

Utjecaj akutne neonatalne hipoksije na razinu katekolamina u moždanom deblu mladih štakora

Košić, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:217:152000>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Kristina Košić

**Utjecaj akutne neonatalne hipoksije na razinu
katekolamina u moždanom deblu mladih
štakora**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

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 HlIM Medicinskog fakulteta u Zagrebu te izolaciju moždanih regija za daljnje molekularne i analize ekspresije gena u moždanom tkivu, izvela je Sara Trnski, dr.vet.med. temeljem projekta HrZZ „Razvoj karijere doktoranda" (DOK 2018-01-3771) pod mentorstvom prof.dr.sc. Nataše Jovanov Milošević u okviru projekata „Eksperimentalna i klinička istraživanja hipoksijsko-ishemijskog oštećenja mozga u perinatalnoj i odrasloj dobi", (KK.01.1.1.01.0007HRZZ) i „Moždani izvanstanični matriks u razvitku i perinatalnoj hipoksiji" (IP-2019- 04-3182).

Svi in vivo pokusi i uzorkovanja na životinjama za navedena istraživanja odobreni su 2019. od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta (Ur.br. 380-59-10106-19-111/210) i Etičkog povjerenstva za zaštitu životinja koje se koriste u znanstvene svrhe Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (EP231/2019; UP/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 molekularne biologije.

Od srca zahvaljujem mojoj mentorici, Prof. dr. sc. Dubravki Hranilović i dragoj asistentici Barbari Nikolić, mag. exp. biol., najprije na prilici i povjerenju, a zatim i na vrijednim savjetima, prenesenom znanju i ljubavi prema znanosti, uloženom vremenu i divnim zajedničkim trenucima.

Vaš ću primjer pratiti na svom znanstvenom putu!

Veliko hvala i uvaželim članovima povjerenstva za diplomski ispit, Izv. prof. dr. sc. Maji Matulić, Doc. dr. sc. Sari Essert i Doc. dr. sc. Sofiji Ani Blažević.

Želim zahvaliti i mojim roditeljima, Edi i Meri, na usađenoj ljubavi prema prirodoslovlju, braći Alojziju, Davidu i Albertu te sestri Esteri na prvim zajedničkim koracima u otkrivanju biljnog i životinjskog svijeta, kao i Marku i njegovoj divnoj obitelji na velikoj podršci te vrijednoj pomoći prilikom izrade ovog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj akutne neonatalne hipoksije na razinu katekolamina u moždanom deblu mladih štakora

Kristina Košić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Fetalna hipoksija je stanje koje karakterizira smanjena koncentracija kisika važnog za normalnu fiziološku funkciju tkiva te normalan razvoj fetusa. Posljedice smanjene koncentracije kisika očituju se kroz razne neurološke poremećaje kao što su motoričke smetnje, autonomna disfunkcija, epilepsija, poremećaj pamćenja i pažnje. S obzirom na ulogu katekolamina u regulaciji adaptivnih ponašanja svojstvenih svim sisavcima, dopaminergički i noradrenergički neuronski krugovi mogli bi predstavljati mehanizam kojim hipoksija utječe na spomenute neurološke poremećaje. Cilj ovog rada jest analizirati utjecaj neonatalne izloženosti štakora kratkotrajnoj akutnoj hipoksiji na koncentraciju katekolamina u moždanom deblu u adolescentnoj dobi. Koncentracija katekolamina je određena pomoću komercijalnog kompleta enzimskog imunotesta na čvrstoj fazi (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA). Životinje iz hipoksične skupine imale su značajno povišenu koncentraciju dopamina u moždanom deblu, dok se koncentracija noradrenalina nije promijenila u odnosu na kontrolnu skupinu. Rezultati istraživanja pokazuju da neonatalna izloženost blagoj prolaznoj hipoksiji dugoročno narušava homeostazu dopamina.

(36 stranica, 11 slika, 6 tablica, 68 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: dopamin, noradrenalin, ELISA, hipokampus, talamus, poremećaji ponašanja

Voditelj: Prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

Neposredni voditelj: Barbara Nikolić, mag. biol. exp.

