

# Posljedice izloženosti neonatalnoj hipoksiji na ponašanje odraslih štakora

---

Kološnjaj, Ivona

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:217:032607>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-01**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno – matematički fakultet  
Biološki odsjek

Ivona Kološnjaj

POSLEDICE IZLOŽENOSTI NEONATALNOJ HIPOKSIJI NA  
PONAŠANJE ODRASLIH 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, 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).

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/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.

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem svojoj mentorici *prof. dr. sc.* Dubravki Hranilović.

Hvala Vam na ukazanom povjerenju, predanoj pomoći, korisnim savjetima, neizmjernom strpljenju i razumijevanju tijekom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem asistentici *mag. biol. exp.* Barbari Nikolić na pomoći i uloženom trudu tijekom eksperimentalnog dijela.

Velika hvala roditeljima na pružanju bezuvjetne podrške i motivacije tijekom cijelog školovanja. Bez njihove potpore u teškim, ali i sretnim trenucima nijedan moj uspjeh, pa tako ni ovaj, ne bi bio moguć.

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

POSljedICE IZLOŽENOSTI NEONATALNOJ HIPOKSIJI NA  
PONAŠANJE ODRASLIH ŠTAKORA

Ivona Kološnjaj

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Za održavanje normalne funkcije mozga ključna je dostupnost optimalne količine kisika. Nedostatak te esencijalne molekule inducira hipoksiju. Fetalna hipoksija dovodi do smanjenja adaptivnog potencijala mozga i plastičnosti zbog poremećaja umrežavanja neurona, posebno u korteksu i hipokampusu. Oštećenje mozga može dovesti do ozbiljnih posljedica kao što su mentalna retardacija, cerebralna paraliza, poremećaji pamćenja i epilepsija. Štakori, najčešći animalni modeli hipoksije, omogućuju bolje razumijevanje manje laboratorijski pristupačnog ljudskog mozga. Stadij razvoja mozga neonatalnog štakora odgovara stadiju razvoja mozga fetusa čovjeka od 23. do 34. tjedna trudnoće. Cilj ovog diplomskog rada je utvrditi postoje li promjene u socijalnom, emocionalnom i eksploratornom ponašanju te lokomociji i kogniciji u odraslih štakora izloženih hipoksiji u hipobaričnim ili normobaričnim uvjetima prvog postnatalnog dana, u odnosu na odrasle štakore kontrolne skupine te u kojoj mjeri one odgovaraju promjenama uočnim u mladunaca. Razlike u lokomociji i eksploratornom ponašanju, koje su uočene u skupini hipoksičnih mladunaca, u odnosu na kontrolnu skupinu, nisu zadržane u odrasloj dobi. Moguće je da je jedina preostala značajna razlika u broju propinjanja vezana uz pamćenje i procesiranje prostora posredovano dopaminom. Rezultati upućuju na zaključak da se neke promjene u ponašanju, nastale kao posljedica izloženosti mozga u razvoju hipoksiji, kompenziraju tijekom odrastanja, dok druge ostaju trajno prisutne.

(39 stranica, 20 slika, 1 tablica, 60 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: normobarična komora, hipobarična komora, neinvazivni model, prostorno učenje, propinjanje

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

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

Romana Gračan, doc.

Rad prihvaćen: 19.02.2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

### CONSEQUENCES OF NEONATAL HYPOXIA ON BEHAVIOUR OF ADULT RATS

Ivona Kološnjaj

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Optimal amount of oxygen is crucial for maintaining normal brain function. The lack of this essential molecule promotes hypoxia. Fetal hypoxia leads to a decrease in adaptive potential of the brain and plasticity due to a disturbance in neuronal networking, especially in the cortex and hippocampus. Brain damage can lead to serious consequences such as mental retardation, cerebral palsy, memory disturbances and epilepsy. Rats, the most common animal models of hypoxia, provide a better understanding of the less laboratory-accessible human brain. The stage of brain development of neonatal rats corresponds to the stage of development of a human fetal brain from 23rd to 34th week of pregnancy. The aim of this graduation thesis is to determine whether there are changes in social, emotional and exploratory behaviour, as well as locomotion and cognition in adult rats exposed to hypobaric or normobaric conditions on the first postnatal day compared to adult rats in control group and to what extent they correspond to changes observed in young rats. The differences in locomotion and exploratory behaviour observed in the group of young hypoxic rats in relation to the control group were not retained in adulthood. The only significant difference remaining in adulthood was the increased number of rearings in the experimental groups, which may be related to memory and spatial processing mediated by dopamine. The results suggest that some behavioural changes, caused by the exposure of developing brain to hypoxia, compensate themselves during development, while others remain permanently present.

(39 pages, 20 figures, 1 table, 60 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: normobaric chamber, hypobaric chamber, non- invasive model, spatial learning, rearing

Supervisor: Dr. Dubravka Hranilović, Prof.

Reviewers: Dr. Dubravka Hranilović, Prof., Dr. Sunčica Bosak, Asst. Prof., Dr. Romana Gračan, Asst. Prof.

Thesis accepted: 19.02.2020.

# Sadržaj

1. Uvod .....	1
1.1. Hipoksija.....	1
1.1.1. Uzročno-posljedične veze.....	2
1.1.2. Hipoksija i mozak u razvoju .....	4
1.1.3. Periventrikularna leukomalacija .....	7
1.1.4. Ulegirija.....	8
1.1.5. Epilepsija i poremećaj pažnje s hiperaktivnošću .....	9
1.2. Animalni modeli hipoksije.....	10
1.2.1. Invazivni animalni modeli hipoksije.....	12
1.2.2. Neinvazivni animalni modeli hipoksije .....	14
2. Cilj istraživanja .....	15
3. Materijali i metode .....	16
3.1. Materijali.....	16
3.1.5. Životinje.....	16
3.1.6. Aparatura .....	16
3.2. Metode .....	18
3.2.5. Test u otvorenom polju.....	18
3.2.6. Test na ploči s rupama.....	19
3.2.7. Test u T-labirintu.....	19
3.2.8. Test društvenog odabira.....	19
3.3. Statistička obrada podataka .....	19
4. Rezultati.....	20
4.1. Test u otvorenom polju.....	20
4.2. Test na ploči s rupama.....	24
4.3. Test u T labirintu.....	25
4.4. Test društvenog odabira .....	26
5. Rasprava .....	28
6. Zaključak .....	34
7. Literatura.....	35
8. Životopis .....	39

## **POPIS KRATICA**

ACH – acetilkolin

ATP – adenzin trifosfat (*eng. Adenosine Triphosphate*)

DG – dentatni girus

HI – hipoksija-ishemija

HIE – hipoksično-ishemična encefalopatija

NMDA – N-metil-D-asparaginska kiselina

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

SUB – subikulum (*lat. Subiculum*)

SŽS – središnji živčani sustav

PVL – paraventrikularna leukomalacija



# 1. Uvod

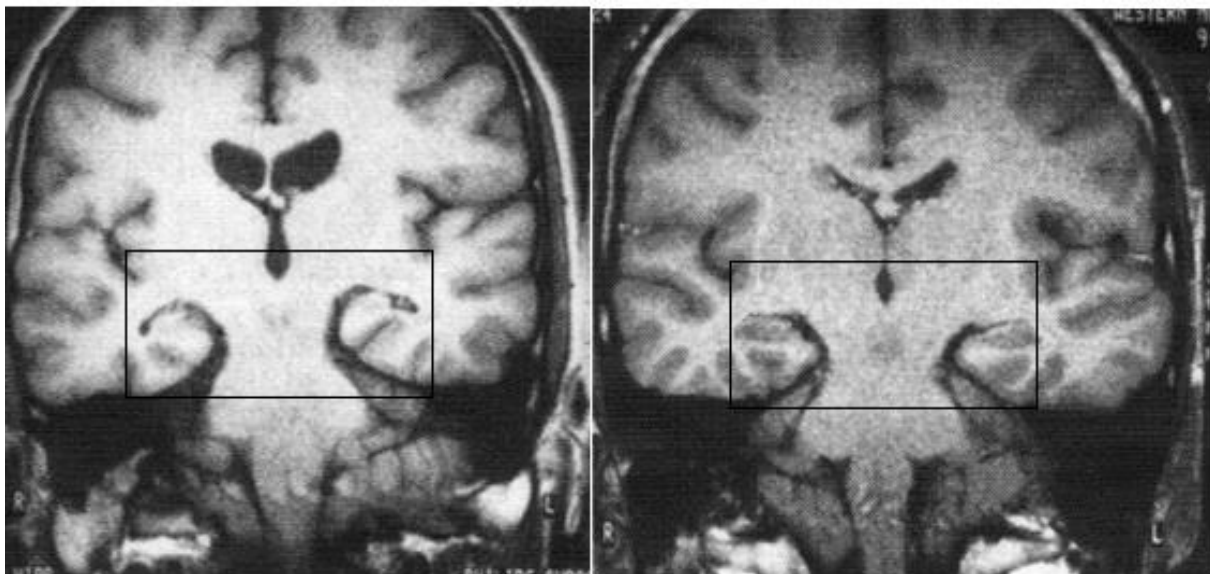
## 1.1. Hipoksija

Normalna funkcija mozga u potpunosti je ovisna o odgovarajućoj opskrbi kisikom za sintezu adenozin trifosfata (ATP - eng. *adenosine triphosphate*) putem oksidativne fosforilacije. Iako je mozak metabolički vrlo aktivan organ njegove rezerve kisika su vrlo male. Naime, prisutnost kisika u većoj količini od potrebe metabolizma može biti toksična, posebno za organ kao što je mozak. Iz tog razloga postoje mehanizmi koji kontroliraju isporuku kisika u mozak s obzirom na lokalnu potrošnju tako da je potražnja energije zadovoljena, a izloženost mozga mogućem toksičnom djelovanju kisika niska. Mozak karakterizira visok stupanj specijalizacije i heterogenosti. Potreba za kisikom i supstratima usko je povezana s potrebama mozga. Polovica kisika dopremljenog u mozak utrošena je na sinaptičku aktivnost dok se preostali dio koristi za održavanje transmembranskog gradijenta iona, sintezu neurotransmitera i ostale funkcije na nivou stanice. Kisik je od iznimne važnosti za održavanje normalne funkcije mozga te njegov nedostatak inducira hipoksiju. Hipoksija je stanje smanjene količine kisika u stanicama i tkivima, što ima za posljedicu poremećaj u funkcioniranju organa, sustava i stanica. Postoji nekoliko vrsta hipoksije, s obzirom na podrijetlo. Normobarična hipoksija se javlja pri smanjenoj količini kisika i normalnom tlaku. Hipobarična hipoksija popraćena je sniženim tlakom zraka i smanjenom količinom kisika, uvjetima koje možemo naći na visokim nadmorskim visinama. Hipoksija se može razviti u bilo kojem dijelu organizma, ali su njeni učinci na stanicama središnjeg živčanog sustava (SŽS) najizraženiji. Akutna epizoda hipoksije može uzrokovati inhibiciju sinaptičke aktivnosti u mnogim regijama mozga, dok dugotrajna hipoksija dovodi do smrti neurona. Izloženost hipoksičnim uvjetima zahtijeva neki oblik kompenzacijskog odgovora organizma, stoga dolazi do povećane ventilacijske stope, dok u mozgu potreba za većom količinom kisika dovodi do povećanog protoka krvi. Ozljeda može nastati kao posljedica smanjene krvne opskrbe mozga zbog suženja ili opstrukcije krvnih žila, tzv. hipoksije-ishemije (HI). S obzirom na to da mozak nema prostor za pohranu kisika (npr. mioglobin) to ga čini vrlo osjetljivim na male poremećaje u opskrbi krvlju (Erecinska i Silver, 2001). Prilikom HI, zaliha kisika nestaje u nekoliko sekundi, dok zaliha glukoze i ATP-a traje do 5 minuta. Nakon gubitka zaliha dokazi do sekundarne ozljede mozga, a potpuni neurološki oporavak postaje manje vjerojatan (Greer, 2006).

### 1.1.1. Uzročno-posljedične veze

Širok raspon medicinskih stanja može biti uzrok hipoksije. Najčešće do nje dolazi zbog ograničenog pristupa kisiku (visoke nadmorske visine), nedovoljne cirkulacije krvi (hemoragija, tumor mozga, srčani zastoj), respiratorne disfunkcije (zastoj u dišnom putu, nefunkcionalnost pluća, problem u neuralnoj kontroli disanja) ili zbog izloženosti toksinima. U normalnim uvjetima ATP daje energiju za održavanje visoke koncentracije kalija unutar stanice, dok je koncentracija natrija, kalcija i klora niska. Takva preraspodjela iona omogućava nesmetanu komunikaciju između neurona. Ograničena opskrba mozga kisikom i glukozom uzrokuje kaskadu događaja u stanici. Dolazi do blokade oksidativne fosforilacije, drastičnog smanjenja sinteze ATP-a i kolapsa ionskog gradijenata. Nakon potrošenih zaliha glikogena, glavnog izvora energije čijim se cijepanjem oslobađa glukoza, stanica prelazi na anaerobni metabolizam. Anaerobni metabolizam je neučinkovit i brzo troši preostalu zalihu glukoze pri čemu nastaje mliječna kiselina čije taloženje uzrokuje acidozu (Bennet i Gunn, 2009). Homeostaza je narušena te dolazi do unutarstaničnog nakupljanja iona natrija i klora uz pasivan ulazak vode. Kao posljedica ulaska vode stanica bubri i puca što uzrokuje strukturne i funkcionalne promjene. Slijedi naknadna aktivacija proteaza i fosfolipaza te stvaranje slobodnih radikala. Nakupljanje slobodnih radikala ima ključnu ulogu u oštećenju neurona i gubitku pamćenja (Bo i sur., 2009). Slobodni radikali oštećuju sve stanične strukture te mogu prouzrokovati oksidativni stres. Oksidativni stres je stanje koje karakterizira neravnoteža između stvaranja slobodnih radikala i njihovog neutraliziranja antioksidansima. Jedan od glavnih mehanizama hipoksijom uzrokovanog oksidativnog stresa je ekscitotoksičnost aminokiselinom glutamatom. Glutamat je najzastupljenija ekscitacijska aminokiselina u mozgu i citotoksična je za neurone. Hipoksija uzrokuje depolarizaciju glutamatergičkih neurona iz hipokampusu, stimulira otpuštanje glutamata i otvaranje voltažnih kalcijevih kanala i ulazak kalcija u stanicu. Ioni kalcija aktiviraju enzim ovisan o kalciju, sintetazu dušik-monoksida (NOS - *eng. nitric oxide synthase*) koja posredno uzrokuje povećanu peroksidaciju i oštećenje lipidnih membrana. Visoka koncentracija unutarstaničnih kalcijevih iona utječe na nekoliko metaboličkih procesa, oštećuje mitohondrije, dodatno potiče stvaranje slobodnih radikala i uzrokuje daljnji pad ATP-a. Povećana koncentracija glutamata u sinapsi potiče prolongiranu stimulaciju receptora što s vremenom uzrokuje apoptozu. Tijekom razvoja mozga ekscitotoksičnost ima puno veći utjecaj na neurone nego u mozgu odrasle osobe. Neuronska aktivnosti prestaje i ukoliko ne dođe do brze reoksigenacije, stanice umiru (Erecinska i Silver, 2001). Hipoksija narušava funkcionalnu cjelovitost mnogih tjelesnih sustava, no prvenstveno

