ozljeda mozga. Fokalna HIE je posljedica embolijske ili trombotičke okluzije cerebralnih arterija ili vena, upalne vaskulopatije ili cerebralne hemoragije. Globalna HIE rezultat je narušene cirkulacije čitavog mozga. Ozljeda može biti potpuna ili nepotpuna. Potpuna ozljeda izaziva brzu smrt neurona i glije u pogođenoj regiji i ireverzibilna je dok kod nepotpune ishemije obično postoji poremećaj dotoka kisika i nutrijenata do stanice i nakupljanje toksičnih produkata (citotoksični učinak hipoksije). Ukoliko ubrzo ne dođe do normalnog dotoka kisika i nutrijenata, dolazi do smrti neurona (Šumanović-Glamuzina, 2007).

Hipoksično-ishemična ozljeda mozga, ovisno o gestacijskoj dobi djeteta, dovodi do različitih neuropatoloških oblika cerebralnih lezija, a mogu se uočiti četiri osnovna obrasca moždanog oštećenja: selektivna neuronska nekroza, parasagitalna cerebralna ozljeda, periventrikularna leukomalacija te fokalna (i multifokalana) ishemijska nekroza. Selektivna neuronska nekroza (Slika 1.4.) započinje 5 do 10 minuta nakon početka hipoksije vakuolizacijom citoplazme zbog bubrenja mitohondrija. Znaci stanične nekroze, pojava mikroglijalnih stanica te hipertrofičnih astrocita uočavaju se 3-5 dana nakon ozljede. Nekrotični debris konzumiraju makrofagi, a teške lezije mogu rezultirati stvaranjem šupljina u cerebralnom korteksu (Hadžimuratović, 2013).



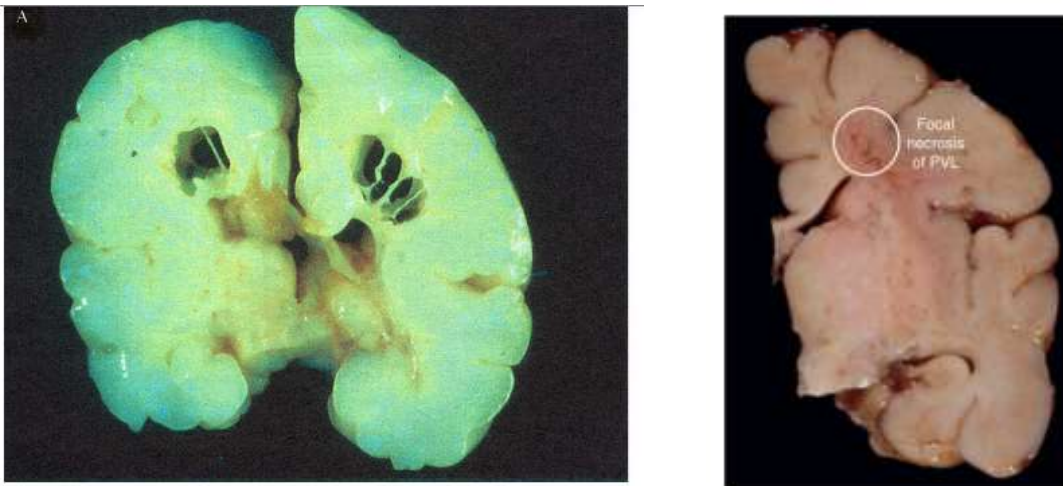
**Slika 1.4.** Selektivna nekroza neurona (označena strelicom) uslijed hipoksično-ishemične ozljede mozga (Kinney i Volpe, 2018a)

Parasagitalna cerebralna ozljeda (Slika 1.5.) je bilateralna, obično simetrična, nekroza korteksa i subkortikalne bijele tvari, iako može biti upečatljivija u jednoj od hemisfera. Kod ove ozljede obično je parijetalno-okcipitalna regija više zahvaćena od anteriorne. Često se za ovu ozljedu koristi engleski termin „*watershed infarct*”, čime se naglašava njena ishemijska priroda (Hadžimuratović, 2013).



**Slika 1.5.** Shematski prikaz parasagitalne ozljede mozga označene simetričnim crvenim područjem (Kinney i Volpe, 2018b)

Periventrikularna leukomalacija (PVL) odnosi se na fokalnu nekrozu bijele tvari s karakterističnom distribucijom (npr. nekroza bijele tvari dorzalno i lateralno od vanjskih uglova bočnih ventrikula) te difuznom gliozom oko i periferno od područja nekroze. Ova fokalna nekroza može se pojaviti u dva obika, kao cistična PVL i kao necistična PVL. Cistična PVL podrazumijeva klasičnu leziju kod koje je fokalna nekroza makroskopska i dovodi do formiranja cista, dok necistična PVL podrazumijeva leziju kod koje je fokalna nekroza mikroskopska i vodi ka formiranju malog ožiljka od glije, a ne nastanku cista (Slika 1.6.) (Hadžimuratović, 2013).

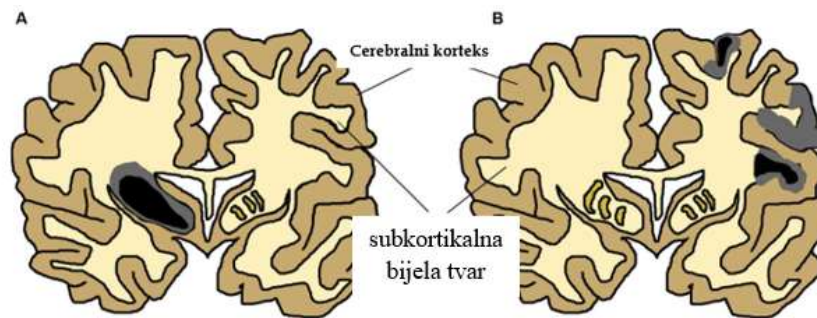


**Slika 1.6.** Lijevo: koronalni pogled mozga novorođenčeta rođenog prije termina (23. gestacijski tjedan), prikaz periventrikularne cističke leukomalacije (Yager, 2004).

Desno: Fokalna nekroza u dubini bijele tvari (u krugu) kao bijele točke (eng. *white spots*) kod periventrikularne leukomalacije (Kinney i Volpe, 2018a).

Neuroanatomske promjene mozga neonatalne HI (Slika 1.7.) uočene su uglavnom u regijama bijele tvari koja je opisana kao selektivno osjetljiva na HI ozljede. Iako postoje varijacije uključenih anatomskih područja između pojedinaca, prevladavaju pretežne ili znatne ozljede cerebralnog korteksa, bazalnih ganglija te talamusa. Lezije bazalnih ganglija i talamusa prisutne su u 40-80% slučajeva neonatalne HI dok su kod 40-60% primijećene abnormalnosti bijele tvari i korteksa. Lezije u području korteksa te bazalnih ganglija tijekom početne faze HI ozljede, prediktor su poremećaja govora te motorike u djetinjstvu. Djeca s ozljedom bazalnih ganglija i talamusa imaju teže ishode, uključujući cerebralnu paralizu i epilepsiju.

Novorođenčad s ozljedama bijele tvari i korteksa ima više kognitivnih nego motoričkih poteškoća (Millar i sur., 2017).



**Slika 1.7.** Pojednostavljeni shematski prikaz ozljede mozga neonatalne HI, ozljede približno odgovaraju području primarne somatosenzoričke te motoričke kore. Dva glavna uzorka ozljede su prikazana odvojeno ali u stvarnosti se djelomično preklapaju. Različito obojenje prikazuje centar nekroze (crno) te manje akutno oštećeno tkivo (sivo). (A) Prikaz oštećenja u području bazalnih ganglija te talamusa (B) Prikaz oštećenja dijela korteksa te pripadajuće bijele tvari (Millar i sur., 2017).

Kod neonatalne hipoksije je ključan *timing* tj. vremenski period u razvoju mozga u kojem je došlo do hipoksije. *Timing* određuje učinak hipoksije na staničnu kompoziciju te strukture specifičnih regija mozga a samim time i formiranje fizioloških funkcija (Nalivaeva i sur., 2018). Tijekom druge polovice trudnoće (23. do 32. gestacijski tjedan) u mozgu fetusa odvijaju se počeci proizvodnje pre-oligodendrocita (pre-OL) te rana mijelinizacija. Upravo zbog ovog procesa djeca rođena prije termina najrizičnija su skupina periventrikularne leukomacije. PVL uključuje smanjenje broja zrelih oligodendrocita te posljedično smanjenje mijelinizacije. Kod odraslog mozga nezrele OPC (progenitorske stanice oligodendrocita) mogu repopulirati novonastalu leziju, međutim izgleda da su kod nezrelog mozga na neki način blokirane. Hipoksija utječe na oligodendrogenezu i diferencijaciju oligodendrocita preko 2 ključna proteina staničnog ciklusa, CDK2 i njegovog inhibitora P27. Djeca rođena prije termina s vrlo malom težinom često pokazuju neurobiološke, motoričke, kognitivne i bihevioralne poremećaje uključujući epilepsiju te cerebralnu paralizu (Jablonska i sur., 2012). Osim mijelinizacije u tom kritičnom periodu razvoja odvija se i sinaptogeneza. Nepravilna komunikacija mikroglije i neurona tijekom sinaptogeneze može rezultirati poremećajima. Budući da su glija stanice jako aktivne u bijeloj tvari mozga tijekom razvoja fetusa, pretpostavlja se da pridonose periventrikularnoj ozljedi bijele tvari. U odraslom mozgu mikroglija proizvodi neuroprotektorne faktore rasta, dok to nije dokazano u mozgu fetusa. Mikroglija u mozgu fetusa

proizvodi toksične reaktivne oksidanse te na taj način dovodi do ozljede (Mallard i Vexler, 2015). Također ekspresija nekih gena tijekom prenatalnih hipoksičnih stanja nastavlja se i u odrasloj dobi kada više nema hipoksije te se stanja proizvedena tijekom hipoksije pojavljuju i u normalnom okolišu što dovodi do kardiovaskularnih bolesti kasnije u životu (Hutter i sur., 2010).