Ocjenitelji: Prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

Izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

Doc. dr. sc. Sara Essert

Rad prihvaćen: 15. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

Effect of acute neonatal hypoxia on the brainstem catecholamine levels in young rats

Kristina Košić

Rooseveltova trg 6, 1000 Zagreb, Croatia

Fetal hypoxia is a condition characterized by a reduced concentration of oxygen essential for normal physiological tissue function and normal fetal development. The consequences of the decreased oxygen supply are manifested through various neurological disorders such as motor disorders, autonomic dysfunction, epilepsy, memory, and attention disorders. Knowing the role of catecholamines in the inherited adaptive behavioural regulations of all mammals, dopaminergic and noradrenergic neuronal pathways could represent the mechanism by which hypoxia affects the aforementioned neurological disorders. This study aimed to analyze the effect of neonatal exposure to short-term acute hypoxia on the brainstem catecholamine levels in young rats. Catecholamine concentration has been determined using a commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA kit. Animals in the hypoxic group had significantly increased concentrations of the brainstem dopamine, while the concentration of norepinephrine did not change compared to the control group. The results of the research show that neonatal exposure to mild transient hypoxia leads to a long-lasting disruption of dopamine homeostasis.

(36 pages, 11 figures, 6 tables, 68 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: dopamine, norepinephrine, ELISA, hippocampus, thalamus, behavioral disorders

Supervisor: Dr. Dubravka Hranilović, Prof.

Assistant supervisor: Barbara Nikolić, research assistant

Reviewers: Dr. Dubravka Hranilović, Prof.

Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof.

Dr. Sara Essert, Asst. Prof.

Thesis accepted: 15 September 2021

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1. Hipoksija.....	1
1.1.1. Perinatalna hipoksija u ljudi	1
1.1.2. Animalni model hipoksije.....	3
1.2. Katekolamini.....	4
1.2.1. Dopamin	7
1.2.1.1. Dopaminergički receptori	7
1.2.1.2. Dopaminergički neuronski putevi u mozgu	9
1.2.2. Noradrenalin.....	11
1.2.2.1. Noradrenergički receptori.....	11
1.2.2.2. Noradrenergički neuronski putevi u mozgu.....	13
2. Cilj istraživanja	14
3. Materijali i metode.....	15
3.1. Materijali.....	15
3.1.1. Uzorci tkiva	15
3.1.2. Tehnička pomagala i pribor	15
3.1.3. Otopine, kemikalije i kompleti	16
3.2. Metode.....	16
3.2.1. Žrtvovanje i uzimanje uzoraka moždanog debla	16
3.2.3. Određivanje koncentracije dopamina i noradrenalina metodom ELISA	17
3.2.4. Analiza i statistička obrada podatak	18
4. Rezultati.....	19
4.1. Određivanje optimalne početne količine uzorka.....	19
4.2. Određivanje koncentracije katekolamina u moždanom deblu.....	22
4.3. Usporedba koncentracija katekolamina u moždanom deblu između eksperimentalne i kontrolne skupine štakora	25
5. Rasprava	27
6. Zaključak.....	30
7. Literatura	31
8. Životopis.....	36