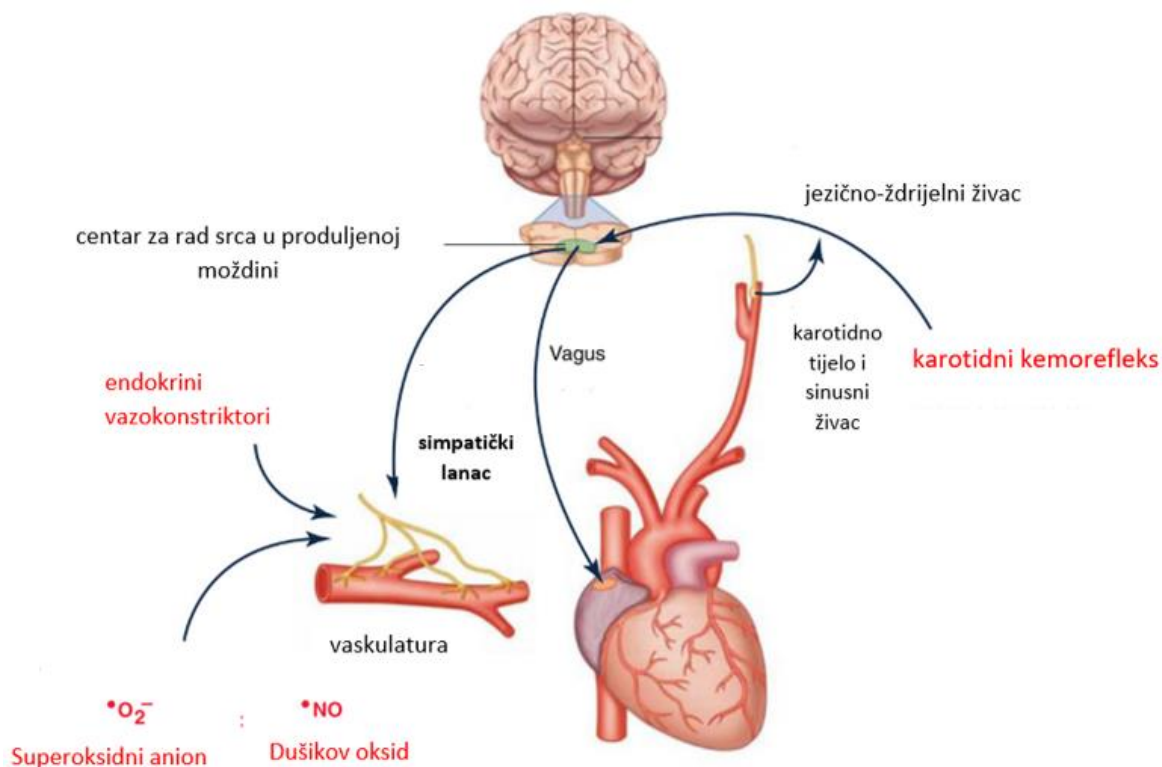
utječe na SŽS. Budući da je SŽS jedan od najvećih potrošača kisika, njegove funkcije su najranjivije na hipoksiju. Hipoksija izaziva oštećenje neurona i mitohondrija te inducira ekspresiju raznih gena. Patološke promjene povezane s manjkom kisika najčešće utječu na moždanu koru, bazalne ganglije, mali mozak i hipokampus. Mogući razlog ranjivosti tih dijelova mozga brza je metabolička aktivnost i veća potreba za kisikom i nutrijentima, ali i njihova lokacija u distalnim dijelovima gdje je tkivo najudaljenije od arterijske opskrbe (Busl i Greer, 2010). Također, smatra se da ti dijelovi mozga imaju više receptora za glutamat, stoga su osjetljiviji na nedostatak kisika (Banerjee i sur., 2006). Hipokampus, ključna struktura važna za učenje, pamćenje i reakciju na stres, je posebno osjetljiv na smanjenu koncentraciju kisika (Goldstein i sur., 1995). Ozljeda ili gubitak hipokampalnih CA1 piramidalnih stanica (Slika 1.1.) i smanjena sinteza acetilkolina (Ach) uzrokom su smanjene sposobnosti učenja i pamćenja. Kronična izloženost hipoksiji dovodi do gubitka funkcije, poremećaja svijesti, teškog oštećenja mozga, cerebralne paralize, mentalne retardacije, epilepsije i drugih neurofizioloških poremećaja. Posljedice hipoksije na mozak odrasle osobe mogu biti katastrofalne, dok povrede tijekom ranog razvoja mozga mogu utjecati na osnovnu strukturu određenih moždanih stanica, što dovodi do strukturno-funkcionalnih abnormalnosti u SŽS te može imati dugotrajne posljedice na moždanu funkciju (Dubrovskaya i Zhuravin, 2010).



Slika 1.1. Gubitak hipokampalnih stanica nakon tretmana hipoksijom (lijevo); kontrola (desno); regija hipokampusa označena je crnim pravokutnikom (Goldstein i sur., 1995)

### 1.1.2. Hipoksija i mozak u razvoju

Izvan maternice, opskrba kisikom iz atmosfere je neometana i kisik je dostupan u neizmjenjnim količinama. Ukoliko ipak dođe do epizode hipoksije u odrasloj dobi, aktiviraju se respiratorni i kardiovaskularni kompenzacijski mehanizmi. Oni su namijenjeni povećanju plućne oksigenacije i srčanog ritma, održavajući čak i perifernu cirkulaciju opskrbljenom oksigeniranom krvlju tijekom razdoblja sustavne hipoksije (Barwood i sur., 2017). U maternici, opskrba oksigeniranom krvlju je ograničena posteljicom. Međutim, niz prilagodbi jedinstvenih za fetalni život osiguravaju da opskrba kisikom prelazi njegove metaboličke zahtjeve. U odnosu na odraslu osobu, ove prilagodbe omogućuju fetusu vezanje veće količine kisika na hemoglobin i povećani bazalni protok krvi u većinu tkiva. Intrauterina hipoksija je povezana s različitim stanjima majke, placente i fetusa koji se mogu manifestirati različito i imaju različite ishode. Hipoksija nema važnu ulogu u ranom intrauterinom životu (prvo tromjesečje) zato što se rana embriogeneza odvija u anaerobnim uvjetima (Abbott i sur., 2014). Tijekom drugog i trećeg tromjesečja kisik postaje ključan za normalni fetalni rast i razvoj (Hutter i sur., 2010). Iako fetalnu hipoksiju može uzrokovati niz čimbenika, najčešće nastaje zbog napredovanja insuficijencije posteljice i udružena je sa zastojem u rastu fetusa. Tijekom trudnoće, hipoksija se može podijeliti na tri tipa: 1) preplacentalnu, u kojoj su manjkom kisika pogođeni i majka i dijete (npr. visoka nadmorska visina, cijanotična srčana greška, zatajenje srca); 2) postplacentalnu, u kojoj je samo fetus hipoksičan, što može biti posljedica smanjenog protoka krvi kroz arteriju uterinu ili različitih genskih anomalija; 3) uteroplacentalnu koja je povezana s abnormalnom placentacijom i vaskularnim abnormalnostima posteljice (npr. preeklampsija) (Hutter i sur., 2010). Mozak koji se tek razvija, kao što je mozak fetusa, iznimno je osjetljiv na oksidativnu ozljedu. Usred fetalne hipoksije uključuju se adaptacijski mehanizmi i dolazi do centralizacije krvotoka u korist fetalnog mozga (tzv. efekt poštede mozga); Slika 1.2., srca i nadbubrežnih žlijezda, dok periferija ostaje lišena adekvatne količine kisika (Pleša, 2017). Barkerova hipoteza navodi da adaptacijski mehanizmi koji omogućavaju fetusu preživljavanje intrauterine deprivacije kisika i nutrijenata rezultiraju reprogramiranjem razvojnih puteva vitalnih organa, što može uzrokovati patološke posljedice u odrasloj dobi (rani moždani udar, dijabetes, ishemijska ozljeda mozga, kognitivne poteškoće). Česte komplikacije uzrokovane intrauterinom hipoksijom su udisanje mekonija, metabolički poremećaji, kognitivni deficit, cerebralna paraliza, periventrikularna leukomalacija, intrakranijalno krvarenje i široki spektar funkcionalnih neuroloških oštećenja (Mallard i Vexler, 2015).

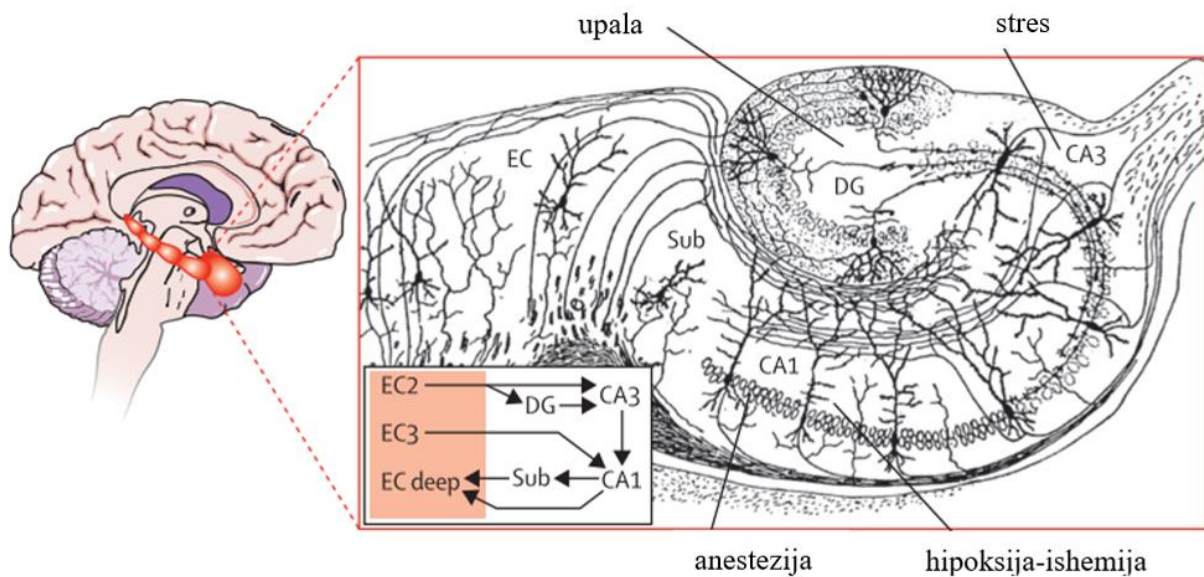


Slika 1.2. Mehanizam fetalne „poštude mozga“ (Giussani, 2016)

Odgovor na akutnu hipoksiju pokreće karotidni kemorefleks koji dovodi do bradikardije i povećanja periferne vazokonstrikcije. Bradikardija je posredovana dominantnim utjecajem vagusa na srce fetusa. Periferna vazokonstrikcija održava se oslobađanjem hormona u fetalnu cirkulaciju, kao i održavanjem vaskularnog tonusa oksidansa određenog interakcijom između dušikovog oksida ( $\cdot\text{NO}$ ) i reaktivnih vrsta kisika (ROS), kao što je superoksidni anion ( $\cdot\text{O}_2^-$ ).

Kratkoročne epizode akutne hipoksije i acidoze kao rezultat kontrakcije maternice i/ili kompresije pupčane vrpce prisutne su pri normalnom porodu (Giussani, 2016). Ova su kolebanja plinova u arterijskoj krvi ipak blaga i reverzibilna pa se vjeruje da imaju ulogu u pripremi fetusa za početak normalnog disanja. Većina djece prevladava ovu prepreku bez većih problema i brzo uspostavlja ekstracelularnu i intracelularnu homeostazu. Dvadeset tri posto novorođenčadi zahtijeva aktivnu pomoć kako bi počelo disati, čemu je uzrok tzv. perinatalna asfiksija. Primarna reanimacija sprječava, ne samo prijeteću smrt, nego skraćivanjem razdoblja hipoksije sprječava hipoksičnu ozljedu tkiva (Nyakas i sur., 1995). U novije vrijeme, umjesto pojma perinatalne asfiksije, sve se češće koristi pojam hipoksično-ishemičke encefalopatije (HIE) novorođenčadi. HIE je jedan od najvažnijih uzroka perinatalne ozljede mozga koja može dovesti do smrti ili ostaviti trajne posljedice kao što su cerebralna paraliza, mentalna retardacija, poremećaji glasovne komunikacije, poremećaji u afektivnom životu i ponašanju te

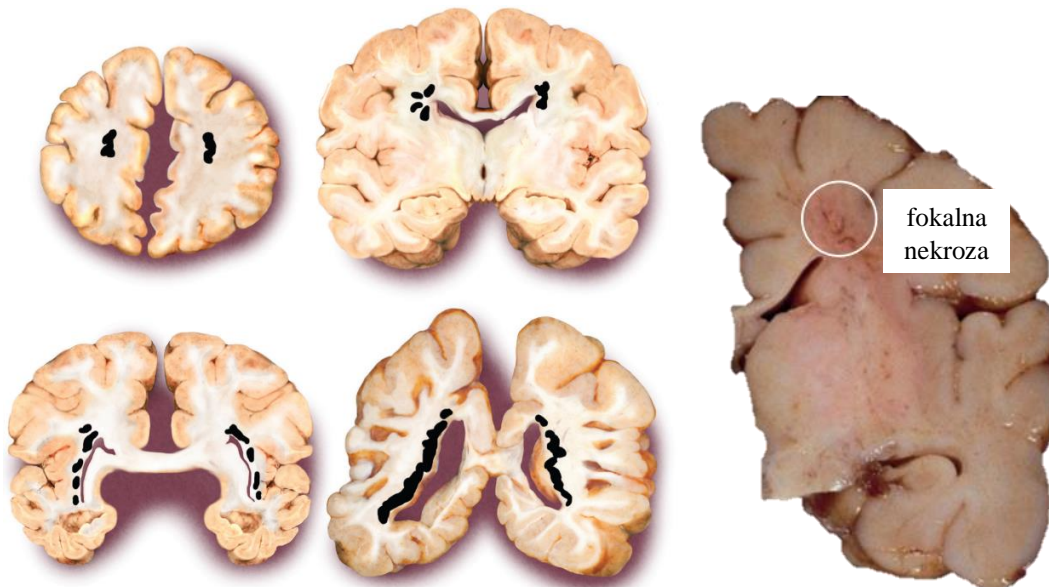
senzomotorički deficiti. Hiperaktivnost kore velikog mozga koja se manifestira konvulzijama i abnormalnom električnom aktivnosti u mozgu, klasična je posljedica hipoksično-ishemične ozljede mozga (Ishida i sur., 2001). Opisana oštećenja su neprogresivna i mogu se kompenzirati neurobiološkim procesima plastičnosti i maturacije mozga s manjim ili većim funkcionalnim oporavkom (Predojević i Tomasović, 2015). Plastičnost mozga označava sposobnost moždanog tkiva da promjeni strukturu i funkciju kao odgovor na promjene unutar tijela ili u okolišu (Nalivaeva i sur., 2018). Iako mozak u razvoju ima veće kompenzacijske mogućnosti u odnosu na mozak odrasle osobe, fetalna hipoksija dovodi do smanjenja adaptivnog potencijala mozga i plastičnosti zbog poremećaja umrežavanja neurona, posebno u kori velikog mozga i hipokampusu (Cooper i sur., 2015) (Slika 1.3.). U ovom slučaju to može uzrokovati abnormalno oblikovanje sinapsi i manifestirati se u obliku epilepsije, motoričkih i kognitivnih oštećenja (Hristova i Rocha-Ferreira, 2016). Hipoksija je povezana i s povećanom mogućnosti razvoja neurodegenerativnih poremećaja (npr. Parkinsonova i Alzheimerova bolest), ali i neuobičajenih misli, djela, čak i mentalnih poremećaja uzrokovanih promjenama u komunikaciji između neurona nastalima tijekom neuralnog razvoja (Nalivaeva i sur., 2018; Basovich, 2010).