Kao rezultat ovih neuroanatomskih ozljeda HIE, posljedično se razvijaju razni bihevioralni, kognitivni te motorički deficiti kao i neurodegenerativne bolesti. Preživjela nedonoščad najčešće pokazuje neuropatološka stanja poput epilepsije, cerebralne paralize, cerebralne ishemije te psihološke poremećaje (Sanches i sur., 2013). HIE je jedna od podloga nastanka ili povećava rizik razvoja neuropatoloških stanja poput moždanog udara, Parkinsonove i Alzheimerove bolesti ili shizofrenije. Također povećava rizik razvoja poremećaja pažnje i hiperaktivnosti (ADHD) kod djece (Nalivaeva i sur., 2018).

### **1.3. Animalni modeli hipoksije**

Animalni modeli prenatalne ozljede uzrokovane hipoksijom trebali bi oponašati ranije opisana stanja kod novorođenčadi. Istraživanja na *in vivo* modelima trebala bi poboljšati naše znanje o mehanizmima ozljede, razumijevanje nastanka i razvoja ozljede i njenih ishoda te razviti predložak prema kojem možemo usmjeriti strategije liječenja. Takvi modeli bi trebali imati određene karakteristike kako bi mogli adekvatno reprezentirati ishode pronađene kod novorođenčadi. Za novorođenčad koja ima cerebrovaskularnu ozljedu mozga model bi trebao oponašati etiološke osnove prema kojima je došlo do ozljede, reflektirati histopatološki spektar ozljede mozga u razvoju te u idealnom slučaju odražavati funkcionalne ishode viđene kod novorođenčadi i djece (Yager, 2004). Od većih životinjskih modela sisavaca, za istraživanje HI ozljeda u nezrelom mozgu korišteni su ovce, kunići i svinje zbog sličnosti omjera bijele i sive tvari mozga, u usporedbi sa ljudima. Međutim glodavci, prvenstveno štakori su još uvijek najviše korišteni modeli prenatalne hipoksije zbog male veličine, kraćeg reproduktivnog ciklusa i niskih troškova uzgajanja (Mallard i Vexler, 2015).

Usporedbom anatomije neurona, vremena neurogeneze, sinaptogeneze, gliogeneze te mijelinizacije neurona kao i molekularnih i biokemijskih promjena koje se odvijaju u mozgu štakora, zaključeno je kako razvoj mozga ljudi i štakora nije vremenski istovjetan. Razvoj živčanog sustava kod ljudi se odvija u vremenskom okviru tjedana i mjeseci dok se kod

glodavaca odvija u okviru nekoliko dana. Proliferacija i migracija neurona u ljudi se odvija između 4. i 24. gestacijskog tjedna. Kod glodavaca se isti proces odvija u danima (gestacijski dan 11 do 16). Sinaptogeneza se kod ljudi odvija postepeno tijekom prvih mjeseci gestacije, ali se njen vrhunac odvija postnatalno (tijekom 1. i 2. godine života te adolescencije), dok se kod glodavaca odvija brzo tijekom kasnije gestacije pa do prva 3 tjedna postnatalno. NMDA receptor ekscitatornih aminokiselina počinje se razvijati u hipokampusu i entorinalnom korteksu tijekom sredine gestacije, a vrhunac je tijekom 24. tjedna te tada dostigne razinu koja je prisutna i u odraslom mozgu. Mozak štakora 1. postnatalnog dana (PND1) do PND5 odgovara 23.–32. gestacijskom tjednu kod ljudi te je prikladan za proučavanja ozljeda djece rođene prije termina. Mozak štakora od PND7 do PND10 odgovara 36. do 40. gestacijskom tjednu kod ljudi stoga je prikladan za proučavanje ozljeda nastalih kod djece rođene u terminu (Yager, 2004; Mallard i Vexler, 2015).

Animalni modeli prenatalne hipoksije mogu se podijeliti u 2 glavne grupe: kombinirani HI modeli i modeli hipoksije bez ligacije (tzv. čiste hipoksije) (Hefter i sur., 2018).

### **1.3.1. Invazivni modeli hipoksije – Kombinirani HI modeli**

Model koji je omogućio proučavanje fundamentalnih mehanizama HI-vezanog oštećenja mozga u razvoju je Rice-Vannucci model iz 1981. godine (Rice i sur., 1981). Model koristi neonatalne mladunce štakora 7. postnatalnog dana (PND7). Ovim modelom hipoksični uvjeti postignuti su unilateralnom ligacijom karotidne arterije nakon čega su mladunci bili izloženi uvjetima sa 8% kisika u periodu od 3 sata. Autori su smatrali da se samo kombinacijom hipoksije i ishemije mogu postići funkcionalne i strukturne promjene zbog kompromitirajućeg dotoka nutrijenata i kisika ipsilateralnoj hemisferi. U originalnoj publikaciji promjene su primijećene 50 sati nakon ozljede. Primijećena je kombinirana nekroza i apoptoza neuronskih stanica neokorteksa, hipokampusu, strijatuma i bijele tvari ipsilateralne strane mozga. Kontralateralna strana je bila neoštećena te je mogla poslužiti kao unutarjna kontrola. Ozljede ovih struktura posljedično dovode do raznih bihevioralnih poremećaja (poremećaja pažnje, kognicije te senzoričko-motoričkih poremećaja). Također je ustanovljeno da su oni specifični za hemisferu i spol. Lezije u desnoj hemisferi uzrokovale su poremećaje radne memorije a ženke s okluzijom na lijevoj strani imale su smanjenu sposobnost prostorne memorije i veće

histološko oštećenje u usporedbi s mužjacima s okluzijom na istoj strani i ženka s okluzijom na desnoj strani (Hefter i sur., 2018; Nalivaeva i sur., 2018). Ovaj model daje osnove za već sada dobro dokumentirane bihevioralne fenotipove: poremećaj prostorne memorije, motoričke funkcije i refleksa, abnormalnosti senzoričkog procesiranja te ostalih kognitivnih fenotipova, uključujući poremećaje pažnje (Millar i sur., 2017).

Postoji još nekoliko modifikacija Rice-Vannuci modela, npr. Renolleau i kolege proučavali su model prolazne unilateralne HI ozljede kod štakora starih 7 dana (stupanj ozljede se u ovom slučaju povećao), Schwarzov model bilateralne ligacija karotidne arterije, prolazna bilateralna ligacija karotidne arterije u periodu od 5 do 10 minuta. Kod ove zadnje metode znanstvenici su došli do otkrića da su najosjetljivije stanice u slučaju PVL progenitorske oligodendroglia stanice (Yager, 2004).

U invazivne metode hipoksije možemo još svrstati i neke kirurške te kemijske metode. Kirurške metode se uglavnom koriste prenatalno na način da se smanji dotok krvi fetusu okluzijom pupčane vrpce ili unilateralnom ligacijom uterine arterije. Kemijske metode uglavnom podrazumijevaju administraciju natrijevog nitrita ili inhibitora sinteze natrijevog oksida (L-NAME) (Nalivaeva i sur., 2018). Sve metode rezultirale su gubitkom neurona kortikalnom nekrozom ili leukomalacijom, ovisno o dobi kada su jedinke bile izložene hipoksiji.

### **1.3.2. Neinvazivni modeli hipoksije – Modeli čiste hipoksije**

Prenatalna hipoksija neinvazivnom metodom može se postići izlaganjem trudnih štakorica ili neonatalnih mladunaca hipoksiji u komori sa smanjenom koncentracijom kisika pri normalnom tlaku (normobarična komora) ili sniženom tlaku (hipobarična komora). Kisik se postepeno zamjenjuje nekim inertnim plinom (obično dušikom), a hipobarična komora reprezentira hipoksiju kod visokih nadmorskih visina. Također hipoksija se može postići izlaganjem trudnih štakorica kroničnim niskim koncentracijama ugljikovog monoksida (Nalivaeva i sur., 2018).