POPIS KRATICA

AC, adenilat ciklaza

ADHD, engl. *attention deficit hyperactivity disorder*

ADP, adenozin difosfat

ATP, adenozin trifosfat

BDNF, engl. *brain derived neurotrophic factor*

COMT, katekol-O-metiltransferaza

CRE, engl. *cAMP response element*

CREB, engl. *cAMP-response element binding protein*

DA, dopamin

DAG, diacilglicerol

DAT, transporter dopamina

DNS, dorzalni noradrenergički snop

ELISA, engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

Epac, engl. *exchange protein directly activated by cAMP*

ERK, engl. *extracellular signal-regulated kinases*

GP, glikogen fosforilaza

GPCR, engl. *G protein-coupled receptor*

HVA, homovanilna kiselina

IEG, engl. *Immediate early gene*

IP3, inozitol-1,4,5trifosfat

LC, *locus coeruleus*

M, engl. *mean*

MAO-A, monoamin oksidaza

MHPG, 3-metoksi-4-hidroksifenilglikol

NA, noradrenalin

NET, noradrenergički transporter

PIP2, fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat

PKA, protein kinaza A

PLC, fosfolipaza C

PND, postnatalni dan

SEM, engl. *standard error of mean*

SN, *substantia nigra*

SŽS, središnji živčani sustav

TF, transkripcijski faktor

TH, tirozin hidroksilaza

VMA, vanilimandelična kiselina

VMAT, vezikularni monoaminski transporter

VNS, ventralni noradrenergički snop

VTA, ventralni tegmentum

1. Uvod

1.1. Hipoksija

U životu aerobnih organizama, kisik zauzima središnju ulogu. On je konačni akceptor elektrona u procesu oksidativne fosforilacije što omogućuje stvaranje stanične energije u obliku adenozin trifosfata (ATP). U normoksičnim uvjetima (21% O₂) stanice održavaju stabilan omjer ATP/ADP, a svaka promjena navedenog omjera, izazvana vanjskim ili unutarnjim čimbenicima, ima za posljedicu narušenu homeostazu stanica i tkiva. Takvo se fiziološko stanje naziva hipoksija (Lopez-Barneo i sur., 2001).

Sam odgovor na hipoksiju je raznolik. Dok neka tkiva mogu duže tolerirati određene oblike hipoksije, tkiva poput moždanog bivaju teže oštećena kratkom deprivacijom kisika. Hipoksija središnjeg živčanog sustava (SŽS) jedna je od najčešćih komplikacija izazvana oslabljenom cirkulacijom i metabolizmom mozga koja može utjecati na životinje i ljude u različitim fazama života. Mozak fetusa posebno je osjetljiv na hipoksiju i oksidativni stres zbog iznimno velike potrošnje kisika, zaliha glukoze, visokog udjela lipida, a relativno niske koncentracije i aktivnosti antioksidativnih enzima (Stockwell i sur., 2017). Neadekvatna obrana fetusa od akutne ili kronične hipoksije promovira razvoj perinatalne hipoksijsko-ishemijske ozljede mozga što može dovesti do ozbiljnih neuroloških oštećenja ili pak smrti (Gunn i Bennet, 2009).

1.1.1. Perinatalna hipoksija u ljudi

Razdoblje prenatalnog razvoja i ranog postnatalnog života izuzetno su važni za formiranje moždanih struktura koje će biti uključene u mnoge kognitivne funkcije kao što su učenje i pamćenje, te oblikovanje životnih iskustava i karaktera pojedinaca (Babenko i sur., 2015; Desplats, 2015). Bilo kakav poremećaj u tom periodu mogao bi rezultirati kompromitiranim umrežavanjem neurona i očitovati se kroz razne neurološke deficite koji uključuju motoričke smetnje, autonomnu disfunkciju, epilepsiju, poremećaj pamćenja i pažnje (Buller i sur., 2008).

Perinatalna hipoksija je stanje koje karakterizira smanjena koncentracija kisika važnog za normalnu fiziološku funkciju tkiva te normalan razvoj fetusa. Upravo je perinatalna hipoksija vodeći uzrok prenatalne i novorođenačke smrti u svijetu od čak 23% (Silvestro i sur., 2020). Fetalna je hipoksija povezana s različitim majčnim, placentalnim i fetalnim stanjima koja se mogu