Slika 1.3. Osjetljivost hipokampusa na stanja povezana s neonatalnom ozljedom (Hoskote i sur., 2018). Subregije hipokampusa - CA1, CA3, dentatni girus (DG) i subikulum (Sub – *lat. subiculum*) pokazuju razliku u osjetljivosti na hipoksiju-ishemiju, upalu, stres i anesteziju. U donjem lijevom kutu prikazan je neuralni krug hipokampalne formacije (EC = entorinalni korteks; EC2 = drugi sloj entorinalnog korteksa; EC3 = treći sloj entorinalnog korteksa)

### 1.1.3. Periventrikularna leukomalacija

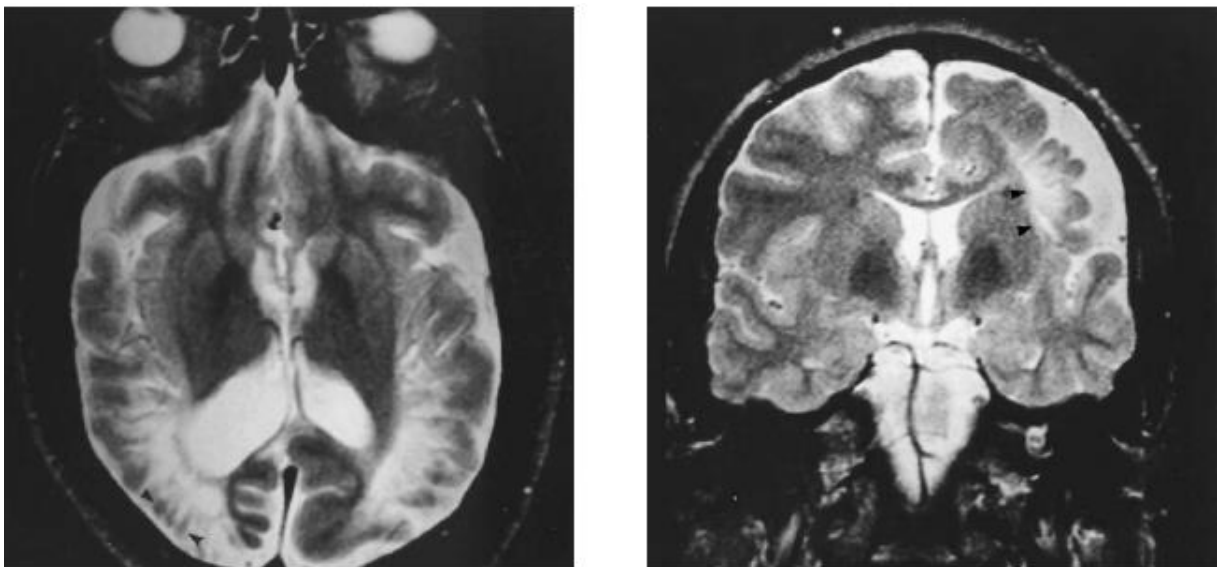
Neuropatološko oštećenje uzrokovano HIE ima drugačije posljedice kod nedonoščadi i kod djece rođene u terminu. Glavno područje ozljede u nerazvijenom mozgu prijevremeno rođenog djeteta je periventrikularna bijela tvar što uzrokuje periventrikularnu leukomalaciju (PVL). Ozljeda periventrikularne bijele tvari može imati dugotrajne posljedice na fizički, motorički, senzorički, kognitivni i socijalni razvoj djeteta (Cai i sur., 2005). PVL povezana je s difuznom reaktivnom gliozom i aktivacijom mikroglije u okolnoj cerebralnoj bijeloj tvari. Hipoksično-ishemična povreda mozga narušava mijelinizaciju te dovodi do smrti oligodendrocita koji su iznimno osjetljivi na toksični učinak glutamata i slobodnih radikala (Aguirre i sur., 2012). Smatra se da razlike u osjetljivosti tih regija mozga, s obzirom na gestacijsku dob djeteta, proizlaze iz promjena rasporeda NMDA receptora za glutamat tijekom razvoja (Ferriero i Sheldon, 1996). Promjene u bijeloj tvari do kojih dolazi za vrijeme brzog rasta mozga uzrokuju lezije. Lezije se pojavljuju u dubokim graničnim arterijskim zonama i krajnjim zonama u periventrikularnoj bijeloj tvari (Slika 1.4.). Također, u mozgu djece s PVL povišena je koncentracija proupalnih citokina, što ukazuje na snažni upalni odgovor mikroglije, mastocita, neutrofila i T- stanica (Mallard i Vexler, 2015). Reaktivna mikroglija štiti oligodendrocite od ekscitotoksične ozljede, ali može i doprinijeti ozljedi tkiva slobodnim radikalima. Naime, aktivacijom mikroglije u akutnoj fazi dolazi do pojave znatne količine NOS-a, što sugerira da mikroglija ima ulogu u patogenezi PVL-a (Volpe, 2018).



Slika 1.4. Topografija pojavljivanja periventrikularne leukomalacije. Lezija se javlja u dubokim arterijskim graničnim zonama u periventrikularnoj bijeloj tvari (dijelovi označeni crnom bojom); Volpe, 2018

#### 1.1.4. Ulegirija

U nedonoščadi, produljena hipoksija povezana je s periventrikularnom leukomalacijom, dok akutna hipoksija kod novorođenčadi rođenoj u terminu uzrokuje ulegiriju (Dermentzoglou i sur., 2008). Izvedena iz latinske riječi „ule“ što znači ožiljak, ulegirija je jedan od pokazatelja HIE. Tipično se javlja kod djece koja su rođena u periodu od 37 navršenih tjedana do manje od 42 tjedna trudnoće. Donji dio sulkusa je najpodložniji hipoksično-ishemičnoj ozljedi jer je i najmanje opskrbljen krvlju, za razliku od girusa koji ima konstantnu perfuziju. Donji dio sulkusa atrofira te se javlja glijoza, proces kojim dolazi do nakupljanja glija stanica oko neurona, što rezultira karakterističnim izgledom „gljivolikih“ girusa (Slika 1.5.). Među oštećenim neuronima mogu postojati „otoci“ relativno neoštećenih neurona. Nemogućnost komunikacije između „otoka“ neurona i okolnog zahvaćenog tkiva dovodi do pojave farmakorezistentnih epileptičkih napadaja (Agarwal i sur., 2016). Neurološke posljedice često uključuju i cerebralnu paralizu s različitim stupnjevima intelektualnih oštećenja.



Slika 1.5. Ulegirija. Glijoza primarno utječe na donji dio vijuga (označeno strelicama)  
(Avanzini i sur., 2003).



### 1.1.5. Epilepsija i poremećaj pažnje s hiperaktivnošću

HIE je najčešći uzrok neonatalnih napadaja i dugotrajnih kognitivnih oštećenja. Epileptički napadaj vidljiva je manifestacija epilepsije koju karakteriziraju epizode poremećene motorike, senzoričke, ponašanja i percepcije, a nastaje zbog hiperpodražljivosti neurona SŽS-a (Ishida i sur., 2001). Napadaj započinje sinkroniziranom depolarizacijom dovoljnog broja neurona što rezultira stvaranjem akcijskog potencijala. Većina djece pokazuje znakove epilepsije unutar 24 sata od rođenja (Vannucci i Vannucci, 2001) što odgovara periodu razvoja tijekom kojeg dolazi do mnogih neurokemijskih promjena. Iako se vjerovalo da je mozak djeteta manje osjetljiv na utjecaj hipoksije i ishemije, novija istraživanja ukazuju na to da je neonatalni mozak podložniji zbog aktivnosti receptora za glutamat (NMDA III). Ozljeda moždanog tkiva uslijed hipoksije-ishemije može rezultirati otpuštanjem pretjerane količine tog ekscitatornog neurotransmitera uzrokujući pretjeranu depolarizaciju. Iz tog razloga se smatra da je receptor za glutamat medijator apoptoze i da je ekcitoloksičnost uzrokovana njegovom pretjeranom aktivnošću povezana s epileptičkim napadajima (Applegate i sur., 1991). Mnoga istraživanja provedena na životinjama i ljudima sugeriraju da napadaji pogoršavaju postojeću ozljedu mozga te mogu uzrokovati nepopravljive izmjene u načinu na koji se mozak razvija i formira sinapse (Volpe, 2018). U početnoj fazi napadaji su blagi, no s vremenom postaju opasniji s čestom pojavom sekundarnih neurorazvojnih i neuropsihijatrijskih poremećaja (Benna i sur., 1984). Jedan od neurorazvojnih poremećaja, poremećaj nedostatka pažnje s hiperaktivnošću (ADHD - *eng. attention deficit hyperactivity disorder*) pogađa tri do pet puta više djecu sa epilepsijom nego djecu u općoj populaciji. Karakterizira ga vrlo visok stupanj motoričke aktivnosti kao manifestacije vrlo visoke mentalne aktivnosti. Smatra se da je jedan od razloga zbog kojih je mehanizam nastanka ADHD-a nepoznanica, nedostatak prihvatljivog animalnog modela. Ne postoji izravan dokaz da fetalna hipoksija uzrokuje pojavu ovog sindroma, s druge strane animalni modeli fetalne hipoksije rezultiraju brojnim simptomima viđenim u djece s ADHD-om kao što su hiperaktivnost, poteškoće u pamćenju i manjak pozornosti (Nyakas i sur., 1995). Također, poznato je da je prenatalna hipoksija-ishemija jedan od uzroka rođenja djeteta male porođajne mase (nedostašće) (Ashmarin i sur., 2003). Rizik pojave ADHD-a je dvostruko veći kod takve djece nego kod djece normalne mase (Yager, 2004). To predstavlja dodatnu poveznicu hipoksije i ADHD-a (Kaczorowski i sur., 2016).

Zbog svega navedenog, fetalna hipoksija se opširno istražuje, no zbog nemogućnosti istraživanja na ljudskim fetusima važnu ulogu imaju animalni modeli.

## 1.2. Animalni modeli hipoksije

U svrhu boljeg razumijevanja uloge fetalne hipoksije u daljnjem razvoju djeteta, mogućim ishodima i temeljnim mehanizmima nastanka ozljede mozga i mogućem razvitku terapijskih strategija, posljednjih desetljeća bilo je neophodno korištenje mnogih animalnih modela (Yager, 2004). Unatoč izazovima, provedba komparativnih ispitivanja povezivanjem točaka u razvoju morfologije mozga štakora s morfologijom ljudskog mozga izuzetno je važna (Anand, i sur., 2007). Sposobnost izjednačavanja stadija razvoja (Tablica 1.1.) među vrstama omogućuje bolje razumijevanje manje laboratorijski pristupačnog ljudskog mozga pomoću provedenih neurorazvojnih istraživanja na drugim animalnim modelima. Niti jedan animalni model ne može replicirati složene uvjete u ljudskom tijelu. Međutim, svaka životinjska vrsta može ponuditi novi uvid u moguće mehanizme nastanka ozljede i pružiti vrijedne informacije o patofiziologiji fetalnog oštećenja mozga i pomoći u pronalasku novih terapijskih metoda.

Štakori su najčešći animalni modeli hipoksije zbog kratkog reproduktivnog ciklusa, male veličine i niskih troškova uzgajanja. Štoviše, štakor se rađa u relativno ranoj fazi sazrijevanja, što ga svrstava među životinje čiji se mozak u velikoj mjeri razvija postnatalno (*eng. postnatal brain developer*) i čini ga prikladnim za proučavanje izravnih učinaka eksperimentalnih intervencija na rani razvoj mozga. Također, neuroanatomske usporedbe, usporedbe vremena neurogeneze, sinaptogeneze, gliogeneze, sazrijevanja i mijelinizacije ukazuju na to da stadij razvoja mozga štakora tijekom prva dva postnatalna tjedna odgovara trećem tromjesečju razvoja mozga ljudskog fetusa kada najčešće dolazi do problema s hipoksijom.

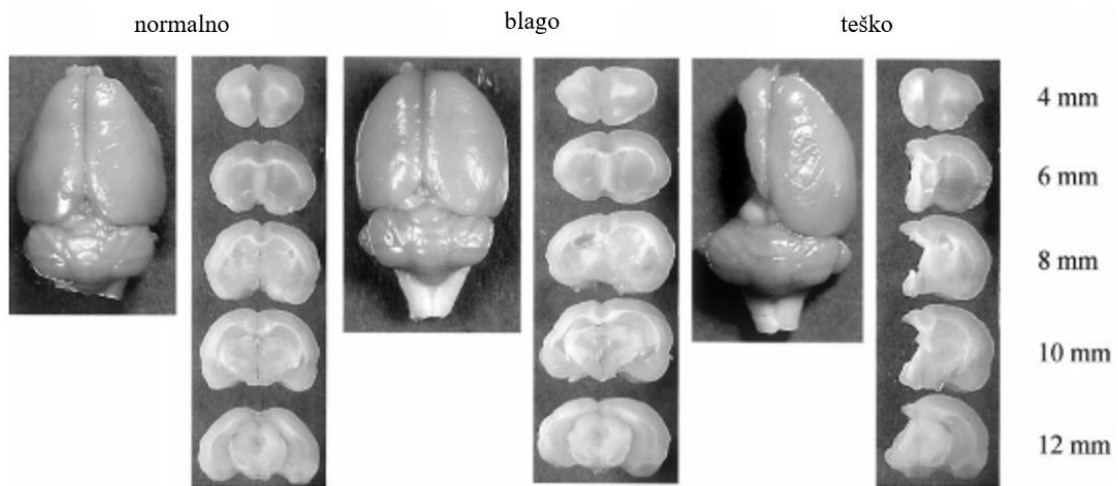
Tablica 1.1. Usporedni prikaz razvojnih točaka među vrstama (Clancy i sur., 2001)

(G – gestacija, P – postnatalni dan)