Nije pokazana nikakva razlika u fiziološkim parametrima i cerebralnoj cirkulaciji prilikom usporedbe invazivne i neinvazivne metode izlaganja životinje u hipoksičnoj komori što znači da je nedostatak kisika bez ligacije karotidne arterije dovoljan za simulaciju HI uvjeta kod neonatalnih štakora (Zhang i sur., 2013).

Model čiste hipoksije može se podijeliti u tri kategorije: kronična intermitentna hipoksija (CIH - eng. *Chronic-Intermittent Hypoxia*), kronična kontinuirana hipoksija (CCH – eng. *Chronic Continuous Hypoxia*) te akutna hipoksija/anoksija. Kod CIH modela koristi se tzv. intermitentna komora u kojoj se izmjenjuju uvjeti normalne i smanjene količine kisika te su životinje povremeno izložene hipoksiji od 6-10% O<sub>2</sub> u nekoliko uzastopnih dana. Ta relativno blaga ozljeda obično dovodi do suptilnih funkcionalnih i bihevioralnih promjena bez prisutnosti nekrotične stanične smrti. CIH model s 10% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> i 85% N<sub>2</sub> u štakora PND7 – PND11 doveo je do dugotrajne hiperlokomocije, oštećenja radne memorije i poremećaja cirkadijanog ritma. Prenatalna CCH izaziva se kroz više uzastopnih dana u komori s 6-12%-tnom koncentracijom kisika. CCH rezultira povećanom hiperaktivnošću, agresijom i izraženim seksualnim ponašanjem u odrasloj dobi. Akutna hipoksija potiče konvulzije kod mladunaca štakora prethodno izloženih hipoksiji s 3-4%-tnim kisikom kroz 15 do 20 sekundi te anoksijom od 10 sekundi (Hefter i sur., 2018).

Animalni modeli hipobarične hipoksije do sada su rijetko prezentirani i istraženi, a najviše se istražuje utjecaj kronične hipobarične hipoksije kao posljedice izloženosti visokim nadmorskim visinama od 3000 do 5000 metara. Većinom su dobro istraženi poremećaji kognicije odraslih ljudi, odraslih štakora te ponekad i mladunaca koji su izloženi kroničnoj hipobaričnoj hipoksiji (Muthuraju i Pati, 2014). Što se tiče utjecaja hipobarične hipoksije kod neonatalnih mladunaca štakora, najpoznatiji model je onaj u kojem su mladunci izloženi hipobaričnoj hipoksiji (pO<sub>2</sub> 64.4 mmHg) svakodnevno 8 sati od PND1 do PND19. U tom istraživanju fokus je bio na prostornoj memoriji, dakle promatralo se postoje li promjene u hipokampusu. U korteksu štakora dan nakon hipobarične hipoksije, primijećen je mali utjecaj na astrocite, nisu primijećene promjene oligodendrocita, ali je opažena odgođena mijelinizacija (Šimonová i sur., 2003).



## **2. Cilj istraživanja**

Ovaj diplomski rad dio je većeg istraživačkog projekta kojim se na histološkoj, molekularnoj i bihevioralnoj razini pokušavaju istražiti i opisati posljedice neonatalne hipobarične hipoksije na razvoj mozga.

U diplomskom radu ispitivale su se moguće promjene u lokomociji, kogniciji te eksploratornom, anksioznom i socijalnom ponašanju mladunaca, izloženih hipoksiji u hipobaričnim uvjetima prvog postnatalnog dana, u odnosu na kontrolne mladunce koji nisu bili izloženi hipoksiji.

S ciljem utvrđivanja tih promjena, mladunci štakora kontrolne i ekperimentalne skupine podvrgnuti su bihevioralnim testovima u otvorenom polju, ploči s rupama, T-labirintu te testu društvenog odabira.

## 3. Materijali i metode

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Životinje

U istraživanju smo koristili 40 mladunca štakora soja Wistar, od kojih su, nakon nasumičnog odabira, 22 pripala tretiranoj (12 mužjaka i 10 ženki), a 18 kontrolnoj (8 mužjaka i 10 ženki) skupini. Parenje, okot i izlaganje hipobaričnoj hipoksiji izvršeno je na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga. Tamo su mladunci eksperimentalne skupine 1. postnatalnog dana stavljeni u toplu komoru ( $\approx 25^{\circ}\text{C}$ ) s hipobaričnim uvjetima (Atm 350mmHg,  $\text{pO}_2$  73mmHg) dok su kontrolni mladunci stavljeni u kavez s normoksičnim uvjetima (temp.  $25^{\circ}\text{C}$ ). Nakon tretmana u trajanju od 2 sata, obje skupine vraćene su u kavez s majkama. 28. PND mladunci su odvojeni od majki i dopremljeni na Zavod za Animalnu fiziologiju. 4-5 mladunaca je bilo smješteno u kaveze uz slobodan pristup hrani i vodi, osim tijekom provođenja testiranja u T-labirintu. Prostorija u kojem su se nalazili kavezi s mladuncima održavala se pri kontroliranoj temperaturi ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) i svjetlosnim ciklusima po 12 sati (svjetlo se palilo u 09 h, a gasilo u 21 h). Nakon aklimatizacije u trajanju od 3 dana mladunci eksperimentalne i kontrolne skupine bili su testirani od 34. do 45. PND u dolje navedenim aparaturama.

#### 3.1.2. Aparatura

- Otvoreno polje (Slika 3.1) je kutija veličine 80 cm x 80 cm x 70 cm. Kutija je napravljena od bijelog pleksiglasa, a na dnu je crna drvena ploča.



Slika 3.1 Otvoreno polje

- Ploča s rupama (Slika 3.2) je također kutija od bijelog pleksiglasa. Dimenzije kutije su 80 cm x 80 cm x 70 cm. Dno kutije je drvena ploča sa 16 ravnomjerno postavljenih rupa (4x4, a svaka rupa je promjera 4 cm). 12 rupa uz stijenke kutije fiktivno su podijeljene na rubne dok su preostale 4 u središtu ploče s rupama centralne.



Slika 3.2 Ploča s rupama

- T- labirint (Slika 3.3) je napravljen od crnog pleksiglasa te je oblika slova T. dimenzije postranih krakova su 55 cm x 35 cm x 10 cm, a središnjeg kraka 70 cm x 35 cm x 10 cm.



Slika 3.3 T- labirint

- Aparat za testiranje društvenog odabira (Slika 3.4) kvadratna je kutija dimenzija 90 cm x 90 cm x 50 cm. Kutija je prozirna, napravljena od pleksiglasa, a vanjske stranice su crne boje. Aparat je podijeljen na tri odjeljka dimenzija 90 cm x 30 cm x 50 cm. Odjeljci su spojeni vratima.



Slika 3.4 Aparat za testiranje društvenog odabira

- 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).

## **3.2. Metode**

Nakon nekoliko dana aklimatizacije, kontrolni i eksperimentalni mladunci štakora bili su, od 34. do 45. postnatalnog dana, podvrgnuti sljedećim testovima: testu u otvorenom polju u kojem se ispituje kretanje, testu na ploči s rupama za ispitivanje eksploratornog i anksioznog ponašanja, T- labirintu u kojem se ispituje sposobnost učenja te u aparatu za društveni odabir u kojem se testira društveno ponašanje. Sve testove provodili smo u poslijepodnevnim satima (od 13 do 17 h) te je nakon svakog mladunca aparatura dezinficirana 0,5%-tnom otopinom dezinficijensa neoform® MED F kako mirisi prethodne životinje ne bi ometali novu životinju u izvršavanju zadatka. Mladunci su bili snimani kamerom tijekom provođenja testova u otvorenom polju i u testu socijalnog odabira a određeni parametri su kasnije analizirani pregledom snimki.

### **3.2.1. Testiranje u otvorenom polju**

U testu u otvorenom polju svakog štakora stavili smo u sredinu polja i snimali 5 minuta te nakon toga pomoću računalnog programa izračunali duljinu prijednog puta (cm), vrijeme provedeno u gibanju (s) i brzinu kretanja (cm/s). Broj propinjanja (prednje šape ne dodiruju podnu ploču, a tijelo je uspravno) smo odredili pregledavanjem snimaka.

### **3.2.2. Testiranje na ploči s rupama**

U testu na ploči s rupama svakog štakora stavili smo na sredinu ploče i tijekom vremenskog perioda od 5 minuta ručno zabilježili ukupan broj posjećenih rupa (pokazatelj eksploratornog ponašanja) i broj posjećenih središnjih rupa iz kojeg smo izračunali 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 provodili smo jednom dnevno 5 dana uzastopno. Dan prije testiranja štakorima smo uklonili hranu te su dobivali hranu samo tijekom jednog sata nakon testiranja, kako bi bili dovoljno motivirani za pronalazak nagrade u T-labirintu. Prvi pokušaj nazvan je "nulti", njime smo odredili prirodni odabir štakora jednog kraka labirinta te smo mu u svim sljedećim pokušajima nagradu (komadić hrane) stavljali u suprotni krak. Svakog dana štakor bi imao 10 pokušaja u nizu da u vremenskom periodu od 60 sekundi pronađe hranu tj. skrene prema kraku labirinta u kojem se nalazi hrana. Ulazak u krak u kojem je smještena

hrana bilježili smo kao uspješan pokušaj. Ukoliko bi štakor bio uspješan u 8 od 10 pokušaja, smatrali smo da je naučio položaj hrane.