različito manifestirati i imati različite ishode. Kingdom i Kaufmann (1997) su predložili klasificiranje fetalne hipoksije u 3 podtipa: (1) preplacentalna hipoksija, pri čemu su i majka i fetus hipoksični (velika nadmorska visina, cijanotična bolest majke itd.); (2) uteroplacentalna hipoksija, gdje je majčina oksigenacija normalna, ali je uteroplacentalna cirkulacija oslabljena (npr. preeklampsija, insuficijencija posteljice itd.); (3) postplacentalna hipoksija, gdje je samo fetus hipoksičan. Procesom evolucije, stanice i organi fetusa razvili su nekoliko kompenzacijskih odgovora na hipoksiju pa se tako pod smanjenom opskrbbom kisika, protok krvi iz drugih organa drastično preraspodjeljuje u mozak i srce, za 90% - 240% (Richardson i sur., 1996). Međutim, ti sustavi obrane i tolerancije ponekad nisu dovoljni da zaštite mozak u razvoju (Gunn i Bennet, 2009). Posljedice i klinički simptomi hipoksijsko-ishemijske ozljede, ovisno o vremenu nastanka, jačini i lokalizaciji, mogu biti raznoliki - od minimalne cerebralne disfunkcije i poremećaja ponašanja do teške mentalne retardacije, cerebralne paralize i epilepsije (Himmelmann i sur., 2007). Drugim riječima, reakcija fetalnog mozga na akutnu i kroničnu hipoksiju ima različite temeljne mehanizme što rezultira različitim fenotipskim pokazateljima (Pearce, 2006).

Akutne epizode hipoksije mogu trajati nekoliko minuta, a javljaju se kao rezultat kontrakcije maternice, kompresije pupkovine, abrupcije posteljice, teškog krvarenja prije poroda ili višestruke trudnoće (Giussani, 2015). Zbog ovisnosti ionskih kanala o ATP-u, ovakav oblik hipoksije značajno mijenja ionsku homeostazu (Peers, 2002). Dakle, akutna hipoksija inhibicijom stanične aktivnosti doprinosi blagoj cerebralnoj disfunkciji (de Vries i Groenendaai, 2010). S druge strane, period kronične fetalne hipoksije može trajati od nekoliko dana pa do nekoliko mjeseci. Uzroci su povezani s raznim komplikacijama u trudnoći, uključujući pušenje i respiratorne bolesti majke, preeklampsiju ili bilo koja upalna stanja tijekom trudnoće, poput korioamnionitisa (infekcija koriona i amniona), gestacijskog dijabetesa ili čak pretilosti majke (Giussani, 2015). Zbog gubitka funkcije stanica, u ovome slučaju dolazi do poremećaja u procesu stvaranja novih interakcija između neurona i širenja neuronskih potencijala što rezultira smanjenim adaptivnim potencijalom i plastičnošću mozga, posebice u korteksu i hipokampusu. Klinički se ovakvo stanje očituje cerebralnom paralizom, mentalnom retardacijom, epilepsijom i drugim neurofiziološkim poremećajima (Himmelmann i sur., 2007; Nalivaeva i sur., 2018).

1.1.2. Animalni model hipoksije

Za bolje razumijevanje etiologije i patogeneze različitih poremećaja i stanja, pa tako i hipoksije, primjenjuju se brojni farmakološki i bihevioralni pristupi. Unatoč intenzivnom istraživanju i akumuliranju značajnih količina eksperimentalnih podataka, mnogi molekularni i biokemijski mehanizmi odgovora na hipoksiju, koji bi doprinijeli razvoju medicinske terapije, još uvijek nisu razumljivi. Istraživanjima značajno doprinose razni animalni modeli, a jedan od češćih je animalni model štakora. Primjena štakora (lat. *Rattus norvegicus*) u znanstvenim istraživanjima datira još iz 19. stoljeća, čineći tako štakora prvim pripitomljenim sisavcem u svrhu laboratorijskih istraživanja. U odnosu na druge životinje, štakor, kao model ljudskih bolesti u neuroznanstvenim istraživanjima, nudi niz anatomskih i bihevioralnih prednosti. Upravo rani postnatalni razvoj mozga štakora odgovara razvoju mozga u drugom i trećem tromjesečju gestacije ljudskog fetusa što štakorski mozak čini itekako prikladnim za proučavanje, tim više što u tom periodu kisik postaje neophodan za normalni rast i razvoj fetusa (Hutter i sur., 2010; Volpe, 2018).