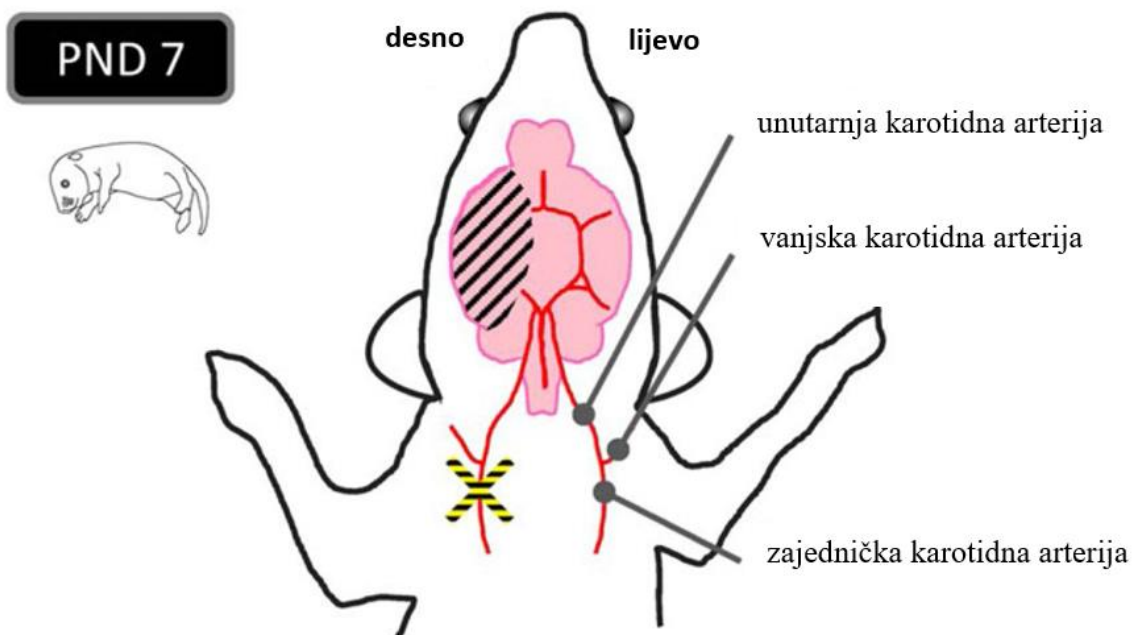
štakor	hrčak	miš	kunić	ježoliki miš	tvor	mačka	makaki			čovjek		
							limbički	ostala	kora	limbički	ostala	kora
(G21.5)	(G15.5)	(G18.5)	(G31)	(G39)	(G41)	(G65)	(G165)			(G270)		
9.0	8.1	8.3	9.9	10.4	13.9	14.7	19	20	23	23	25	29
9.5	8.5	8.7	10.5	11.1	15.0	16.0	21	22	26	26	27	32
10.0	8.9	9.1	11.1	11.8	16.2	17.3	23	24	28	28	30	35
10.5	9.3	9.5	11.7	12.5	17.4	18.6	24	26	31	30	33	39
11.0	9.7	9.9	12.4	13.2	18.6	19.8	26	28	33	33	35	42
11.5	10.1	10.3	13.0	13.8	19.7	21.1	28	30	36	35	38	45
12.0	10.4	10.7	13.6	14.5	20.9	22.4	30	32	38	38	41	48
12.5	10.8	11.1	14.2	15.2	22.1	23.7	32	34	41	40	43	52
13.0	11.2	11.5	14.9	15.9	23.2	25.0	34	36	43	43	46	55
13.5	11.6	11.9	15.5	16.6	24.4	26.3	35	38	45	45	48	58
14.0	12.0	12.3	16.1	17.3	25.6	27.6	37	40	48	47	51	61
14.5	12.4	12.7	16.7	18.0	26.8	28.8	39	42	50	50	54	65
15.0	12.7	13.2	17.3	18.7	27.9	30.1	41	44	53	52	56	68
15.5	13.1	13.6	18.0	19.4	29.1	31.4	43	46	55	55	59	71
16.0	13.5	14.0	18.6	20.1	30.3	32.7	45	48	58	57	62	74
16.5	13.9	14.4	19.2	20.8	31.4	34.0	47	50	60	60	64	78
17.0	14.3	14.8	19.8	21.5	32.6	35.3	48	52	63	62	67	81
17.5	14.6	15.2	20.5	22.1	33.8	36.5	50	54	65	64	70	84
18.0	15.0	15.6	21.1	22.8	34.9	37.8	52	56	68	67	72	87
18.5	15.4	16.0	21.7	23.5	36.1	39.1	54	58	70	69	75	91
19.0	OKOT	16.4	22.3	24.2	37.3	40.4	56	60	73	72	78	94
19.5	P0.7	16.8	22.9	24.9	38.5	41.7	58	62	75	74	80	97
20.0	P1.1	17.2	23.6	25.6	39.6	43.0	60	64	78	77	83	100
20.5	P1.4	17.6	24.2	26.3	OKOT	44.3	61	66	80	79	86	104
21.0	P1.8	18.0	24.8	27.0	P1	45.5	63	68	82	82	88	107
OKOT	P2.2	OKOT	25.4	27.7	P2.1	46.8	65	70	85	84	91	110
P1	P3	P0.7	26.7	29.1	P4.5	49.4	69	74	90	89	96	117
P2	P3.7	P1.5	27.9	30.4	P6.8	52.0	72	78	95	94	101	123
P3	P4.5	P2.3	29.2	31.8	P9.2	54.5	76	82	100	99	107	130
P4	P5.3	P3.1	OKOT	33.2	P11.5	57.1	80	86	105	103	112	136
P5	P6	P3.9	P0.6	34.6	P13.9	59.7	84	90	110	108	117	143
P6	P6.8	P4.8	P1.9	36.0	P16.2	62.2	87	94	114	113	123	149
P7	P7.6	P5.6	P3.1	37.4	P18.5	OKOT	91	98	119	118	128	155
P8	P8.3	P6.4	P4.4	OKOT	P20.9	P2.4	95	102	124	123	133	162
P9	P9.1	P7.2	P5.6	P1.1	P23.2	P5	98	107	129	128	139	168
P10	P9.9	P8	P6.9	P2.5	P25.6	P7.5	102	111	134	133	144	175
P11	P10.6	P8.8	P8.1	P3.9	P27.9	P10.1	106	115	139	138	149	181
P12	P11.4	P9.6	P9.4	P5.3	P30.3	P12.7	109	119	144	142	154	188
P13	P12.2	P10.4	P10.6	P6.6	P32.6	P15.2	113	123	149	147	160	194
P14	P12.9	P11.2	P11.8	P8	P34.9	P17.8	117	127	154	152	165	201
							122	133	161	159	173	211
							126	137	OKOT	164	178	217
										169	184	224
										174	189	230
										179	194	237
										184	199	243
										189	205	250
										194	210	256
										198	215	263
										203	221	POROD

### 1.2.1. Invazivni animalni modeli hipoksije

Brojna dosadašnja istraživanja koristila su invazivne metode kod kojih je na mladuncima izveden kirurški zahvat kako bi se izazvala HI. Korišteni zahvati su unilateralna ili bilateralna ligacija karotide i bilateralna okluzija karotide popraćene izlaganjem životinje hipoksiji u hipoksičnoj komori. Najbolje proučavani neonatalni model HI je Rice-Vannuccijev štakorski model koji je omogućio proučavanje temeljnih mehanizama hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga (Slika 1.6.). Mladunci štakora se sedmog postnatalnog dana podvrgnu ligaciji karotidne arterije nakon čega su izloženi hipoksiji 8%-tnim kisikom tijekom 3.5 sata (Slika 1.7.). S obzirom da klasična izvedba Rice-Vannuccijevog modela nije u potpunosti imitirala promjene nastale uslijed HI uočene kod ljudi, posljednjih je godina razvijeno nekoliko optimizacija modela. Ferriero i Sheldon (1996) razvili su jednu od poznatijih optimizacija klasičnog modela. Prvog postnatalnog dana štakori su podvrgnuti ligaciji desne karotide te naknadno izloženi hipoksiji (6% O<sub>2</sub>) tijekom 3.5 h. Posljedice su teške unilateralne ozljede, nekroza korteksa, progresivni gubitak neurona i stanjenje anteriornog dijela *corpus calosuma*. Štakori doživljavaju infarkt, dok su nekrotična područja i cistične lezije slične onima u dojenčadi s teškim oblicima PVL-e (Rumajogee, 2018). Rice-Vannuccijev model je adaptacija Levinovog modela HI na odraslim štakorima. Riceova modifikacija Levinove metode široko je korištena kao štakorski model neonatalne hipoksično-ishemične encefalopatije. Iako unilateralno oštećenje mozga prisutno u modelu nije tipično za HIE, model je popularan zbog lake reproducibilnosti i niske stope smrtnosti životinja. U ovim eksperimentalnim uvjetima dolazi do teških motoričkih i somatosenzoričkih deficita i vidljivih poteškoća u učenju i pamćenju (Arteni i sur., 2003). Ovaj model omogućuje pregled potencijalnih pristupa u postizanju popravka i regeneracije oštećenog moždanog tkiva uslijed HIE. S obzirom da navedeni modeli koriste invazivne metode postoji mogućnost da stres uzrokovan operativnim zahvatom i anestezijom utječe na dobivene rezultate, stoga je teško razlučiti uzrok opažene promjene.



Slika 1.6. Posljedice HI (lijevo-nema oštećenja; sredina-blago oštećenje; desno-teško oštećenje) (Ikeda i sur., 2001)



Slika 1.7. Ligacija desne karotidne arterije sedmog postnatalnog dana (Rumajogee, 2018)

### 1.2.2. Neinvazivni animalni modeli hipoksije

Neinvazivne animalne modele hipoksije karakterizira odsutnost ishemijske procedure. Prisutna je samo hipoksija koja je inducirana pomoću komore za deprivaciju kisika. Uspoređujući izlaganje štakora hipoksiji (8% kisika, 1.5h) sedmog postnatalnog dana sa štakorima na kojima je provedena bilateralna ligacija karotide i koji su nakon zahvata izloženi istim hipoksičnim uvjetima, zaključeno je da nema značajne razlike u stupnju ozljeda među grupama. Obje grupe su pokazivale smanjenu funkciju neurona kao i značajne ozljede hipokampusa, subkorteksa i lateralnog ventrikula. Dakle, sama deprivacija kisika je dovoljna da uzrokuje oštećenja mozga slična onima nakon HI. Iako neinvazivni modeli nisu tako široko korišteni kao invazivni modeli, oni imaju svoje prednosti te u nekim slučajevima mogu preciznije oponašati ozljedu ljudskog mozga (Cui i sur., 2013). Dostupne neinvazivne metode su raznovrsne. Kod štakora se prenatalna hipoksija može postići smještanjem trudnih štakorica u komoru sa smanjenim sadržajem kisika u komori (normobarična komora) i postepenom zamjenom kisika inertnim plinom. Hipoksija se također može proizvesti u hipobaričnoj komori, koja oponaša hipoksiju velike nadmorske visine. Za istraživanje kronične intermitentne hipoksije koristi se intermitentna komora u kojoj se izmjenjuju uvjeti normalne i smanjene količine kisika. Neinvazivni model kojeg su razvili Nalivaeva i sur. (2018) izlažući štakorice normobaričnoj hipoksiji zamjenom kisika dušikom do koncentracije O<sub>2</sub> od 7% tijekom 10 minuta i zadržavanjem na toj razini tijekom 3 h u različitim danima trudnoće, jedan je od najkorištenijih neinvazivnih modela.

## 2. Cilj istraživanja

Dosadašnja istraživanja ukazuju na razvojne posljedice izlaganja štakora hipoksiji u normobaričnim i hipobaričnim uvjetima, no još nije provedeno istraživanje fokusirano na usporedbu dugotrajnih posljedica neonatalnog izlaganja hipoksiji u hipobaričnoj i normobaričnoj komori. Ovaj diplomski rad dio je većeg istraživačkog projekta kojem je cilj razvitak neinvazivnog štakorskog modela neonatalne hipoksije. Prethodno je testirano ponašanje mladunaca izloženih hipoksiji u normobaričnim (Krizman, 2019) i hipobaričnim (Stipan, 2020) uvjetima te su uočene promjene u lokomociji i eksploratornom ponašanju, koje su bile nešto izraženije u hipobaričnoj skupini.

Cilj ovog diplomskog rada je utvrditi postoje li promjene u socijalnom, emocionalnom i eksploratornom ponašanju te lokomociji i kogniciji u odraslih štakora, koji su bili izloženi hipoksiji u hipobaričnim ili normobaričnim uvjetima prvog postnatalnog dana, u odnosu na odrasle štakore kontrolne skupine, koji nisu bili izloženi hipoksiji te u kojoj mjeri one odgovaraju promjenama uočenima u mladunaca.

### 3. Materijali i metode

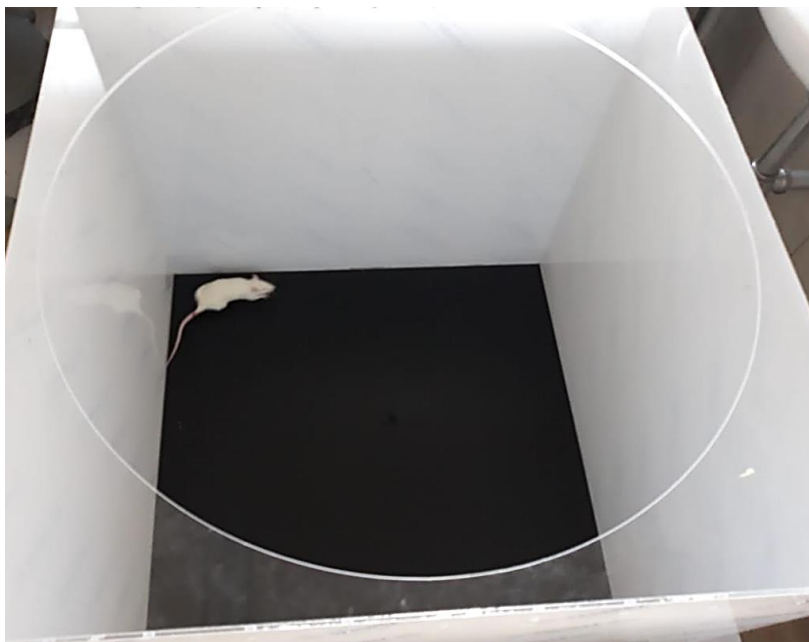
#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Životinje

U svrhu ovog istraživanja korišteno je 68 štakora soja Wistar i to 21 hipobarični (9 ženki i 12 mužjaka), 17 normobaričnih (9 ženki i 8 mužjaka) i 30 kontrolnih (16 ženki i 14 mužjaka). Na ovom projektu Zavod za animalnu fiziologiju je surađivao s Hrvatskim institutom za istraživanje mozga, gdje se odvijalo parenje, okot i izlaganje hipoksiji. Eksperimentalne životinje su prvog postnatalnog dana boravile u toploj ( $\approx 25^{\circ}\text{C}$ ) hipobaričnoj (Atm 350 mmHg,  $p\text{O}_2$  73mmHg) ili normobaričnoj (8%  $\text{O}_2$ ) komori, a kontrolne životinje u kavezu pod normoksičnim uvjetima, tijekom 2 sata. Dvadeset osmog postnatalnog dana štakori su odvojeni od majke i dopremljeni u Zavod za animalnu fiziologiju, gdje su razmješteni u kaveze prema spolu i tretmanu. U svakom kavezu smještene su 3-4 životinje, uz slobodan pristup hrani i vodi (osim tijekom provođenja testiranja u T-labirintu). Nakon što su dosegle odraslu dob, životinje su podvrgnute bateriji testova ponašanja od 70. do 90. postnatalnog dana.