#### **3.2.4. Testiranje u aparatu društvenog odabira**

U testu društvenog odabira u jedan krajnji odjeljak kutije postavljen je predmet, a u drugi krajnji odjeljak nepoznati štakor istog spola, iz drugog kaveza (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 aparat, a zatim su se otvorila vrata drugih odjeljaka te je štakoru dano 5 minuta da istražuje obje komore, onu s drugom jedinkom i onu sa predmetom. Mjerilo se vrijeme (s) provedeno u istraživanju predmeta i vrijeme (s) provedeno u istraživanju drugog štakora.

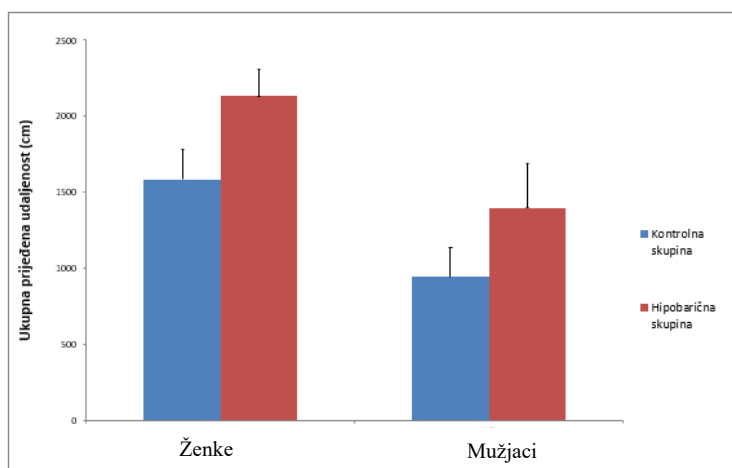
### **3.3. Statistička obrada podataka**

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 dvosmjerna 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 Tukeyev test (eng. *Tukey's honest significance test – HST*). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost (M) ± standardna pogreška (SEM). Značajnost rezultata je prihvaćena kod  $p < 0,05$ .

## 4. Rezultati

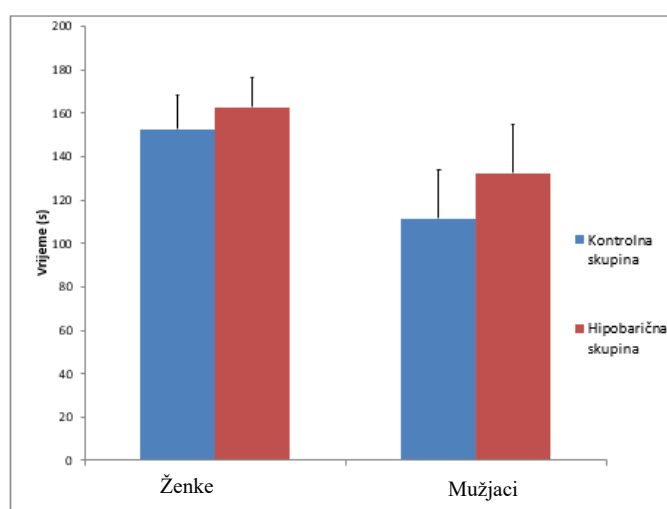
### 4.1. Rezultati testa u otvorenom polju

U testu u otvorenom polju mjerili smo ukupnu udaljenost puta koji je štakor prešao, vrijeme koje je proveo u kretanju, srednju brzinu kojom se kretao u polju te broj propinjanja.



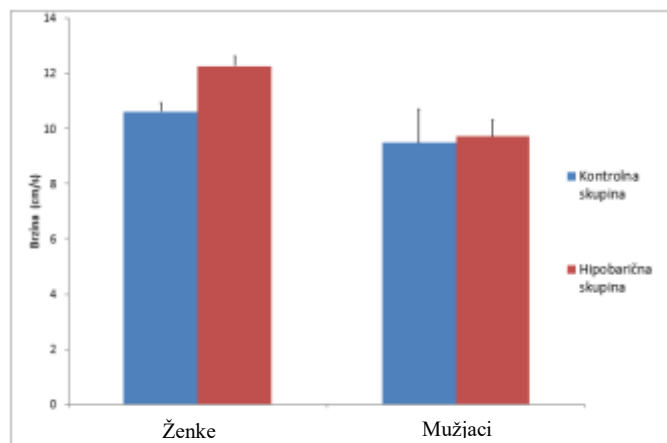
**Slika 4.1.** Ukupna prijeđena udaljenost ( $M \pm SEM$ ) u testu otvorenog polja kontrolne ( $N=10$  ženki i 8 mužjaka) i hipobarične ( $N=12$  mužjaka i 10 ženki) skupine mladunaca štakora.

Uočen je statistički značajan utjecaj spola ( $p=0,005$ ) i tretmana ( $p=0,036$ ) na ukupnu prijeđenu udaljenost. Pri tome su ženke prošle veću udaljenost u odnosu na mužjake ( $1859 \pm 163$  cm naspram  $1171 \pm 162$  cm) te je hipobarična skupina prošla veću ukupnu udaljenost u odnosu na kontrolnu skupinu ( $1767 \pm 157$  cm naspram  $1264 \pm 168$  cm), (Slika 4.1).



**Slika 4.2.** Vrijeme provedeno u kretanju ( $M \pm SEM$ ) u testu otvorenog polja kontrolne ( $N=10$  ženki i 8 mužjaka) i hipobarične ( $N=12$  mužjaka i 10 ženki) skupine mladunaca štakora.

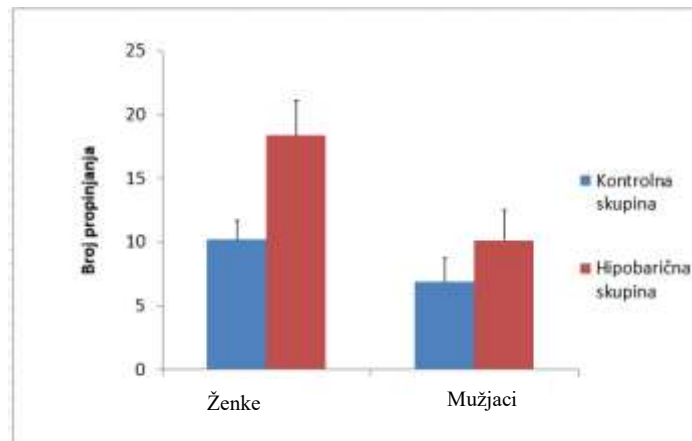
Unatoč značajnoj razlici u prijeđenom putu, vrijeme provedeno u kretanju nije se značajno razlikovalo niti između spolova ( $158 \pm 14$  s naspram  $122 \pm 14$  s,  $p=0,076$ ), niti između skupina ( $132 \pm 14$  s naspram  $148 \pm 13$  s,  $p=0,436$ ), (Slika 4.2).



**Slika 4.3.** Brzina kretanja ( $M \pm SEM$ ) u testu otvorenog polja mladunaca štakora kontrolne ( $N=10$  ženki i 8 mužjaka) i hipobarične ( $N=12$  mužjaka i 10 ženki) skupine.

Značajna razlika u prijeđenom putu uz slično vrijeme provedeno u kretanju ukazivala je na razliku u brzini kretanja. Doista, i ovdje je uočen značajan utjecaj spola ( $p=0,01$ ) i skupine ( $p=0,02$ ), pri čemu je brzina kretanja ženki ( $14 \pm 2$  cm/s) bila je veća u odnosu na mužjake ( $9 \pm 2$  cm/s), a brzina kretanja hipobaričnih mladunaca ( $14 \pm 2$  cm/s) veća u odnosu na kontrolnu skupinu ( $9 \pm 2$  cm/s), (Slika 4.3).





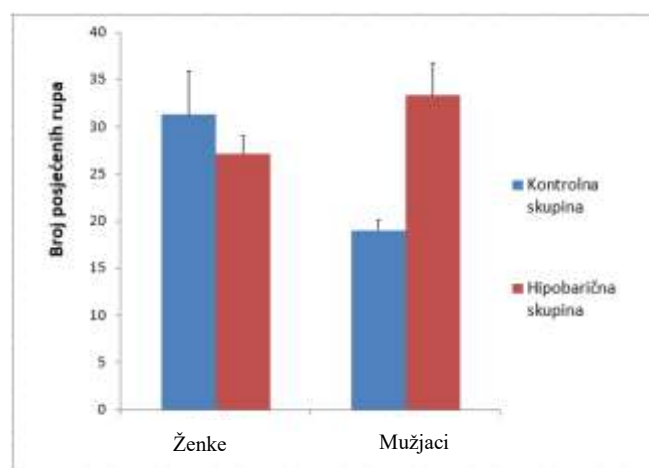
**Slika 4.4.** Broj propinjanja ( $M \pm SEM$ ) u testu otvorenog polja kontrolne ( $N=10$  ženki i 8 mužjaka) i hipobarične ( $N=12$  mužjaka i 10 ženki) skupine mladunaca štakora.