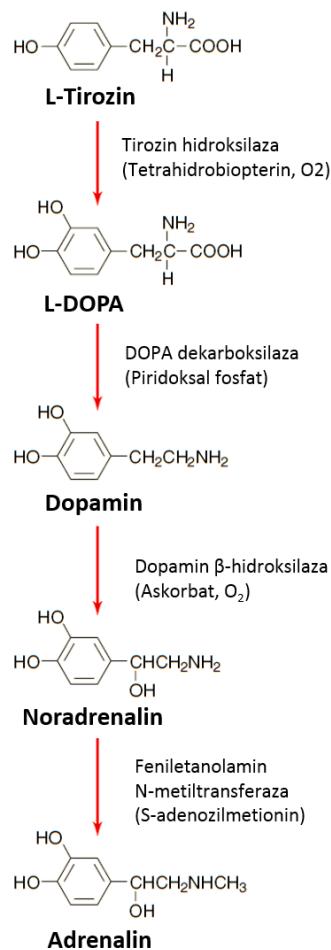
Jedan od najpoznatijih i najkorištenijih animalnih modela hipoksične novorođenačke ozljede mozga je Rice-Vannuccijev model. Model se u početku razvijao na odraslim štakorima (Levine, 1960), no Rice i Vannucci su isti uspješno prilagodili neonatalnoj primjeni na štakorima (Rice i sur., 1981; Vannucci i Vannucci, 1997). Ovdje je riječ o invazivnoj metodi kojom se HI inducira 7. postnatalnog dana (PND7), jednostranom ligacijom karotidne arterije, a nakon operativnog zahvata slijedi izlaganje životinja blagoj hipoksiji pri normalnom tlaku unutar specijalne komore (8% O₂, 60-120 min). Postoje slične studije na mladuncima od PND6 do PND12 (Li i sur., 2019), kao i one kod tek novorođenih štakora (PND1-PND2), no tu je zabilježena visoka stopa smrtnosti uzrokovana delikatnim, ranije spomenutim, operativnim zahvatom (Brochu i sur., 2011). Kasnije su razvijene metode invazivne *in utero* hipoksije gdje su gravidne štakorice 17. gestacijskog dana podvrgnute operativnom zahvatu obostrane ligacije arterija maternice ili okluzije pupčane vrpce (Tashima i sur., 2001; Nalivaeva i sur., 2018). Poznate su i pojedine kemijske metode induciranja intrauterine hipoksije, a jedna od njih je inhibicija sinteze glavne signalne i efektorske molekule koja posreduje u tjelesnom odgovoru na hipoksiju-dušikovog oksida (Pellicer i sur., 2011).

U nekim je studijama hipoksija na animalnom modelu inducirana isključivo pomoću komore za deprivaciju kisika, bez prethodno provedenog operativnog zahvata. Ovakav model

hipoksije (engl. *hypoxia-only model*) korišten je za istraživanje hipoksične biokemije mozga (Millar i sur., 2017). Navedena metoda se prvotno provodila na gravidnim štakoricama koje su u određenom vremenskom periodu trudnoće (13.-14. dan) bile izložene sniženoj razini kisika (7% O₂, 3h) u normobaričnim uvjetima, dok su njihovi mladunci nakon rođenja držani u standardnim uvjetima, a kasnije bili podvrgnuti daljnjem eksperimentalnom postupku (Lavrenova i sur., 2003). Tyul'kova i sur. (2011) su u svojoj studiji hipoksiju inducirali u hipobaričnim uvjetima (160-180 mmHg, 3x3h), što simulira trudnoću na velikim nadmorskim visinama, a jedan od najkorištenijih neinvazivnih modela je onaj Nalivaeva i sur. (2018). Oni su štakorice izlagali normobaričnoj hipoksiji zamjenom kisika dušikom (7% O₂) tijekom prvih 10 minuta i zadržavanjem na toj razini tijekom 3 sata u različitim danima trudnoće. Za preciznije oponašanje blage hipoksične ozljede u ljudskom mozgu, primjenjuje se model akutne neonatalne hipoksije induciran boravkom mladunaca u komori sa sniženom razinom kisika (Zhang i sur., 2013)