##### 3.1.2. Aparatura

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



Slika 3.1. Otvoreno polje



- Ploča s rupama je kutija od bijelog pleksiglasa veličine 80cm x 80cm x 70cm (Slika 3.2.) na čijem dnu se nalazi drvena ploča sa 16 ravnomjerno postavljenih rupa (4 x 4) promjera 4cm, od kojih je 12 smješteno uz stranice (periferno), a 4 u sredini (centralno) aparata.



Slika 3.2. Ploča s rupama

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



Slika 3.3. T- labirint

- 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.



Slika 3.4. Aparatura za test društvenog odabira

## 3.2. Metode

Testovi ponašanja korišteni u ovom diplomskom radu sveobuhvatno procjenjuju razinu lokomotorne aktivnosti kao i nepravilnosti u ponašanju koje mogu biti povezane s lokomocijom u otvorenom polju (*eng. Open field*), anksiozno ponašanje i neofiliju na ploči s rupama (*eng. Hole board*), prostorno učenje i radnu memoriju u T-labirintu (*eng. T-maze*) te socijabilnost u testu društvenog odabira (*eng. Social choice*).

### 3.2.1. Test u otvorenom polju

U otvorenom polju svaku životinju se pojedinačno stavilo u sredinu polja i snimalo kamerom 5 minuta te se nakon toga pomoću računalnog programa EthoVisionXT13 izračunala duljina prijeđenog puta (cm), vrijeme provedeno u gibanju (s), brzina kretanja (cm/s) i broj propinjanja za svaku životinju.

### 3.2.2. Test na ploči s rupama

U ovom testu se svakog štakora stavilo na sredinu ploče i tijekom 5 minuta se mjerio ukupan broj posjećenih rupa (eksploratorno ponašanje) i izračunao se postotak posjećenosti unutarnjih rupa (anksiozno ponašanje). Rupa se smatrala posjećenom kada je štakor uronio glavu u rupu iznad razine očiju.

### 3.2.3. Test u T-labirintu

Testiranje učenja provodilo se jednom dnevno, uzastopno tijekom 5 dana. Dan prije testiranja štakorima se uklonila hrana kako bi bili motivirani za pronalaženje hrane u labirintu te im je tijekom trajanja pokusa vraćana na sat vremena dnevno, nakon testiranja. Prvi pokušaj određuje prirodni odabir jednog kraka labirinta štakora te mu se u sljedećim pokušajima hrana postavlja uvijek u isti, suprotni krak labirinta pri čemu štakor ima 10 pokušaja u nizu, svaki u trajanju od 60 sekundi, da pronade hranu.

### 3.2.4. Test društvenog odabira

U testu društvenog odabira štakor se na 3 minute stavi u srednji odjeljak kako bi se priviknuo na kavez, a zatim se otvaraju vrata prema postranim odjeljcima. U jednom odjeljku je predmet, dok je u drugom nepoznata jedinka istog spola kojoj je onemogućeno kretanje. Ponašanje štakora snima se 5 minuta te se mjeri vrijeme (s) provedeno u istraživanju predmeta i vrijeme (s) provedeno u istraživanje jedinke.

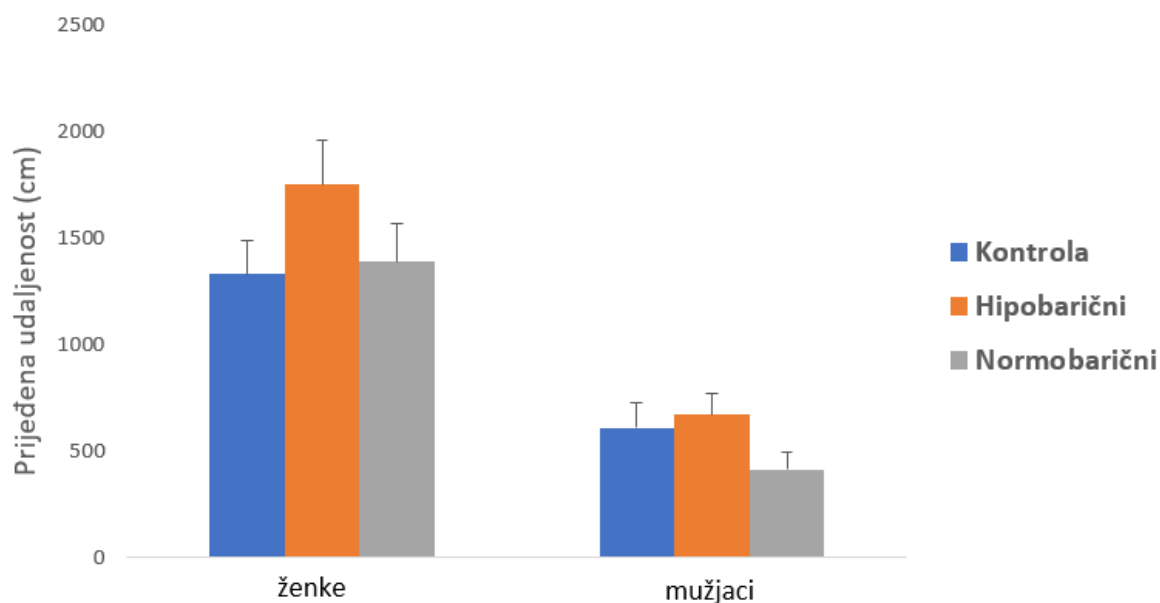
## 3.3. Statistička obrada podataka

Naposljetku, rezultati testova su statistički 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) ± standardna pogreška (SEM). Značajnost rezultata je prihvaćena kod  $p < 0,05$ .

## 4. Rezultati

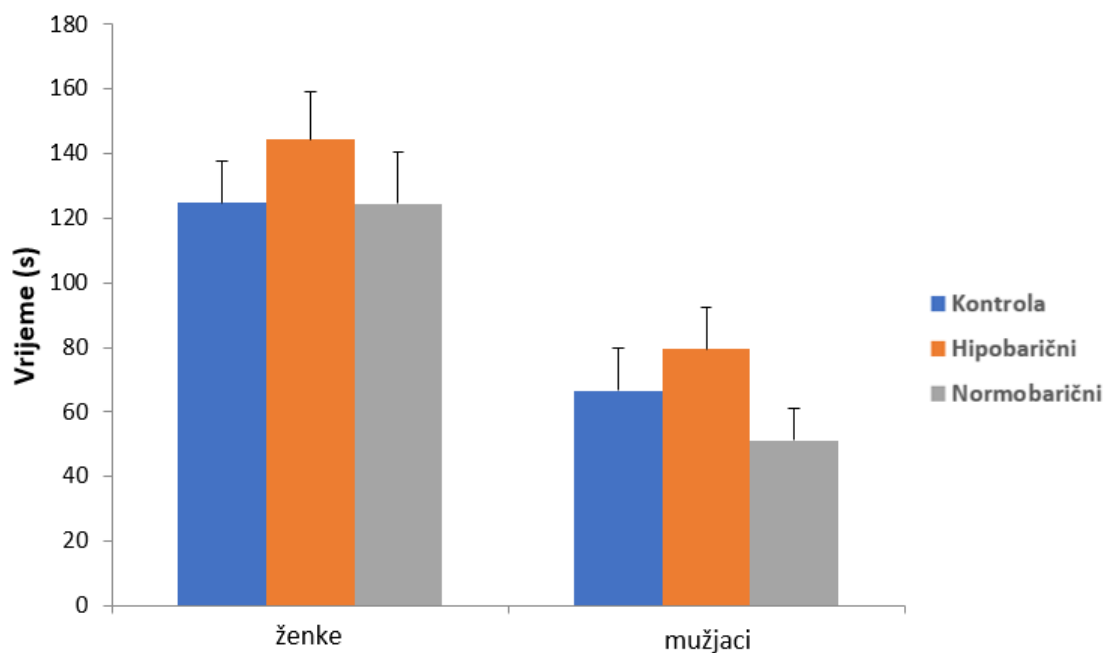
### 4.1. Test u otvorenom polju

Testiranjem u otvorenom polju 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).



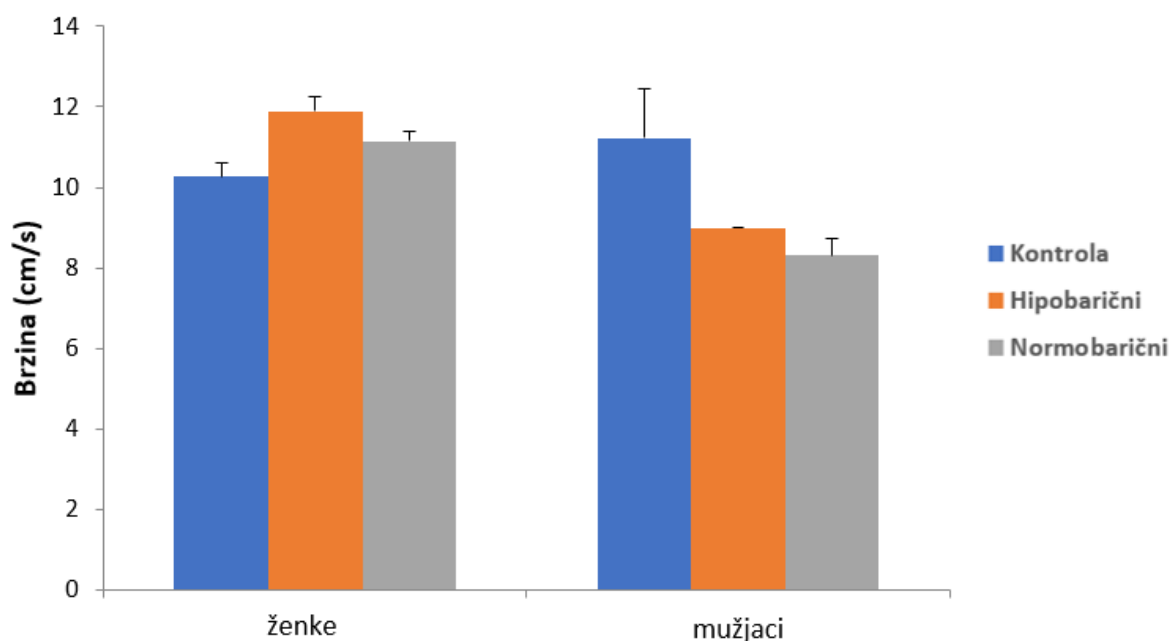
Slika 4.1. Ukupno prijeđena udaljenost ( $M \pm SEM$ ) u otvorenom polju štakora iz hipobarične ( $N = 9$  ženki, 12 mužjaka), normobarične ( $N = 9$  ženki, 8 mužjaka) i kontrolne ( $N = 16$  ženki, 14 mužjaka) skupine životinja.

Iako su hipobarične životinje prošle nešto veću udaljenost od kontrolnih ( $1206 \pm 112$  cm naspram  $964 \pm 93$  cm) i od normobaričnih ( $1206 \pm 112$  cm naspram  $868 \pm 120$  cm) životinja, utjecaj tretmana na ukupno prijeđenu udaljenost nije bio statistički značajan ( $p = 0.1052$ ). Ženke su prošle veću udaljenost s obzirom na mužjake ( $1466 \pm 89$  cm naspram  $560 \pm 90$  cm) što je bilo statistički značajno ( $p < 0.0001$ ), (Slika 4.1.).



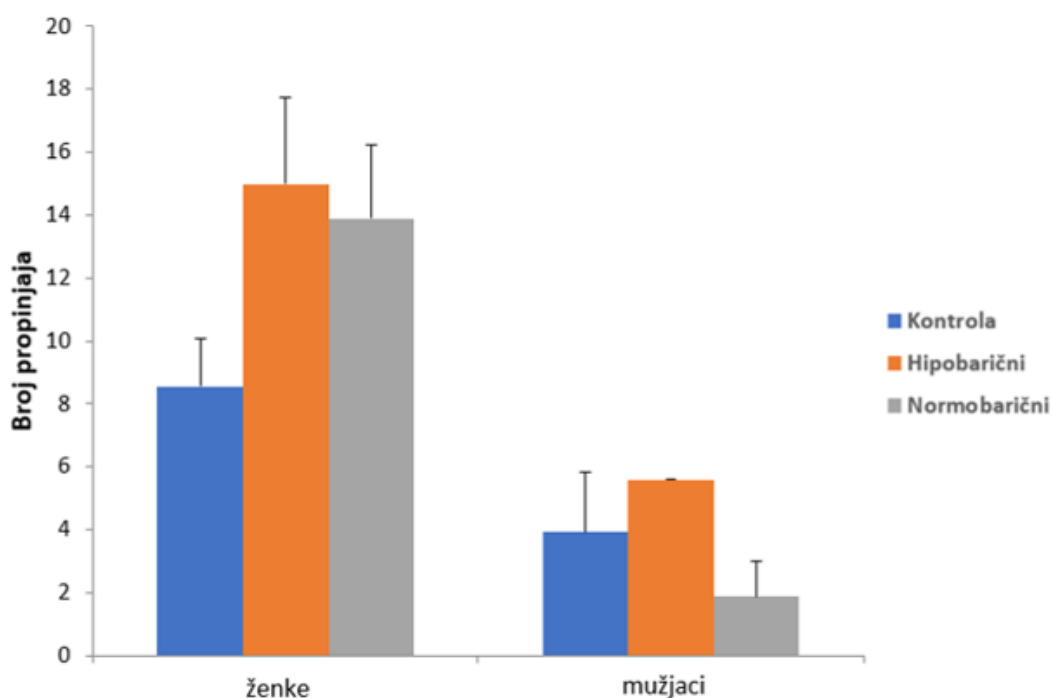
Slika 4.2. Vrijeme provedeno u kretanju ( $M \pm SEM$ ) tijekom testiranja u otvorenom polju štakora štakora iz hipobarične ( $N = 9$  ženki, 12 mužjaka), normobarične ( $N = 9$  ženki, 8 mužjaka) i kontrolne ( $N = 16$  ženki, 14 mužjaka) skupine životinja.

Utjecaj tretmana na vrijeme provedeno u kretanju nije bio statistički značajan ( $p = 0.2215$ ) iako su se hipobarične životinje kretale nešto više od kontrolnih ( $112 \pm 10.3$  s naspram  $95 \pm 8.5$  s) i normobaričnih životinja ( $112 \pm 10.3$  s naspram  $86 \pm 11.1$  s). Utjecaj spola je bio statistički značajan ( $p < 0.0001$ ). Ženke su se kretale dvostruko duže od mužjaka ( $130 \pm 8.1$  s naspram  $65 \pm 8.2$  s), (Slika 4.2.).



Slika 4.3. Brzina ( $M \pm SEM$ ) kojom su se tijekom testiranja u otvorenom polju kretali štakori iz hipobarične ( $N = 9$  ženki, 12 mužjaka), normobarične ( $N = 9$  ženki, 8 mužjaka) i kontrolne ( $N = 16$  ženki, 14 mužjaka) skupine životinja.

Tretman nije utjecao na brzinu kretanja životinja – ona je u svim podskupinama iznosila oko 10 cm/s, ( $p = 0.4880$ ). Uočena je značajna statistička razlika s obzirom na spol ( $p = 0.0397$ ). Naime, ženke su bile brže ( $11 \pm 0.52$  cm/s) od mužjaka ( $9.5 \pm 0.53$  cm/s), (Slika 4.3.).