Analogna značajna razlika primijećena je i u vertikalnom gibanju (Slika 4.4)– ženke su se propinjale češće od mužjaka ( $11 \pm 0,3$  naspram  $9 \pm 0,3$ ,  $p < 0,001$ ), a hipobarični mladunci više od kontrolnih ( $11 \pm 0,3$  naspram  $10 \pm 0,4$ ,  $p = 0,006$ ).

Utjecaj interakcije spol x tretman nije bio značajan niti za jedan od mjerenih parametara.

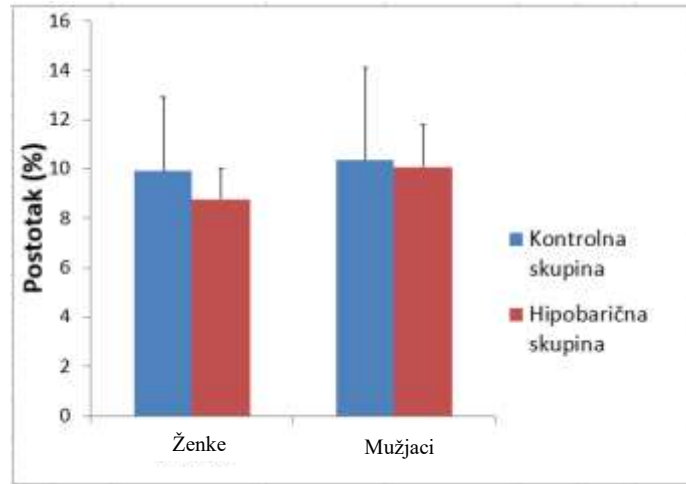
#### 4.2. Rezultati testa na ploči s rupama

U testu na ploči s rupama mjerili smo ukupan broj posjećenih rupa, što ukazuje na eksploratorno ponašanje te postotak posjećenosti unutarnjih rupa koji pokazuje stupanj anksioznosti mladunaca štakora.



**Slika 4.5.** Broj posjećenih rupa ( $M \pm SEM$ ) u testu ploče s rupama kontrolne ( $N=10$  ženki i 8 mužjaka) i hipobarične ( $N=12$  mužjaka i 10 ženki) skupine mladunaca štakora.

Na ukupan broj posjećenih rupa značajan utjecaj nisu imali ni spol ( $29 \pm 2$  ženke,  $26 \pm 2$  mušjaci,  $p=0,386$ ) ni tretman ( $30 \pm 2$  hipobarični,  $25 \pm 2$  kontrolni,  $p=0,127$ ), no uočen je značajan utjecaj interakcije spol x tretman ( $p=0,005$ ). *Post-hoc* test je pokazao povećanu eksploratornu aktivnost kod mušjaka, ali ne i ženki tretirane skupine u odnosu na kontrolnu (Slika 4.5).

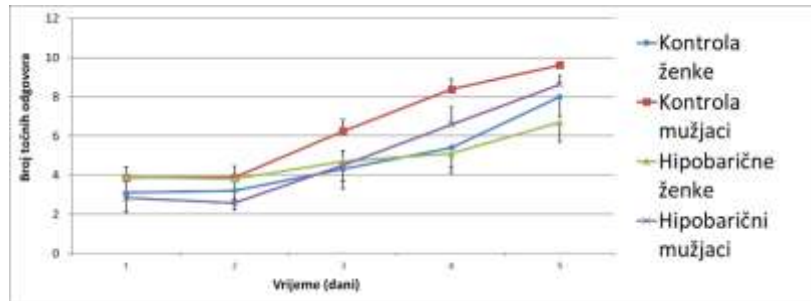


**Slika 4.6.** Postotak posjećenosti unutarnjih rupa ( $M \pm SEM$ ) u testu ploče s rupama kontrolne ( $N=10$  ženki i 8 mušjaka) i hipobarične ( $N=12$  mušjaka i 10 ženki) skupine mladunaca štakora

Spol ( $9 \pm 2$  % ženke  $9 \pm 2$ % mušjaci,  $p=0,99$ ) i skupina ( $9 \pm 2$ % hipobarični,  $9 \pm 2$ % kontrolni,  $p=0,95$ ) kao ni njihova interakcija ( $p=0,58$ ) nisu značajno utjecali na postotak posjećenosti unutarnjih rupa (Slika 4.6).

### 4.3. Rezultati testa u T-labirintu

U testu u T-labirintu smo mjerili broj točnih odabira ispravnog kraka u kojem je kao nagrada postavljena hrana (Slika 4.7.). Ovaj test pokazuje sposobnost prostornog učenja.

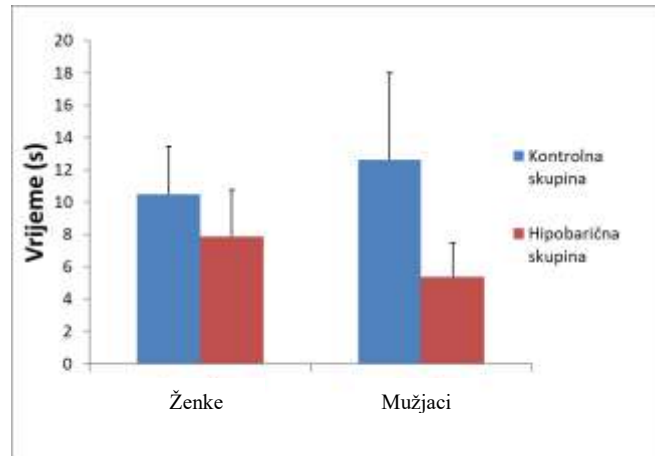


**Slika 4.7.** Dinamika učenja u T-labirintu ( $M \pm SEM$ ) kontrolne ( $N=10$  ženki i 8 mužjaka) i hipobarične ( $N=12$  mužjaka i 10 ženki) skupine mladunaca štakora.

U sve četiri testirane skupine uočen je porast broja točnih odgovora tijekom perioda testiranja. Utjecaj vremena (tj. dana testiranja) na broj točnih odgovora bio je značajan ( $p < 0,001$ ), pri čemu se broj točnih odabira značajno povećavao od 2. do 5. dana (Slika 4.7). Iako utjecaj spola ( $p=0,13$ ) i tretmana ( $p=0,11$ ) na prosječan broj točnih odabira nije bio značajan, možemo uočiti da su mužjaci bili nešto uspješniji od ženki. To pokazuje i značajna interakcija između spola i dana ( $p=0,015$ ), koja je rezultat veće uspješnosti mužjaka, u odnosu na ženke, 4. i 5. dana testiranja. Također možemo uočiti da jedino tretirane ženke ni 5. dana testiranja nisu naučile u kojem se kraku nalazi hrana (imaju manje od 8 točnih odabira).

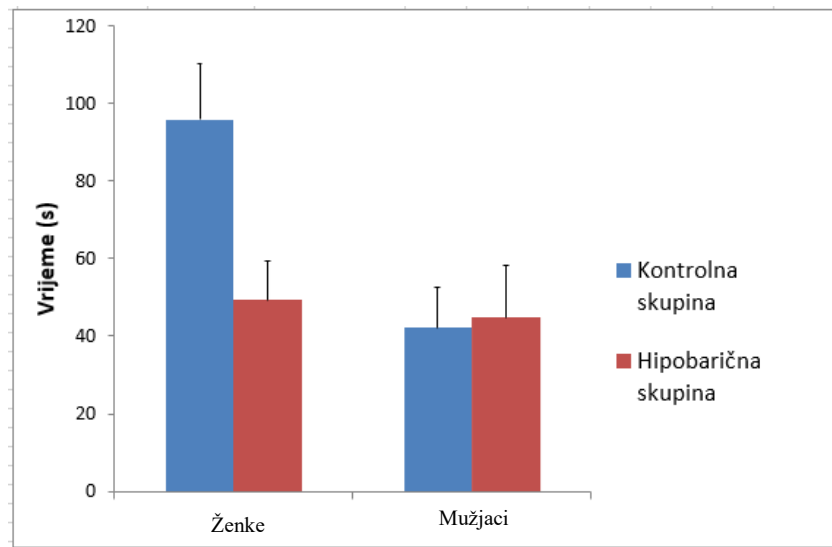
#### 4.4. Rezultati testa društvenog odabira

U testu društvenog odabira mjerili smo vrijeme koje je mladunac štakora proveo istražujući objekt u odnosu na vrijeme koje je proveo istražujući predmet, što je pokazatelj socijalnosti jedinke.