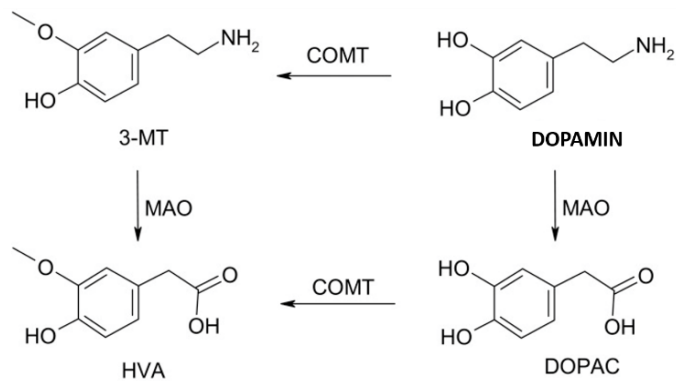
1.2. Katekolamini

Dopamin (DA), noradrenalin (NA) i adrenalin (A) neurotransmiteri su zajedničkog naziva katekolamini prema katekolu, benzenskom prstenu s dvije hidroksilne skupine (1,2-dihidroksibenzen). Glavni prekursor u biosintezi katekolamina je aminokiselina tirozin koju enzim tirozin hidroksilaza (TH) pretvara u L-DOPA (Slika 1). TH je enzim prisutan u svim stanicama koje sintetiziraju katekolamine te je kao takav dobar marker za identifikaciju DAergičkih neurona (Pagida i sur., 2013). U posljednjem koraku sinteze dopamina, enzim DOPA dekarboksilaza posreduje prevođenje L-DOPA u katekolamin dopamin. U neuronima koji luče noradrenalin, prisutan je enzim β -hidroksilaza koji prevodi dopamin u noradrenalin. Enzim feniletanolamin N-metil transferaza pak prevodi noradrenalin u adrenalin (Kuhar i sur., 2006).



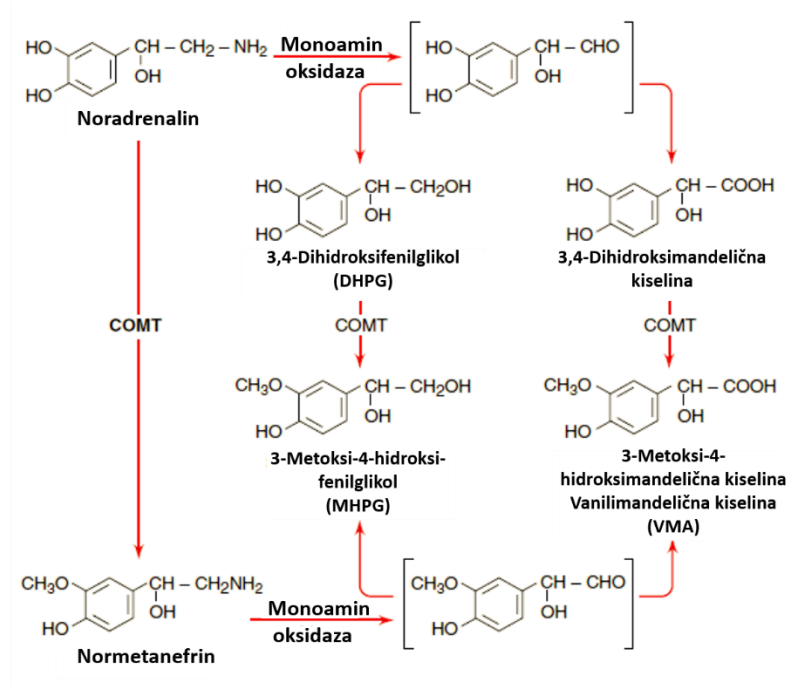
Slika 1. Biosinteza katekolamina (Preuzeto i prilagođeno prema Kuhar i sur., 2006)