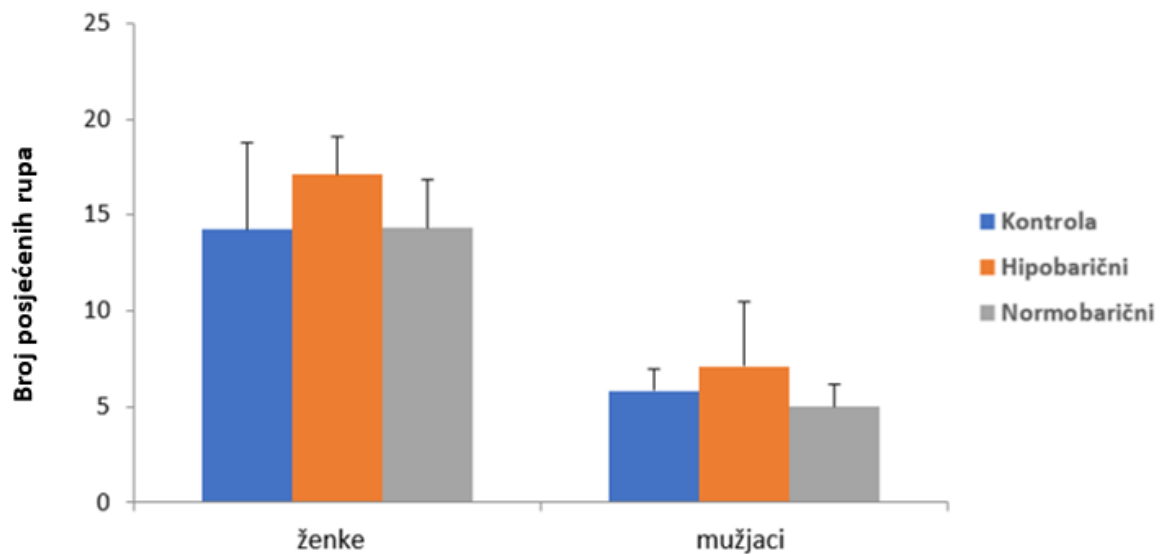


Slika 4.4. Broj propinjanja ( $M \pm SEM$ ) koje su tijekom testiranja u otvorenom polju napravili štakori iz hipobarične ( $N = 9$  ženki, 12 mužjaka), normobarične ( $N = 9$  ženki, 8 mužjaka) i kontrolne ( $N = 16$  ženki, 14 mužjaka) skupine životinja.

Na Slici 4.4. može se uočiti da se ženke propinju više od mužjaka ( $11.3 \pm 1.0$  naspram  $3.8 \pm 1.0$ ), što je statistički značajno ( $p < 0.001$ ). Također, uočen je značajan utjecaj tretmana ( $p = 0.0273$ ). Normobarične ( $7.4 \pm 1.3$ ), a još više hipobarične životinje ( $10.2 \pm 1.2$ ) se pojačano propinju u odnosu na kontrolu ( $5.8 \pm 1.1$ ).

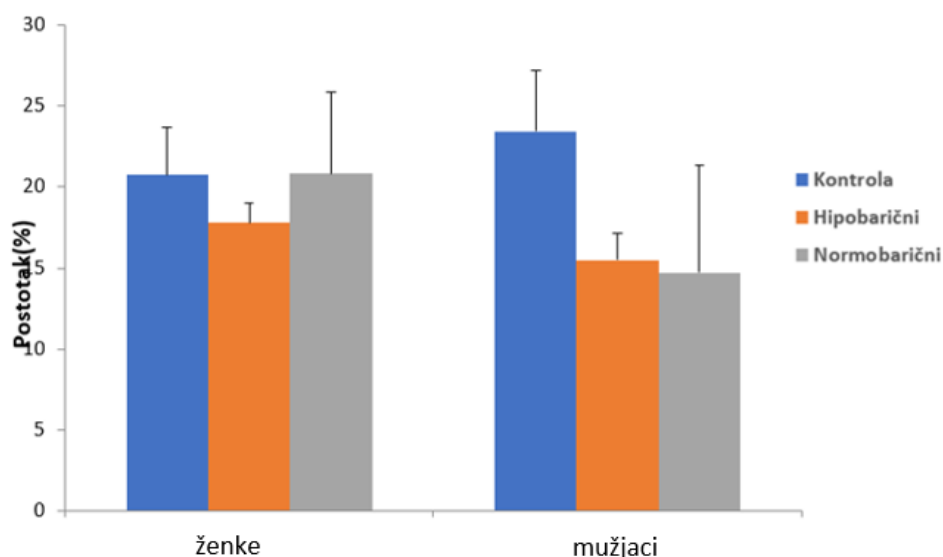
Interakcija skupina x spol nije bila značajna niti za jedan parametar.

## 4.2. Test na ploči s rupama



Slika 4.5. Ukupan broj rupa ( $M \pm SEM$ ) koje su tijekom testiranja na ploči s rupama posjetili štakori iz hipobarične ( $N = 9$  ženki, 12 mužjaka), normobarične ( $N = 9$  ženki, 8 mužjaka) i kontrolne ( $N = 16$  ženki, 14 mužjaka) skupine životinja.

Ženke značajno više istražuju u odnosu na mužjake ( $15.3 \pm 1.2$  naspram  $6.2 \pm 1.3$ ,  $p < 0.0001$ ), dok utjecaj tretmana nije bio statistički značajan ( $p = 0.2775$ ), kao ni utjecaj interakcije skupina x spol (Slika 4.5.).

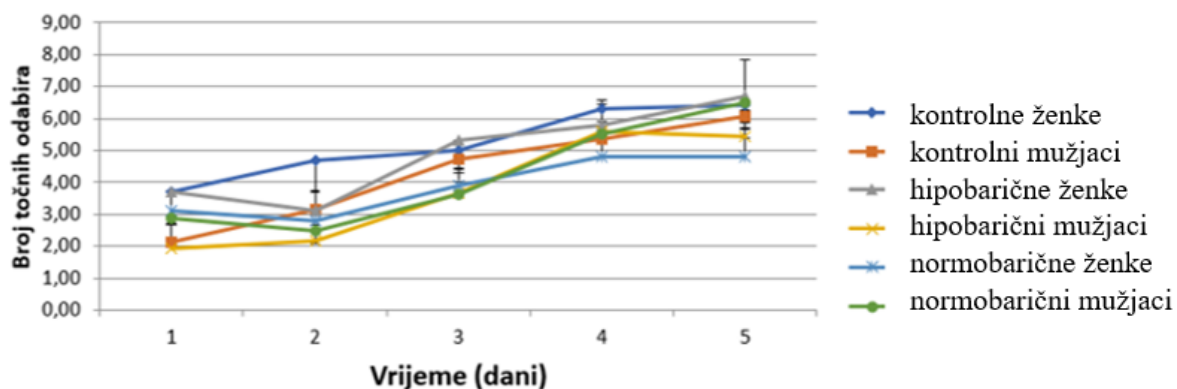


Slika 4.6. Postotak posjećenosti unutarnjih rupa ( $M \pm SEM$ ), u testiranju na ploči s rupama, od strane štakora iz hipobarične ( $N = 9$  ženki, 12 mužjaka), normobarične ( $N = 9$  ženki, 8 mužjaka) i kontrolne ( $N = 16$  ženki, 14 mužjaka) skupine životinja.



Pripadnost skupini ( $22\% \pm 2.7$  kontrolna,  $17\% \pm 3.3$  hipobarična,  $17\% \pm 3.5$  normobarična,  $p=0.3507$ ) i spolu ( $19.1\% \pm 2.6$  ženke,  $17.8\% \pm 2.6$  mužjaci,  $p = 0.7283$ ) kao ni njihova interakcija ( $p = 0.7094$ ) nije utjecala na postotak posjećenosti unutarnjih rupa, (Slika 4.6.).

### 4.3. Test u T - labirintu

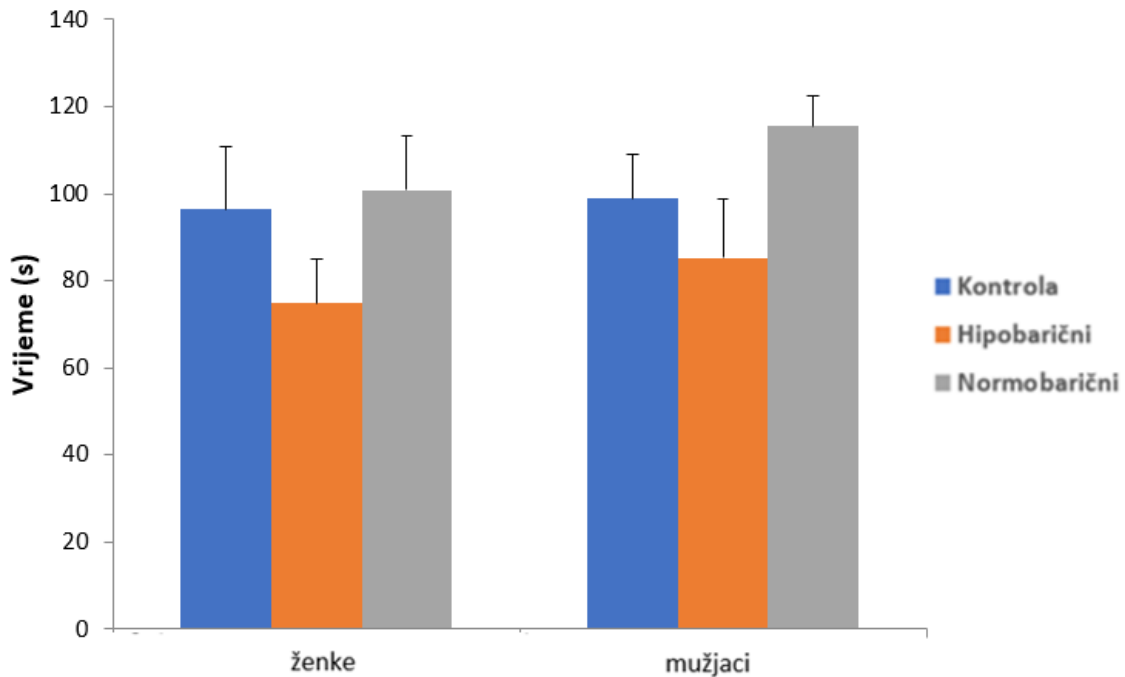


Slika 4.7. Dinamika učenja položaja nagrade u T-labirintu ( $M \pm SEM$ ) štakora iz hipobarične ( $N = 9$  ženki, 12 mužjaka), normobarične ( $N = 9$  ženki, 8 mužjaka) i kontrolne ( $N = 16$  ženki, 14 mužjaka) skupine životinja.

U ovom testu utjecaj spola nije imao statističku značajnost ( $p = 0.1646$ ) iako su ženke imale nešto veći prosječni broj točnih odgovora u odnosu na mužjake ( $4.6 \pm 0.3$  naspram  $4.0 \pm 0.3$ ). Tretman nije imao značajan utjecaj na broj točnih odgovora ( $p = 0.4627$ ). Jedino je utjecaj dana testiranja na broj točnih odabira bio značajan ( $p < 0.0001$ ). Broj točnih odabira s vremenom se povećavao unutar svih skupina. Treći se dan broj točnih odgovora povećao značajno ( $4.3 \pm 0.3$ ) unutar sve tri skupine u odnosu na prva dva dana ( $3 \pm 0.3$  drugi dan i  $2.8 \pm 0.3$  prvi dan) te je četvrti dan bio vrhunac napretka ( $5.6 \pm 0.3$ ). Peti dan eksperimenta došlo je do stagnacije u napretku ( $5.9 \pm 0.3$ ), (Slika 4.7.).

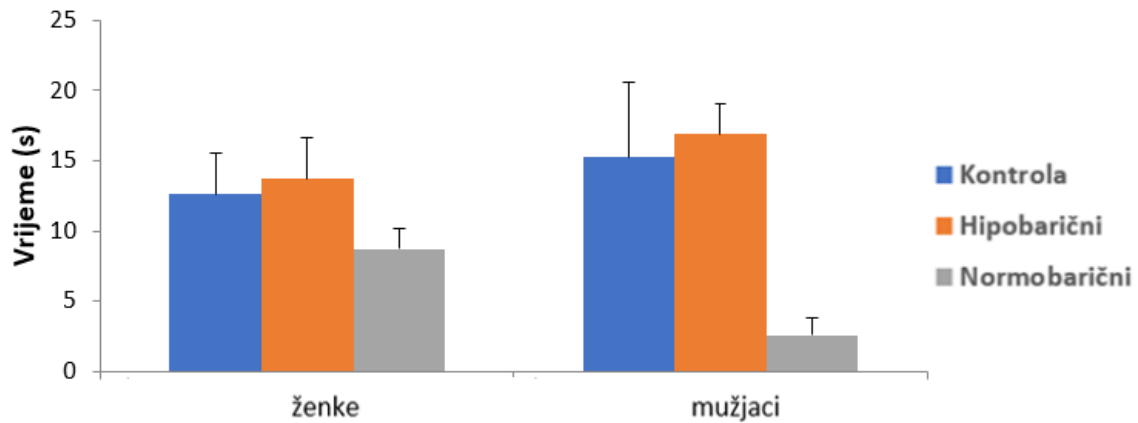
#### 4.4. Test društvenog odabira

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 ( $M \pm SEM$ ) koje su tijekom testa društvenog odabira štakori iz hipobarične ( $N = 9$  ženki, 12 mužjaka), normobarične ( $N = 9$  ženki, 8 mužjaka) i kontrolne ( $N = 16$  ženki, 14 mužjaka) skupine životinja proveli u istraživanju drugog štakora.

Spol ( $p = 0.3407$ ) i tretman ( $p = 0.1242$ ) nisu imali značajan utjecaj na vrijeme provedeno u istraživanju drugog štakora. Normobarični štakori su nešto više vremena proučavali štakora u odnosu na hipobarične ( $108 \pm 9.8$  s naspram  $98 \pm 8.7$  s) i kontrolu ( $108 \pm 9.8$  s naspram  $81 \pm 8.7$  s) iako to nije bilo statistički značajno, stoga možemo reći da se socijabilnost nije promijenila tretmanom (Slika 4.8.).



Slika 4.9. Vrijeme ( $M \pm SEM$ ) koje su tijekom testa društvenog odabira štakori iz hipobarične ( $N = 9$  ženki, 12 mužjaka), normobarične ( $N = 9$  ženki, 8 mužjaka) i kontrolne ( $N = 16$  ženki, 14 mužjaka) skupine životinja proveli u istraživanju drugog štakora proveli u istraživanju predmeta.

Spol nije imao utjecaja na vrijeme provedeno u istraživanju predmeta ( $p = 0.8558$ ). Indikativno ( $p = 0.074$ ) postoji utjecaj tretmana, pri čemu su hipobarični štakori provodili više vremena uz predmet u odnosu na kontrolu ( $14 \pm 2$  s naspram  $10.4 \pm 1.8$  s), a normobarični štakori manje od kontrole ( $7 \pm 2.2$  s naspram  $10.4 \pm 1.8$  s), (Slika 4.9.).