**Slika 4.8.** Vrijeme ( $M \pm SEM$ ) provedeno u istraživanju objekta kontrolne ( $N=10$  ženki i 8 mužjaka) i hipobarične ( $N=12$  mužjaka i 10 ženki) skupine mladunaca štakora.

Iako se na Slici 4.8. može uočiti da je kontrolna skupina mladunaca provela nešto više vremena ( $12 \pm 2$  s) u istraživanju objekta od tretirane skupine ( $7 \pm 2$  s), utjecaj tretmana nije bio značajan ( $p=0,16$ ). Također nije uočen značajan utjecaj spola ( $p=0,96$ ) ni interakcije spol x tretman ( $p=0,5$ ).



**Slika 4.9.** Vrijeme ( $M \pm SEM$ ) provedeno u istraživanju drugog štakora kontrolne ( $N=10$  ženki i 8 mužjaka) i hipobarične ( $N=12$  mužjaka i 10 ženki) skupine mladunaca štakora.

Mladunci iz svih skupina proveli su puno više vremena u istraživanju štakora, nego u istraživanju predmeta. Pri tome su ženke provele značajno više vremena u istraživanju od mužjaka ( $73 \pm 10$  s naspram  $44 \pm 9$  s,  $p=0,04$ ), dok utjecaj tretmana nije bio značajan ( $69 \pm 9$  s kontrolni,  $47 \pm 10$  s hipobarični,  $p=0,11$ ), kao ni utjecaj njihove interakcije ( $p=0,07$ ).

## 5. Rasprava

Prenatalna hipoksija fetusa vrlo je bitan čimbenik pojavnosti raznih bihevorlnih, kognitivnih i motoričkih disfunkcija te je zbog toga potrebno eksperimentalno utvrditi mehanizme i posljedice njenog nastanka. Iako ne postoji idealan animalni model koji bi potpuno mogao ponoviti kompleksnost ovakvog stanja u novorođenčadi, korištenje nekoliko HI modela pomaže u razumijevanju patologije mozga izazvane hipoksijom (Mallard i Vexler, 2015). Animalni model neonatalne hipoksije koji se u mnogo slučajeva pokazao najreprezentativnijim što se tiče posljedica, incidencije hipoksije i dugotrajnih neuropatoloških i bihevorlnih studija je štakor. Također, prednost korištenja štakora kao animalnog modela je mala veličina, kratak reproduktivni ciklus i niski troškovi uzgajanja (Zhang i sur., 2013).

Neonatalna hipoksija kod štakora podrazumijeva izazivanje hipoksične ozljede u postnatalnim danima, koji odgovaraju pojavnosti hipoksije u zadnjem tromjesečju trudnoće kod ljudskih fetusa. Zadnje tromjesečje trudnoće najosjetljivije je razdoblje ljudskog razvoja s najvećim posljedicama hipoksične ozljede. Pri tome, mozak štakora PND1 do PND5 odgovara 23. – 32. gestacijskom tjednu kod ljudi te je prikladan za proučavanja ozljeda djece rođene prije termina (Yager, 2004; Mallard i Vexler, 2015). Back i sur. (2001) su opisali podrijetlo oligodendroglijalnih stanica te su ih usporedili s podrijetlom tih stanica kod ljudi, da bi se moglo identificirati pravo vrijeme korištenja tog modela za PVL, najčešćeg tipa ozljede HI encefalopatije. Najranjivije vrijeme za ozljede bijele tvari je ono koje prethodi mijenizaciji te korelira s vremenom u kojem su progenitorski oligodendrociti glavne mete. Kod ljudi to se podudara s 24. do 32. gestacijskim tjednom, a kod štakora sa PND2 do PND5. To je također jedan od razloga zašto se za prenatalne HI ozljede fetusa koriste neonatalni modeli štakora.

Hipoksična ozljeda se u mozgu štakora može izazvati metodama kombinirane hipoksije (invazivne metode) i metodama čiste hipoksije (neinvazivne metode). Invazivne metode baziraju se na Rice-Venuccijevoj metodi iz 1991. godine. Ova metoda je bila prvi model neonatalne HI ozljede, a njena prednost je što kontralateralna hemisfera može služiti kao unutarnja kontrola. Također uočene su iste anatomske ozljede mozga kao i kod ljudi (Rice i sur., 1991; Millar i sur., 2017). Iako je Rice-Vennuci model poznatiji od neinvazivnih modela, ima nekoliko nedostataka: 1. može uzrokovati djelomičnu ishemičnu ozljedu mozga tijekom operacije, 2. težina postupka i trauma operacije te anestezije može utjecati na rezultate i 3. nije istovjetna s pojavnošću hipoksije u ljudi (Zhang i sur., 2013). Naime dokazano je da je HI u

lijevoj strani uzrokovala veću štetu nego desna HI u ipsilateralnom stijatumu i kod ženki i kod mužjaka, što nije slučaj pri pojavnosti HI kod fetusa (Arteni i sur., 2010). Također, 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, višestrukim infarktima koji uključuju i bijelu i sivu tvar, što čini manje od 5% slučajeva PVL-a (Rumajogee i sur., 2016).

Metoda koju smo mi koristili je neinvazivna metoda čiste HI, bez upotrebe kirurških zahvata. Ovakve neinvazivne metode se sastoje od izlaganja životinje hipoksičnim uvjetima u nekom vremenskom periodu. Prijašnja istraživanja su pokazala da je nedostatak kisika bez ligacije karotidne arterije dovoljan za stimulaciju HI uvjeta kod neonatalnih štakora (Zhang i sur., 2013). Unatoč tome što su neinvazivne metode sličnije pojavnosti hipoksije kod ljudi, postoje razne nesuglasice oko optimalne starosti životinja, soja, parcijalnog tlaka kisika, vremena izlaganju hipoksiji ili temperature okoline tijekom izlaganja (Millar i sur., 2017). Neuronima mozga nakon okota prolaze određene promjene da bi se adaptirali na izvanmateričnu oksigenaciju pa neki smatraju da izlaganje tek okoćenih štakora hipoksiji nije istovjetno pojavnosti HI kod ljudi (Nalivaeva i sur., 2018).

Mi smo koristili neinvazivni model hipoksije pri čemu smo izložili neonatalne mladunce hipobaričnoj komori prvog postnatalnog dana. Hipobarična komora predstavlja hipoksiju kojoj je fetus izložen pri visokim nadmorskim visinama. Prijašnja istraživanja su se uglavnom bavila utjecajem visokih nadmorskih visina na fetus janjeta kao animalnog modela pri čemu su ispitivali fiziološke i epigenetičke učinke hipoksije (Yang i sur., 2012). Druga istraživanja nisu koristila neonatalne modele, već odrasle štakore da bi pokazala učinak hipoksije na depresiju (Kanekar i sur., 2015). Istraživanja na ljudima pokazala su da dugotrajna izloženost hipobaričnoj hipoksiji ometa kognitivne funkcije kod ljudi kroz disfunkciju kolinergičnog sustava te povećanje razine glutamata i kortikosterona (Muthuraju i Pati, 2014). Druga istraživanja na animalnim modelima su pokazala smanjenu sposobnost pamćenja u slučaju kontinuirane hipobarične hipoksije od prvog do 19. postnatalnog dana. Takvi rezultati koreliraju sa perinatalnim HI ozljedama kod djece koja u školi pokazuju smanjenu sposobnost učenja (Šimonová i sur., 2003). Međutim sva ova istraživanja bazirana su na kroničnoj izloženosti hipoksiji, a naš model uključuje akutnu izloženost hipobaričnoj hipoksiji.

Prijašnja istraživanja utjecaja same hipoksije pokazala su da ona može dovesti do dugotrajnih motoričkih, bihevioralnih i kognitivnih posljedica (Sukhanova i sur., 2018). Zbog

toga smo pomoću bihevioralnih testova htjeli utvrditi izaziva li neonatalna izloženost hipobaričnoj hipoksiji promjene u lokomociji, anksioznom, eksploratornom i socijalnom ponašanju te kogniciji u mladih štakora.

Testom u otvorenom polju ispitivali smo lokomotornu aktivnost mladunaca. Došli smo do zaključka da su hipobarični mladunci aktivniji od kontrolnih te da su ženke općenito, bez obzira na utjecaj hipoksije, aktivnije od mužjaka i to u vertikalnom i horizontalnom kretanju. U prijašnjim istraživanjima akutna hipobarična hipoksija kod neonatalnih štakora dovela je do smanjenja koncentracije moždanih katekolamina (dopamina i noradrenalina) što se povezuje s pojavnošću raznih motoričkih poremećaja uključujući epilepsiju i cerebralnu paralizu (Hermans i Longo, 1994). Ispitivanjima u otvorenom polju uočena je hiperaktivnost u štakora koja odgovara pojavnosti poremećaja pažnje kod djece (ADHD) izložene prenatalnoj hipoksiji. Djeca s ADHD-om pokazuju hiperaktivnost i impulzivno ponašanje. (Nyakas i sur., 1996; Maslova i sur., 2003; Fendt i sur., 2008; Strickland, 2014).