Biosinteza DA se odvija u citoplazmi neurona nakon čega slijedi transport u sekretorne vezikule preko vezikularnih monoaminskih transportera (VMAT). Stimulacija živčane stanice potiče stapanje vezikula s membranom, što ovisi o Ca²⁺, te konačno dolazi do oslobađanja DA u sinaptičke pukotine. Dopamin se ondje može vezati na nekoliko vrsta DAergičkih receptora. Većina DA oslobođenog u sinaptičku pukotinu transportira se natrag u presinaptičku stanicu pomoću dopaminskog transportera (DAT). Uneseni DA se vraća u vezikule preko VMAT i tako ponovno reciklira ili razgrađuje djelovanjem monoamin oksidaze (MAO) ili katekol-O-metiltransferaze (engl. *Catechol-O-methyltransferase*, COMT). Djelovanjem ovih enzima nastaje homovanilna kiselina (engl. *homovanillic acid*, HVA) koja se izlučuje mokraćom (Slika 2) (O'Neill, 2005).



Slika 2. Metabolizam dopamina (Preuzeto i prilagođeno prema O'Neill, 2005)

Kao rezultat određenog podražaja NA se oslobađa u sinaptičke pukotine, gdje aktivira adrenergične receptore na postsinaptičkoj i presinaptičkoj membrani. Noradrenergički transporter (engl. *Norepinephrine transporter*, NET) omogućuje povrat NA u presinaptičku stanicu gdje mali dio NA ponovno ulazi u vezikule pomoću transportera VMAT, dok se ostatak unesenog NA metabolizira enzimima MAO i COMT do krajnjih produkata 3-metoksi-4-hidroksifenilgljokola (MHPG) i vanilimandelične kiseline (VMA) (Slika 3) (Zhou, 2004).



Slika 3. Metabolizam noradrenalina (Preuzeto i prilagođeno prema Kuhar i sur., 2006)

Kako adrenalin u živčanom sustavu sisavaca nema značajniju ulogu, u daljnjem ću tekstu detaljnije opisati samo DA i NA.

1.2.1. Dopamin

Iako dopaminergički neuroni zauzimaju manje od 1% ukupnog broja moždanih neurona, široko su rasprostranjeni u SŽS-u (Schultz, 1997). Kroz diferencijaciju prednjeg mozga i formiranje neuronskih krugova, DAergički posredovana signalizacija igra temelju ulogu u kontroli pokreta, nagrađivanju te u neurorazvoju (Money i Stanwood, 2013). O važnosti DAergičkog sustava govore mnoge studije koje navode kako se upravo abnormalnosti DAergičkog sustava nalaze u podlozi mnogih neuroloških i neuropsihijatrijskih poremećaja, uključujući shizofreniju, Parkinsonovu i Huntingtonovu bolest, ADHD (engl. *Attention deficit hyperactivity disorder*) i mnoge druge (Frederick i Stanwood, 2009).