## 5. Rasprava

Za održavanje normalne funkcije mozga ključna je dostupnost optimalne količine kisika. Nedostatak te esencijalne molekule inducira hipoksiju. Hipoksija je stanje smanjene količine kisika u stanicama i tkivima, što ima za posljedicu poremećaj u funkcioniranju organa, sustava i stanica. S obzirom na podrijetlo možemo razlikovati hipobaričnu i normobaričnu hipoksiju. Hipobarična hipoksija popraćena je sniženim tlakom zraka i smanjenom količinom kisika, uvjetima koje možemo naći na visokim nadmorskim visinama, dok se normobarična hipoksija javlja pri smanjenoj količini kisika i normalnom tlaku. Hipoksija se može razviti u bilo kojem dijelu organizma, ali su njeni učinci na stanice SŽS najizraženiji. Akutna epizoda hipoksije može uzrokovati inhibiciju sinaptičke aktivnosti u mnogim regijama mozga. S druge strane, kronična izloženost hipoksiji dovodi do gubitka funkcije neurona, poremećaja svijesti, teškog oštećenja mozga, cerebralne paralize, mentalne retardacije, epilepsije i drugih neurofizioloških poremećaja. Jasno je da posljedice hipoksije na mozak odrasle osobe mogu biti katastrofalne, no i mozak u razvoju je iznimno osjetljiv na oksidativnu ozljedu. Hipoksija u mozgu fetusa utječe na osnovnu strukturu određenih moždanih stanica što dovodi do strukturno-funkcionalnih abnormalnosti u SŽS te može imati dugotrajne posljedice na moždanu funkciju. Česte komplikacije uzrokovane fetalnom hipoksijom su kognitivni deficit, cerebralna paraliza, periventrikularna leukomalacija, epilepsija, intrakranijalno krvarenje i široki spektar funkcionalnih neuroloških oštećenja (Mallard i Vexler, 2015).

Osamdesetih godina prošlog stoljeća istraživanja u Vannuccijevom laboratoriju bila su u velikoj mjeri usmjerena na štakorski model metabolizma energije u mozgu (Vannucci i Vannucci, 2005). Uočen pad u koncentraciji glikogena tijekom anoksije ukazuje na njegov značajan doprinos u opskrbi mozga energijom (Vannucci i Vannucci, 1980). U to vrijeme, unatoč ogromnoj potrebi za istraživanjem patofiziologije perinatalne hipoksije i oštećenja mozga dojenčadi, nije postojao eksperimentalni model. Koristeći izmijenjeni Levinov model, stvoren je prvi model neonatane hipoksije-ishemije (Vannucci i sur., 1999). Na mladuncima štakora sedmog postnatalnog dana provedena je ligacija karotidne arterije nakon koje je uslijedila izloženost sistemskoj hipoksiji (8% kisika) na temperaturi od 37 °C. Sedmog postnatalnog dana mozak štakora histološki je sličan onome od 32.-34. tjedna gestacije ljudskog fetusa, tj. elementi kortikalnih neuronskih krugova imaju slojeviti raspored, germinalni matriks se aktivira, a bijela tvar započinje proces mijelinizacije (Vannucci i Vannucci, 2005). Model se dokazao korisnim za proučavanje kratkoročnih i dugoročnih učinaka hipoksijsko-ishemijskog oštećenja mozga na

motoričke aktivnosti, ponašanje, incidenciju epileptičnih napadaja kao i na sam proces sazrijevanja mozga. Ovaj model, kao i svi ostali animalni modeli koji koriste invazivne kirurške metode, ima svoje negativne strane. Naime, postoje indikacije da stres uzrokovan operacijom i anestezija utječu na konačne rezultate što ukazuje na mogućnost da opažena promjena nije posljedica hipoksije već samog operacijskog zahvata. Nadalje, unatoč širokoj uporabi, stupanj razvoja bijele tvari u štakora za vrijeme HI sedmog postnatalnog dana i vrsta nastale ozljede nisu slični onima u ljudi. Iako neinvazivni modeli nisu tako široko korišteni kao invazivni modeli, imaju svoje prednosti te u nekim slučajevima mogu preciznije oponašati ozljedu ljudskog mozga (Cui i sur., 2013). Za razliku od invazivnih metoda, neinvazivne modele animalne hipoksije karakterizira odsutnost ishemijske procedure. Prisutna je samo hipoksija koja je inducirana pomoću komore za deprivaciju kisika. Uspoređujući stupanj ozljede nastao invazivnim i neinvazivnim metodama došlo se do zaključka da je sama deprivacija kisika dovoljna da uzrokuje oštećenja mozga slična onima nakon HI. Dostupne neinvazivne metode su raznovrsne. Kod štakora se prenatalna hipoksija može postići smještanjem trudnih štakorica u komoru sa smanjenim sadržajem kisika (normobarična komora) i postepenom zamjenom kisika inertnim plinom. Hipoksija se također može proizvesti u hipobaričnoj komori, koja oponaša hipoksiju velike nadmorske visine. Za istraživanje kronične intermitentne hipoksije koristi se intermitentna komora u kojoj se izmjenjuju uvjeti normalne i smanjene količine kisika. Do sada je napravljen mali broj istraživanja koristeći neinvazivne metode i trenutno u literaturi ne postoji opisan usporedni neinvazivni model dugotrajnih posljedica neonatalnom izlaganju hipoksiji u hipobaričnoj i normobaričnoj komori.

U našem istraživanju koristili smo neonatalni model hipoksije. Štakori su izloženi hipoksičnim uvjetima prvog postnatalnog dana što ima svoje prednosti. Naime, rana postnatalna dob štakora odgovara početku trećeg tromjesečja gestacije ljudskog fetusa, kada su hipoksijski insulti najčešći (Volpe, 2018). Osim toga, postnatalni tretman omogućuje razdvajanje mladunaca iz istog legla nasumično na eksperimentalnu i kontrolnu skupinu, čime se eliminira eventualni utjecaj majčinstva na ponašanje mladunaca u bihevioralnim testovima. Imajući na umu već navedene posljedice neonatalne hipoksije na ponašanje, kogniciju i senzomotoriku, ovim eksperimentom htjeli smo utvrditi postoje li promjene u lokomociji, anksioznom, eksploratornom i socijalnom ponašanju te učenju u odraslih štakora izloženih hipoksiji u hipobaričnoj ili normobaričnoj komori dan nakon okota, kao i odgovaraju li te promjene onima uočenima u mladunaca.

Test u otvorenom polju sveobuhvatno procjenjuje razinu lokomotorne aktivnosti kao i nepravilnosti u ponašanju koje mogu biti povezane s lokomocijom. Aktivnost štakora u ovom testu može biti pod utjecajem niza vanjskih čimbenika kao što su poremećaji kognicije, anksioznost, cirkadijalni ritam, ali i bolest.

Iako Bassan i suradnici (2006) u svom radu ukazuju na smanjenu pokretljivost hipoksične skupine u odnosu na kontrolnu skupinu, nekoliko istraživanja ukazuje na to da hipoksija dovodi do hiperaktivnosti. Pojačana lokomocija može ukazivati i na deficit u pamćenju. Isaacson i suradnici (1991) ističu važnost ozljede aksona i dendrita u hipokampusu kao uzrok pojačane hiperaktivnosti u otvorenom polju. Nigrostrijatalni dopaminergični sustav ima ključnu ulogu u lokomociji pa se smatra da je pojačana lokomocija povezana s povećanom količinom dopamina u strijatumu i crnoj tvari. Hiperaktivnost se kompenzira s vremenom, što ukazuje na postojanje dodatnih faktora uz dopaminergični sustav koji su uključeni u regulaciji lokomocije (Cooper i sur., 2015). Do sličnog zaključka dolaze Lubics i suradnici (2005) koji navode da fetalna hipoksija i postnatalna anoksija rezultiraju izvanrednom hiperaktivnošću koja se pojavila u infantilnoj dobi, ali je potisnuta u odrasloj dobi. Slični rezultati dobiveni su i na modelu u našem laboratoriju. Iako je skupina mladunaca izložena hipobaričnoj hipoksiji pokazivala značajno pojačanu lokomociju, u odrasloj dobi razlika između skupina u prijeđenom putu i brzini se izgubila, a ostala je značajna razlika jedino u broju propinjanja.

Propinjanje se definira kao promjena položaja tijela prilikom koje životinja ustaje na stražnje noge. Mnoge životinje se spontano propinju kao odgovor na novu okolinu (glodavci, insektivori, psi, primati). Nije još sasvim jasan razlog zbog kojeg se životinje uzdižu na stražnje noge no postoji više tumačenja ovog ponašanja. Prvo tumačenje se fokusira na postojanje pozitivne korelacije između pojačane lokomocije i pojačanog propinjanja (Zimbardo, 1957). Smatram da u našem slučaju ovo objašnjenje nije valjano jer nema drugih pokazatelja (brzina, vrijeme provedeno u kretanju, prijeđeni put) koji bi ukazivali na to. Drugo objašnjenje je da propinjanje, za razliku od horizontalnog kretanja, odražava i emocionalno stanje (Borta i Schwarting, 2005), stoga se ono tumači kao pokazatelj anksioznosti. Novija istraživanja ukazuju na to da poveznica između pojačanog propinjanja u testu u otvorenom polju i ponašanja u štakorskom modelu anksioznosti ne postoji. Ukoliko se životinje najviše propinju na rubnim dijelovima aparature takvo ponašanje može sugerirati i želju za bijegom. Uočeno je i da strah djeluje kao inhibitor propinjanja (Bual, 2015). U našem istraživanju nema indikacije da je pojačano propinjanje pokazatelj anksioznosti s obzirom da u testu na ploči s rupama nema promjena.

Posljednja interpretacija propinjanja povezana je sa skupljanjem podataka, mapiranjem prostora, stvaranjem novih i nadogradnjom postojećih prostornih mapa u hipokampusu (Burton, i sur., 2006). Hipokampalna formacija (hipokampus, dentatni girus i subikulum) je ključan dio živčanog sustava odgovoran za propinjanje u novim okruženjima. Propinjanje može potencijalno biti korišteno za skladištenje, učvršćivanje i dohvaćanje spremljenih informacija o prostornom rasporedu. Intuitivno, ovaj oblik ponašanja štakora u otvorenom polju sugerira rutinu prikupljanja informacija s nove točke gledišta od one dobivene na razini podloge. Vizualne, olfaktorne i auditorne informacije postaju dostupne životinji tijekom samostalnog propinjanja, dok potpomognuto propinjanje (uza zid) pruža somatosenzorne podatke. Naše istraživanje se nije fokusiralo na razliku između potpomognutog podizanja i samostalnog propinjanja (anksiozno ponašanje) koji u podlozi imaju drugačije genske i neuralne mehanizme (Borta i Schwarting, 2005). U našem istraživanju uočili smo povećanu učestalost propinjanja normobaričnih štakora, a još više hipobaričnih štakora u odnosu na kontrolu, koje se zadržalo do odrasle dobi. Moguće je da tretirane životinje imaju smanjeni kapacitet pamćenja prostora pa se moraju češće uzdignuti na stražnje noge kako bi zapamtile novu informaciju.

Nakon žrtvovanja, u mozgu mladunaca normobaričnih štakora je izmjerena razina monoaminskih neurotransmitera te je uočena povećana koncentracija dopamina u moždanom deblu u odnosu na kontrolne štakore (neobjavljeni rezultati). Poznato je da hipokampus, ključna struktura u procesu prostornog pamćenja, dobiva modulatorni *input* dopamina iz moždanog debla. S obzirom na promijenjene razine dopamina moguće je da je propinjanje najprije vezano uz pamćenje i procesiranje prostora.

Testiranje na ploči s rupama eksperimentalna je metoda koja ima čestu upotrebu u mjerenju anksioznosti i neofilije. Neofilija, odnosno sklonost prema novome, bitna je kod štakora koji posjeduju urođenu težnju ka istraživanju novog prostora u kojem se nađu. Na ploči s rupama štakori zabadaju glavu u rupe u podu testnog aparata, što predstavlja eksploratorno ponašanje. Životinje kao što su štakori imaju prirodnu averziju prema velikom, osvjetljenom, nezaštićenom i potencijalno opasnom prostoru te zbog toga preferiraju rupe uz stijenke aparature (tzv. vanjske rupe). Ponašanje štakora pokazuje sukob između sklonosti istraživanju nove okoline i straha od iste. Povećana anksioznost rezultira smanjenom lokomocijom i manjem broju posjeta unutarnjim rupama (Geyer i sur., 2012). S druge strane, neofobija, strah od novoga, prirođena je u štakora i štiti ih od mogućih nepovoljnih posljedica znatiželje. Geyer i suradnici (2012) primjećuju da hipoksični štakori velikom brzinom pronalaze sigurnost uz stijenku aparature, dok kontrolni štakori ostaju u središtu gdje su i ostavljeni. Normobarični štakori pokazuju veću

nevoljkost istraživanja nove okoline s obzirom na kontrolu (Álvarez i sur., 2017). U našem istraživanju, normobarični mladunci pokazivali su smanjenu, a hipobarični mladunci povećanu razinu eksploratornog ponašanja, no te su se razlike u odrasloj dobi izgubile, što znači da tijekom sazrijevanja dolazi do kompenzacije sustava koji reguliraju ovaj aspekt ponašanja.

Rezultati dobiveni u našem istraživanju također pokazuju značajnu razliku u ukupno prijeđenoj udaljenosti, vremenu provedenom u kretanju i brzini te ukupnom broju posjećenih rupa s obzirom na spol. Naime, ženke štakora prošle su veću udaljenost te su se kretale duže i dvostruko brže, a posjetile su i veći broj rupa, što ukazuje na povećanu lokomotornu i eksploratornu aktivnost, kako u mladunačkoj, tako i u odrasloj dobi. To ukazuje na moguću ulogu spolnih hormona u regulaciji neuronskih krugova koji posreduju kretanje i/ili eksploraciju.

Tretirane skupine životinja nisu se razlikovale od kontrolne skupine u postotku posjećenosti unutarnjih rupa, niti kao mladunci, niti kao odrasle jedinke, što ukazuje na nepromijenjenu razinu anksioznosti. Razlike također nije bilo ni među spolovima.

T-labirint je test kojim se ispituje prostorno učenje i radna memorija štakora. Ovaj test se temelji na jednostavnoj poveznici da kada je odgovor nagrađen, postoji tendencija za njegovim ponavljanjem. Istraživanje u Morrisovom vodenom labirintu pokazuje da štakori izloženi kroničnoj hipoksiji ne pokazuju razliku u učenju u odnosu na kontrolu (Bitar i sur., 2005), dok druga istraživanja ukazuju na značajne poteškoće u pamćenju pozicije hrane kod hipoksičnih štakora (Álvarez i sur., 2017). Poteškoće u prostornom pamćenju mogle bi se pripisati neurokemijskim promjenama kolinergičnih neurona u hipokampusu (Nyakas i sur., 1995). Rezultati dobiveni u našem istraživanju ne ukazuju na razliku u spolu i tretmanu, ali je uočena razlika u sposobnosti pamćenja mladih i odraslih štakora. S vremenom se broj točnih odabira povećavao u obje dobne skupine no kod odraslih štakora dolazi do stagnacije i četvrti dan oni dosežu maksimum, dok mlade životinje peti dan pamte bolje nego četvrti.