Istraživanje populacije djece u dobi od 5 do 11 godina s dijagnosticiranim ADHD-om dovelo je do zaključka da prenatalna izloženost hipoksično-ishemičnim uvjetima dovodi do većeg rizika pojavnosti ADHD-a. Uzrok ADHD-a ostaje nepoznat iako postoji snažan dokaz genskog utjecaja koji je potpomognut okolišnim faktorima što rezultira povećanjem rizika nastanka ADHD-a. Genski faktor ADHD-a je jači od okolišnih faktora budući da je istraživanjem na jednojajčanim blizancima otkrivena veća vjerojatnost razvitka ADHD-a u odnosu na dvojajčane blizance (Getahun i sur., 2013). Epidemiološka istraživanja predlažu da perinatalni hipoksični i asfiksični događaj igra ulogu u patogenezi nekih slučajeva ADHD-a (Toft, 1999).

Testom na ploči s rupama utvrđivali smo anksioznost te eksploratorno ponašanje mladunaca. U istraživanjima ovakvih ponašanja može se koristiti i test otvorenog polja, no on ne razlikuje lokomociju od eksploratornog ponašanja, dok su aktivnosti koje životinje provode u testu s rupama istraživanje (uron glave) i lokomocija (horizontalno gibanje) (Brown i Nemes, 2008). Mi smo istraživali uron glave u rupe te uspoređivali postotak posjećenosti vanjskih i unutarnjih rupa, koje nam je služe kao mjera anksioznosti zbog sklonosti glodavaca ka tigmotaksiji (izbjegavanju otvorenih prostora). Unutarnje rupe (u sredini polja) štakorima predstavljaju određenu nesigurnost jer se nalaze nezaštićeni u otvorenom polju. Vanjske rupe (one uz stranice) predstavljaju određenu stopu sigurnosti pri istraživanju (Nyakas i sur., 1996; Brown i Nemes, 2008). Rezultati našeg istraživanja pokazali su da mladi mužjaci, ali ne i ženke, pod utjecajem hipobarične hipoksije imaju veću sklonost istraživanju nepoznatog prostora.



Dakle možemo reći da postoji razlika između spolova u utjecaju hipoksije na eksploratorno ponašanje. Rezultat ovog testa potvrđuje prijašnje tvrdnje da se lokomocija i tendencija istraživanju trebaju promatrati odvojeno. Naime iako su u testu otvorenog polja ženke pokazale veću pokretljivost, u testu ploče s rupama mužjaci su pokazali jače eksploratorno ponašanje. Prijašnja istraživanja rađena na štakorima soja Sprague-Dawley koji su bili izloženi hipobaričnoj hipoksiji uočila su poveznicu između hipoksije i straha. Naime mužjaci štakora pokazivali su smanjeni strah nakon izloženosti hipobaričnoj hipoksiji na što su znanstvenici zaključili da je došlo do promjena u limbičkom sustavu (Kumari i sur., 2018). Rezultati ovog istraživanja mogli bi se povezati s našim rezultatima eksploratornog ponašanja. Moguće je da i naši mužjaci uslijed hipobarične hipoksije imaju smanjeni strah te su bili skloniji istraživanju nepoznatog prostora nego kontrolni mužjaci.

Budući da je uočena značajna razlika utjecaja hipobarične hipoksije s obzirom na spol, u daljnjim istraživanjima potrebno je istražiti kako spolni hormoni utječu na posljedice hipoksije.

Socijalnost mladunaca štakora izloženih prenatalnoj hipobaričnoj hipoksiji ispitivali smo testom društvenog odabira. Ovaj test ispituje preferencije štakora pri istraživanju živog štakora naspram neživog objekta. Test socijalnog izbora najčešće se koristi za mjerenje socijalnog aspekta anksioznosti (Crawley i sur., 2007). Ispitivani štakor nije imao prijašnji doticaj sa životinjom kao ni sa objektom postavljenim u odjeljak. Kod štakora koji su prije testa doživjeli stres, primjećuje se tendencija izbjegavanja odjeljka u kojem je nepoznati štakor (Nicolas i Prinssen, 2006). Rezultati našeg istraživanja pokazali su da ne postoji razlika u socijalnosti između hipobaričnih i kontrolnih mladunaca. Jedina razlika je bila u spolu, nevezano uz tretman. Pokazalo se da su ženke općenito socijalnije od mužjaka. Dosad u literaturi nema poznatih istraživanja o utjecaju hipobarične hipoksije na socijalnost mladunaca štakora pa ne možemo usporediti naše rezultate.

Sposobnost prostorne memorije ispitivali smo testom u T-labirintu. Rezultati našeg istraživanja nisu pokazali značajniju razliku u učenju između hipobarične i kontrolne skupine već samo razliku u učenju po spolu. Mužjaci su pokazali bolje rezultate 5. dana ispitivanja u odnosu na ženke, međutim to nije bilo povezano s tretmanom. Prijašnja istraživanja pokazala su da hipobarična hipoksija dovodi do poremećaja pamćenja. Hipobarična hipoksija inducira apoptozu hipokampalnih stanica te oksidativni stres, a uz to dovodi do poremećaja kolineričnog te adrenergičnog sustava hipokampusa. Ti mehanizmi mogli bi biti povezani s poremećajima pamćenja i učenja kod ljudi izloženih hipobaričnoj hipoksiji (Qaid i sur., 2017). U našem istraživanju nismo pokazali da hipobarična hipoksija utječe na učenje u T-labirintu, za razliku

od istraživanja koja su za provjeru učenja koristila Morrisov vodeni labirint. U Morrisovom vodenom labirintu štakori su stavljani u kružni bazen s vodom te moraju pronaći vidljivu ili nevidljivu platformu. Platforma im omogućava izlazak iz vode. Postoje 3 taktike kojima štakori mogu pobjeći iz labirinta: praksa (zapamte pokrete koji su im bili potrebni da dođu do platforme), taksija (koriste vizualne znakove kako bi došli do destinacije) ili prostorna memorija (koristeći udaljene znakove kao referentne točke za lociranje) (Brandeis i sur., 1989). Dell'Anna i sur. (1991) su opazili hiperaktivnost i deficit u pamćenju kod štakora starosti PND20 do PND45 koji su bili izloženi kratkotrajnoj anoksiji nakon rođenja. Šimonová i sur. (2003) su dokazali deficit prostorne memorije u Morrisovom vodenom labirintu kao rezultat kronične hipobarične hipoksije (od rođenja do PND19). Ukazali su na prednosti vodenog labirinta u odnosu na suhi labirint te smatraju da je vodenim labirintom riješen problem mirisa koji postoji kod suhog labirinta. Međutim, mana ovog testa je oslanjanje isključivo na vizualnu orijentaciju, a albino štakori koji se koriste u istraživanjima, imaju nekoliko vizualnih deficita.

## 6. Zaključak

1. U testu u otvorenom polju hipobarična skupina mladunaca prešla je značajno veću udaljenost, kretala se brže te se češće uspinjala na stražnje noge od kontrolne skupine.
2. U testu na ploči s rupama mužjaci mladunaca iz hipoksične skupine istražili su veći broj rupa od mužjaka kontrolne skupine
3. Nije uočena značajna razlika između skupina u broju točnih odabira u T-labirintu te u vremenu provedenom u istraživanju objekta i žive jedinke u testu društvenog odabira.
4. Povećana lokomotorna i eksploratorna aktivnost ukazuje na moguću hiperaktivnost kao posljedicu neonatalne izloženosti hipobaričnoj hipoksiji.
5. Uočene su značajne razlike između spolova u lokomociji, eksploratornom ponašanju i socijabilnosti.
6. U daljnjim istraživanjima trebalo bi utvrditi zadržavaju li štakori uočene promjene, s obzirom na tretman i spol i u odrasloj dobi.