Test društvenog odabira fokusira se na odabir socijalne interakcije nad istraživanjem neživog predmeta. U literaturi je objavljeno da su štakori izloženi normobaričnoj neonatalnoj hipoksiji pojačano istraživali predmet. Iako suptilna, ova promjena u ponašanju ukazuje na to da hipoksija može imati ključnu ulogu u razvitku socijalnog povlačenja i neofobije koji su uobičajeni simptomi pronađeni u shizofreniji i autizmu (Adriani i sur., 2004). U našem istraživanju nije uočena razlika među spolovima u vremenu provedenom u istraživanju predmeta. Iako hipobarični štakori provode više vremena s predmetom u odnosu na kontrolu, a



normobarični manje od kontrole, što može eventualno ukazivati na prisutnost različitih mehanizama u normobaričnoj, odnosno hipobaričnoj hipoksiji, razlika u obje skupine u odnosu na kontrolu nije bila značajna.

Rezultati ovog rada ukazuju na to da se neke promjene u ponašanju, nastale kao posljedica izloženosti mozga u razvoju smanjenim koncentracijama kisika, kompenziraju tijekom odrastanja, dok druge ostaju (dugo)trajno prisutne. Još uvijek smo daleko od potpunog razumijevanja svih čimbenika koji oblikuju individualni razvoj postnatalno. Potrebna su daljnja istraživanja prenatalne i neonatalne hipoksije koja će omogućiti dublji uvid u mehanizme ozlijede. Stoga bi se istraživanja moderne perinatalne medicine trebala temeljiti na pronalaženju novih kvalitetnih dijagnostičkih testova i novih preventivnih strategija kako bi se omogućila rana dijagnoza potencijalno ugroženih fetusa i time preveniralo oštećenje mozga i njegove dugoročne posljedice na zdravlje djeteta.

## 6. Zaključak

Rezultati ovog rada ukazuju na to da se neke promjene u ponašanju, nastale kao posljedica izloženosti mozga u razvoju smanjenim koncentracijama kisika, kompenziraju tijekom odrastanja, dok druge ostaju (dugo)trajno prisutne:

1. Značajne razlike u lokomociji i eksploratornom ponašanju, koje su uočene u skupini hipoksičnih mladunaca, u odnosu na kontrolnu skupinu, nisu se zadržale u odrasloj dobi. Pretpostavljamo da je tijekom odrastanja došlo do kompenzacije sustava koji reguliraju ovaj aspekt ponašanja.
2. Značajno povećani broj propinjanja, koji je uočen u skupinama hipoksičnih mladunaca u odnosu na kontrolnu skupinu, zadržao se i u odrasloj dobi. Moguće je da je uočena pojava vezana uz pamćenje i procesiranje prostora posredovano dopaminom.
3. Između hipoksičnih i kontrolne skupine nije uočena razlika u učenju te u anksioznom i društvenom ponašanju niti u mladunačkoj, niti u odrasloj dobi.
4. Ženke su zadržale značajno povećan stupanj lokomocije i eksploratornog ponašanja u odnosu na mužjake i u odrasloj dobi, što ukazuje na moguću ulogu spolnih hormona u regulaciji neuronskih krugova koji posreduju kretanje i/ili eksploraciju.

## 7. Literatura

- Abbott, A. C., Inestrosa, N. C. & Iturriaga, R., 2014. Chronic hypoxia induces the activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and stimulates hippocampal neurogenesis in wild-type and APP<sup>swe</sup>-PS1 $\Delta$ E9 transgenic mice in vivo. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **8**, pp. 1-9.
- Adriani, W., Aloe, L. & Alleva, E., 2004. Social withdrawal, neophobia, and stereotyped behavior in developing rats exposed to neonatal asphyxia. *Psychopharmacology*, **175**, pp. 196-205.
- Agarwal, Y., Gupta, R., Kaul, B. & Kumar, M., 2016. Recognizing Ulegyria—The Lesser Known form of Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *Astrocyte*, **2**, pp. 209.
- Aguirre, A., Borok, E., Gallo, V. & Horvath, T. L., 2012. Oligodendrocyte regeneration after neonatal hypoxia requires FoXo1-mediated p27kip1 expression. *Journal of Neuroscience*, **32**, pp. 14775-14793.
- Álvarez, A., Arteaga, O. & Hilario, E., 2017. Docosahexaenoic Acid Reduces Cerebral Damage and Ameliorates Long-Term Cognitive Impairments Caused by Neonatal Hypoxia–Ischemia in Rats. *Molecular Neurobiology*, **54**, pp. 7137-7155.
- Anand, K. S., Clancy, B., Finlay, B. L. & Darlington, R. B., 2007. Extrapolating brain development from experimental species to humans. *NeuroToxicology*, **28**, pp. 931-937.
- Applegate, C. D., Belin, T. R. & Burchfiel, J. L., 1991. Epileptogenic effect of hypoxia in the immature rodent brain. *Annals of Neurology*, **29**, pp. 629-637.
- Arteni, N. S., Achaval, M. & Netto, C. A., 2003. Selective and long-term learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats. *Brain Research*, **118**, pp. 171-178.
- Ashmarin, I. P., Goncharenko, N. E. & Krushinskaya, Y. J., 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.
- Avanzini, G., Battaglia, G. & Chiapparini, L., 2003. Epileptic and imaging findings in perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy with ulegyria. *Epilepsy Research*, **55**, pp. 235-243.
- Banerjee, P. K. i dr., 2006. Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain. *Neurochemistry International*, **49**, pp. 709-716.
- Barwood, M., Corbett, J. & Costello, J., 2017. Effect of acute hypoxia on cognition: A systematic review and meta-regression analysis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **74**, pp. 225-232.
- Basovich, S. N., 2010. The role of hypoxia in mental development and in treatment of mental disorders. *BioScience*, **4**, pp. 288-296.
- Bassan, H., Gozes, I. & Harel, S., 2006. NAP enhances neurodevelopment of newborn apolipoprotein E-deficient mice subjected to hypoxia. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **319**, pp. 332.-339.

- Benna, P., Bergamasco, B., Ferrero, P. & Gavinelli, R., 1984. Neonatal Hypoxia and Epileptic Risk: A Clinical Prospective Study. *Epilepsia*, **25**, pp. 131-136.
- Bennet, L. & Gunn, A. J., 2009. Fetal Hypoxia Insults Animal Models Injury: Insights from and Patterns of Brain. *Clinics in Perinatology*, **36**, pp. 579-593.
- Bitar, F. F., Daderian, R. H. & El Sabban, M., 2005. Long-term effects of acute and of chronic hypoxia on behavior and on hippocampal histology in the developing brain. *Developmental Brain Research*, **157**, pp. 98-102.
- Bo, L., Dingyu, H., Rongji, D. & Qin, L., 2009. Normobaric Hypoxia-induced Brain Damage and Mechanism in Wistar Rat. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, **2**, pp. 632-636.
- Borta, A. & Schwarting, R. K., 2005. Inhibitory avoidance, pain reactivity, and plus-maze behavior in Wistar rats with high versus low rearing activity. *Physiology and Behavior*, **84**, pp. 387-396.
- Bual, J. L., 2015. Rearing and Breeding Laboratory Rodents. *Developmental Biology*, **1**, pp. 1-7.
- Burton, S., Lever, C. & O'Keefe, J., 2006. Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. *Reviews in the Neurosciences*, **17**, pp. 111-133.
- Busl, K. M. & Greer, D. M., 2010. Hypoxic-ischemic brain injury: Pathophysiology, neuropathology and mechanisms. *Neuro Rehabilitation*, **26**, pp. 5-13.
- Cai, Z., Fan, Lir Wan & Lei, M., 2005. Hypoxia-ischemia induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat. *Behavioural Brain Research*, **165**, pp. 80-90.
- Clancy, B., Darlington, R. B. & Finlay, B. L., 2001. Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience*, **105**, pp. 7-17.
- Cooper, J. M., Chong, W. & Deanfield, J., 2015. Neonatal hypoxia, hippocampal atrophy, and memory impairment: Evidence of a causal sequence. *Cerebral Cortex*, **25**, pp. 1469-1476.
- Coper, Helmut & Jänicke, B., 1994. The effects of prenatal exposure to hypoxia on the behavior of rats during their life span. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **48**, pp. 863-873.
- Cui, H., Ding, Y. & Yang, L., 2013. Creating rat model for hypoxic brain damage in neonates by oxygen deprivation. *PLoS ONE*, **8**, pp. 1-14.
- Dermentzoglou, V., Nikas, I., Theofanopoulou, M. & Theodoropoulos, V., 2008. Parasagittal Lesions and Ulegyria in Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: Neuroimaging Findings and Review of the Pathogenesis. *Journal of Child Neurology*, **23**, pp. 51-58.
- Dubrovskaya, N. M. & Zhuravin, I. A., 2010. Ontogenetic Characteristics of Behavior in Rats Subjected to Hypoxia on Day 14 or Day 18 of Embryogenesis. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, **40**, pp. 231-238.
- Erecinska, M. & Silver, I. A., 2001. Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respiration Physiology*, **128**, pp. 263-276.

- Ferriero, D. M. & Sheldon, R. A., 1996. A rat model for hypoxic-ischemic brain damage in very premature infants. *Biol Neonate*, **69**, pp. 27–41.
- Geyer, M. A., Halberstadt, A. L. & Masten, V. L., 2012. Four factors underlying mouse behavior in an open field. *Behavioural Brain Research*, **233**, pp. 55-61.
- Giussani, D. A., 2016. The fetal brain sparing response to hypoxia: Physiological mechanisms. *Journal of Physiology*, **594**, pp. 1215-1230.
- Goldstein, M., Hopkins, R. O. & Kesner, R. P., 1995. Item and order recognition memory in subjects with hypoxic brain injury. *Brain and Cognition*, **27**, pp. 180-201.
- Greer, D. M., 2006. Mechanisms of Injury in Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: Implications to Therapy. *Seminars in Neurology*, **26**, pp. 373-379.
- Hoskote, A., Schiller, R. & Verhulst, F., 2018. Memory deficits following neonatal critical illness: a common neurodevelopmental pathway. *The Lancet Child and Adolescent Health*, **2**, pp. 281-289.
- Hristova, M. & Rocha-Ferreira, E., 2016. Plasticity in the neonatal brain following hypoxic-ischaemic injury. *Neural Plasticity*, **2016**, pp. 1-17.
- 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.
- Ikeda, T., Iwasaki, K. & Ikenoue, T., 2001. Selective and long-term learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats. *Behavioural Brain Research*, **118**, pp. 17-25.
- Isaacson, R., Smotherman, W. & Shen, Y., 1991. The behavioral and anatomical effects of prenatal umbilical cord clamping in the rat and their alteration by the prior maternal administration of nimodipine. *Restorative Neurology and Neuroscience*, **3**, pp. 11-22.
- Ishida, A., Johnston, M. V. & Trescher, W. H., 2001. The Developing Nervous System: A Series of Review Articles: Neurobiology of Hypoxic-Ischemic Injury in the Developing Brain. *Pediatric research*, **49**, pp. 735.-741.
- Kaczorowski, J. A., Knopik, V. S. & McGeary, J. E., 2016. Pre- and Perinatal Ischemia-Hypoxia, the Ischemia-Hypoxia Response Pathway, and ADHD Risk. *Behavior Genetics*, **3**, pp. 467-477.
- Kolb, B. & Whishaw, I. Q., 2009. *An introduction to brain and behavior. Third Edit.* Worth Publishers, New York
- Krizman, M., 2019. Posljedice neonatalne hipoksije na ponašanje štakora. Diplomski rad. Prirodoslovno - matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- Lubics, A., Reglodi, D. & Szalai, M., 2005. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic–ischemic injury. *Behavioural Brain Research*, **157**, pp. 157-165.
- Mallard, C. & Vexler, Z. S., 2015. Modeling ischemia in the immature brain: How translational are animal models?. *Stroke*, **46**, pp. 3006-3011.

- Milot, M. & Plamondon, H., 2008. Ischemia-induced hyperactivity: Effects of dim versus bright illumination on open-field exploration and habituation following global ischemia in rats. *Behavioural Brain Research*, **192**, pp. 166-172.
- 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.
- Nyakas, C., Buwalda, B. & Luiten, P., 1995. Hypoxia and brain development. *Progress in Neurobiology*, **49**, pp. 1-51.
- Pleša, I., 2017. Fetalna hipoksija i perinatalno oštećenje mozga. Diplomski rad. Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- Predojević, M. & Tomasović, S., 2015. Neurorazvojni poremećaji i mogućnost njihovog prenatalnog probira. *Acta Med Croatica*, **69**, pp. 415-420.
- Rumajogee, P., 2018. Exogenous Neural Precursor Cell Transplantation Results in Structural and Functional Recovery in a Hypoxic-Ischemic Hemiplegic Mouse Model. *eNeuro*, **5**, pp. 1-34.
- Stipan, M., 2020. Utjecaj neonatalne hipoksije u hipobaričnim uvjetima na ponašanje mladunaca štakora. Diplomski rad. Prirodoslovno - matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- Vannucci, R. & Vannucci, S., 2005. Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model. *Dev Neurosci*, **27**, pp. 1-6.
- Vannucci, R. C., Palmer, C. & Mauger, D., 1999. Rat Model of Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Damage. *Journal of Neuroscience Research*, **55**, pp. 158-163.
- Vannucci, R. C. & Vannucci, S. J., 2001. Effect of extreme hypercapnia on hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Pediatric research*, **49**, pp. 799-803.
- Vannucci, R. C. & Vannucci, S. J., 1980. Glycogen metabolism in neonatal rat brain during anoxia and recovery. *Journal of Neurochemistry*, **34**, pp. 1100-1105.
- Volpe, J. J., 2018. *Neurology of the newborn. Sixth Edit.* Elsevier, Philadelphia
- Yager, J. Y., 2004. Animal Models of Hypoxic-Ischemic Brain Damage in the Newborn. *Seminars in Pediatric Neurology*, **11**, pp. 31-46.
- Zimbardo, P. B., 1957. Effects of "Free-Environment" Rearing Upon Exploratory Behavior. *Psychological Reports*, **13**, pp. 589.

## 8. Životopis

### OSOBNİ PODACI

Ime i prezime: Ivona Kološnjaj

Datum i mjesto rođenja: 09.08.1995., Zagreb

### ŠKOLOVANJE

2010. - 2014. Prirodoslovno- matematička Peta gimnazija, Zagreb

2014. - 2017. Prediplomski studij biologije, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu; Tema završnog rada: Utjecaj prirodnih pripravaka na regeneraciju kože čovjeka

2017. - 2020. Diplomski studij eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

### RADNO ISKUSTVO

studeni 2016. – veljača 2017. Studentska praksa Laboratorij za histologiju i histokemiju, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu - Histološke i histokemijske metode, obrada životinjskog tkiva

prosinac 2019. Erasmus+ tečaj osposobljavanja (TC) Sigulda, Latvija

- proučavanje utjecaja plastike na okoliš i živi svijet

### ZNANJA I VJEŠTINE

Rad na računalu: osnovno znanje korištenja alata MS office

Strani jezici: Engleski – C2

### DODATNE INFORMACIJE

Sudjelovanje na manifestaciji „Noć biologije“ 2016., 2017. i 2018.

Članstva

Član udruge studenata biologije BIUS, sekcija za proučavanje kukaca 2014. - 2015.