## 7. Literatura

- Back, S. A., Luo, N. L., Borenstein, N. S., Levine, J. M., Volpe, J. J., Kinney, H. C. (2001): Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury. *Journal of Neuroscience* **21**: pp 1302–1312.
- Balduini, W., Carloni, S., Buonocore, G. (2009): Autophagy in hypoxia-ischemia induced brain injury: Evidence and speculations. *Autophagy* **5**: pp. 221–223.
- Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989): The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. *International Journal of Neuroscience. Informa Healthcare* **48**: pp. 29–69.
- 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**: pp. 442–448.
- Definition of term pregnancy. Committee Opinion No. 579. (2013): American College of Obstetricians and Gynecologists. *Obstet Gynecol* **122**: pp.1139–40.
- Crawley J., Chen T., Puri A., Washburn R., Sullivan T., Hill J., Young N., Nadler J., Moy S., Young L., Caldwell H, Young W (2007): Social approach behaviors in oxytocin knockout mice: Comparison of two independent lines tested in different laboratory environments. *Neuropeptides* **41**: pp. 145–163.
- 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**: pp. 125–134.
- Depré, C., Fiérain, L., Hue, L. (1997): Activation of nitric oxide synthase by ischaemia in the perfused heart. *Cardiovascular Research* **33**: pp. 82–87.
- Fendt, M., Lex, A., Falkai, P., Henn, F. A., Schmitt, A. (2008): Behavioural alterations in rats following neonatal hypoxia and effects of clozapine: Implications for schizophrenia. *Pharmacopsychiatry* **41**: pp. 138–145.
- Gieron-Korthals, M., Colón, J. (2005): Hypoxic-ischemic encephalopathy in infants: New challenges. *Fetal and Pediatric Pathology* **24**: pp. 105–120.
- Hadžimuratović, E. (2013): Hipoksično oštećenje bubrega u donešene novorođenčadi kao pokazatelj njihova neurološkog ishoda. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet, Zagreb
- Hall, J. E. (2015): Cerebral Blood Flow, Cerebrospinal Fluid, and Brain Metabolism. Pocket Companion to Guyton & Hall Textbook of Medical Physiology. Twelfth Edit. Philadelphia, Saunders Elsevier, pp. 468-474
- Hefter, D., Marti, H. H., Gass, P., Inta, D. (2018): Perinatal hypoxia and ischemia in animal models of schizophrenia. *Frontiers in Psychiatry* **9**: pp. 1–7.

- Hermans, R. H. M., Longo, L. D. (1994): Altered catecholaminergic behavioral and hormonal responses in rats following early postnatal hypoxia. *Physiology and Behavior* **55**: pp. 469–475.
- 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**: pp. 1–9.
- Kanekar, S., Bogdanova, O. V., Olson, P. R., Sung, Y. H., D’Anci, K. E., Renshaw, P. F.. (2015): Hypobaric hypoxia induces depression-like behavior in female Sprague-Dawley rats, but not in males. *High altitude medicine and biology*. Mary Ann Liebert, Inc. **16**: pp. 52–60.
- Kingdom, J. C. P., Kaufmann, P. (1997): Oxygen and placental villous development: Origins of fetal hypoxia. *Placenta* **18**: pp. 613–621.
- Kinney, H. C., Volpe, J. J. (2018a): Encephalopathy of Prematurity: Neuropathology. Volpe’s Neurology of the Newborn. Sixth Edit. Elsevier Inc., pp.389-404.
- Kinney, H. C., Volpe, J. J. (2018b): Hypoxic-Ischemic Injury in the Term Infant: Neuropathology. Volpe’s Neurology of the Newborn. Sixth Edit. Elsevier Inc., pp.500-509.
- Kumari, P., Kauser, H., Wadhwa, M., Roy, K., Alam, S., Sahu, S., Panjwani, U.. (2018): Hypobaric hypoxia impairs cued and contextual fear memory in rats. *Brain Research* **1692**: pp. 118–133.
- Mallard, C., Vexler, Z. S. (2015): Modeling ischemia in the immature brain: How translational are animal models?. *Stroke* **46**: pp. 3006–3011.
- Maslova, M. V., Maklakova, A. S., Sokolova, N. A., Ashmarin, I. P., Goncharenko, E. N., Krushinskaya, Y. V. (2003): The effects of ante- and postnatal hypoxia on the central nervous system and their cryopreservation and their correction with peptide hormones. *Neuroscience and Behavioral Physiology* **33**: pp. 607–611.
- Millar, L. J., Shi, L., Hoerder-Suabedissen, A., Molnár, Z. (2017): Neonatal hypoxia ischaemia: Mechanisms, models, and therapeutic challenges. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **11**: pp 78.
- Mukandala, G., Tynan, R., Lanigan, S., O’Connor, J. J. (2016): The effects of hypoxia and inflammation on synaptic signaling in the CNS. *Brain Sciences* **6**: pp. 6
- Muthuraju, S., Pati, S. (2014): Effect of Hypobaric Hypoxia on Cognitive Functions and Potential Therapeutic Agents. *Malays J Med Sc* **2**: pp. 41–45
- 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**: pp. 1–21.
- Nicolas, L. B., Prinssen, E. P. M. (2006): Social approach-avoidance behavior of a high-anxiety strain of rats: Effects of benzodiazepine receptor ligands. *Psychopharmacology* **184**: pp. 65–74.
- Nyakas, C., Buwalda, B., Luiten, P. G. M. (1996): Hypoxia and brain development. *Progress in Neurobiology* **49**: pp. 1–51.

- Qaid, E. Y. A., Zakaria, R., Sulaiman, S. F., Yusof, N. M., Shafin, N., Othman, Z., Aziz, C. A. (2017): Insight into potential mechanisms of hypobaric hypoxia-induced learning and memory deficit—Lessons from rat studies. *Human & experimental toxicology* **36**: pp. 1315-1325.
- Rice, J. E., Vannucci, R. C., Brierley, J. B. (1981): The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Annals of Neurology* **9**: pp. 131–141.
- 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**: pp. 57.
- Sanches, E. F., Arteni, N. S., Scherer, E. B., Kolling, J., Nicola, F., Willborn, S., Netto, C. A. (2013): Are the consequences of neonatal hypoxia–ischemia dependent on animals' sex and brain lateralization?. *Brain research* **1507**: pp. 105-114.
- Sarnat, H. B. i Sarnat, M. S. (1976): Neonatal Encephalopathy Following Fetal Distress: A Clinical and Electroencephalographic Study. *Archives of Neurology. American Medical Association* **33**: pp. 696–705.
- Sherwood, L., Klandorf, H., Yancey, P. (2012): *Animal physiology: from genes to organisms*. Second Edit. Cengage Learning, Belmont
- Singer, M. A. (2007): *Comparative physiology, natural animal models and clinical medicine: Insights into clinical medicine from animal adaptations, Comparative Physiology, Natural Animal Models and Clinical Medicine: Insights into Clinical Medicine from Animal Adaptations*. Imperial College Press. London
- Strickland, A. D. (2014): Prevention of cerebral palsy, autism spectrum disorder, and attention deficit - Hyperactivity disorder. *Medical Hypotheses* **82**: pp. 522–528.
- Sukhanova, I. A., Sebentsova, E. A., Khukhareva, D. D., Manchenko, D. M., Glazova, N. Y., Vishnyakova, P. A., 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**: pp. 87–98.
- Sun, M.-K. (1999): *Hypoxia, Ischemic Stroke, and Memory Deficits: Prospects for Therapy*. *IUBMB Life* **48**: pp. 373–378.
- Šimonová, Z., Štěrbová, K., Brožek, G., Komárek, V., Syková, E. (2003): Postnatal hypobaric hypoxia in rats impairs water maze learning and the morphology of neurones and macroglia in cortex and hippocampus. *Behavioural Brain Research* **141**: pp. 195–205.
- Šumanović-Glamuzina, D. (2007) *Proupalni citokini, vazodilatatacijski prostaglandini i dušični oksid (NO) u perinatalnoj hipoksiji*. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet, Mostar
- Toft, P. B. (1999): Prenatal and perinatal striatal injury: A hypothetical cause of attention-deficit-hyperactivity disorder?. *Pediatric Neurology* **21**: pp. 602–610.
- Yager, J. Y. (2004): *Animal Models of Hypoxic-Ischemic Brain Damage in the Newborn*. *Seminars in Pediatric Neurology* **11**: pp. 31–46.

Yang, Q., Lu, Z., Ramchandran, R., Longo, L. D., Usha Raj, J. (2012): Pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and migration in fetal lambs acclimatized to high-altitude long-term hypoxia: Role of histone acetylation. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **303**: pp. 1001–1011.

Yang, S. N., Lai, M. C. (2011): Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2011**: pp. 1-6.

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**: pp. 1–14.

<https://courses.lumenlearning.com/boundless-psychology/chapter/prenatal-development/>

(pristupljeno 16.12.2019.)

## 8. Životopis

### OSOBNI PODACI

Ime i Prezime: Monika Stipan

Datum i mjesto rođenja: 24.12.1995.

### ŠKOLOVANJE

2018. – 2020. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno – matematički fakultet, Biološki odsjek, Diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul: Fiziologija i Imunobiologija

26/02/2018–30/06/2018 Adam Mickiewicz University in Poznan, Faculty of Biology, Poznan (Poljska), jednosemestralna studentska razmjena

2014. – 2018. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, zvanje: Sveučilišna prvostupnica Biologije

2010. – 2014. Druga gimnazija Varaždin, Opća gimnazija

### RADNO ISKUSTVO

Studeni 2016. – Veljača 2017.

Laboratorijska stručna praksa u laboratoriju za histologiju i histokemiju

### ZNANJA I VJEŠTINE

Rad na računalu: osnovno znanje korištenja alata MS office

Strani jezici: Engleski – B2

### DODATNE INFORMACIJE

Sudjelovanje i organizacija radionice na manifestaciji Noć biologije

Pasivni sudionik Simpozija studenata Bioloških usmjerenja

Član studentske udruge za razmjenu studenata IAESTE