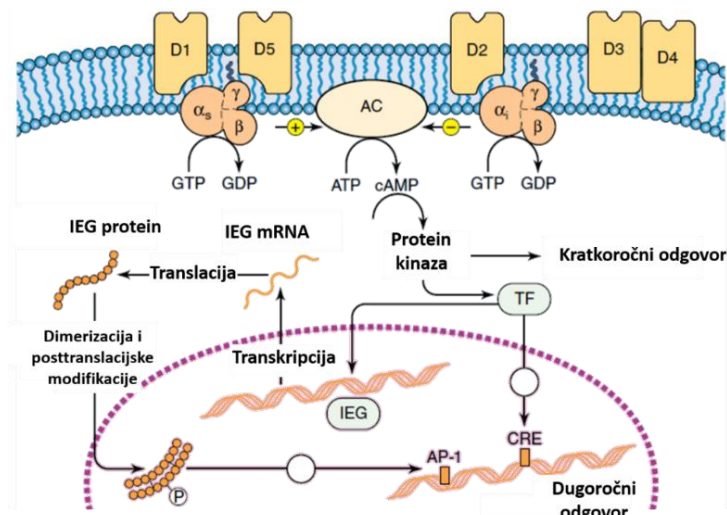
1.2.1.1. Dopaminergički receptori

Dopaminergički receptori otkriveni su 1972. godine te je još tada naznačeno kako dopamin stimulira aktivnosti adenilat ciklaze (AC) (Brow i Makman, 1972; Kebejian i sur., 1972). Danas je okarakterizirano pet različitih podtipova DA receptora (Tablica 1). Sve receptore karakterizira sedam hidrofobnih transmembranskih domena s izvanstaničnim N-terminalnim i unutarstaničnim C-terminalnim završetkom, a signalizaciju vrše putem heterotrimernih G proteina (engl. *G protein-coupled receptors*, GPCR) (Marshall 2001). DAergičke receptore dijelimo u dvije osnovne skupine – D₁-slični i D₂-slični receptori. Skupini D₁-sličnih receptora pripadaju D₁ i D₅ receptori koji pozitivno moduliraju aktivnost adenilat ciklaze (AC) putem G α_s /G α_{olf} proteina, čime podižu razinu unutarstaničnog cikličkog adenozin monofosfata (engl. *Cyclic adenosine monophosphate*, cAMP). S druge strane, u skupinu D₂-sličnih receptora ubrajamo D₂, D₃ i D₄ receptore koji vrše upravo obrnutu ulogu, negativno regulirajući AC preko G α_i/o , čime smanjuju unutarstaničnu aktivnost cAMP-a (Beaulieu i Gainetdinov, 2011).

Tablica 1. Dopaminergički receptori i njihove karakteristike (Preuzeto od Kuhar i sur., 2006; Mishra i sur., 2018)

	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄
Mehanizam	↑ cAMP	↑ cAMP	↓ cAMP	↓ cAMP	↓ cAMP
Lokacija	Striatum, <i>nucleus accumbens</i> , cerebralni korteks	Hipokampus, hipotalamus, cerebralni korteks	Striatum, <i>nucleus accumbens</i> , srednji mozak	<i>Tuberculum olfactorium</i> , hipotalamus	Frontalni korteks, <i>medulla oblongata</i> , srednji mozak, <i>nucleus accumbens</i>
Funkcija	Lokomocija, učenje, memorija, pažnja, spavanje	Kognicija, pažnja, motoričko učenje, odlučivanje	Lokomocija, učenje, memorija, pažnja, reproduktivno ponašanje	Lokomocija, kognicija, pažnja, spavanje	Kognicija, pažnja, reproduktivno ponašanje

Dakle, stimulacijom staničnih receptora aktivira se AC koja katalizira pretvorbu ATP-a u cAMP te dolazi do aktivacije protein kinaze A (PKA). Proteini fosforilirani pomoću PKA mogu potaknuti kratkoročni ili dugoročni stanični odgovor, primjerice aktivacijom transkripcijskih faktora (TF) koji ulaze u jezgru i mijenjaju ekspresiju gena (Kuhar i sur., 2006). Slično, katalitička podjedinica PKA fosforilira CREB (engl. *cAMP-response element binding protein*) koji se veže na CRE (engl. *cAMP response element*) i tako promovira ekspresiju gena. Uz to, još se jedan efektorski protein aktivira pomoću cAMP-a. Riječ je o Epac proteinu (engl. *exchange protein directly activated by cAMP*) koji aktivira ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinases*) te isto tako fosforilira CREB (engl. *cAMP response element binding protein*) koji onda dodatno stimulira transkripciju gena (Missale i sur., 1998). Poznato je da signalni put cAMP – Epac – ERK – CREB posreduje u neurotrofnim i neuroprotektivnim funkcijama (Grimes i sur., 2015.) Zbog uloge neurotrofina kao ključnih regulatora neurorazvoja i sinaptičke plastičnosti, fosforilirani se CREB veže na promotor moždanog neurotrofnog čimbenika rasta (engl. *brain derived neurotrophic factor*, BDNF) i regulira njegovu transkripciju (Wang i sur., 2018). Nadalje, dugoročni se odgovor može inicirati i putem mehanizma koji uključuju aktivaciju ranih gena (engl. *Immediate early gene*, IEG) (Slika 4) (Bahrami i Drablos, 2016).



Slika 4. Mehanizmi djelovanja dopaminergičkih receptora (Preuzeto od Kuhar i sur., 2006)

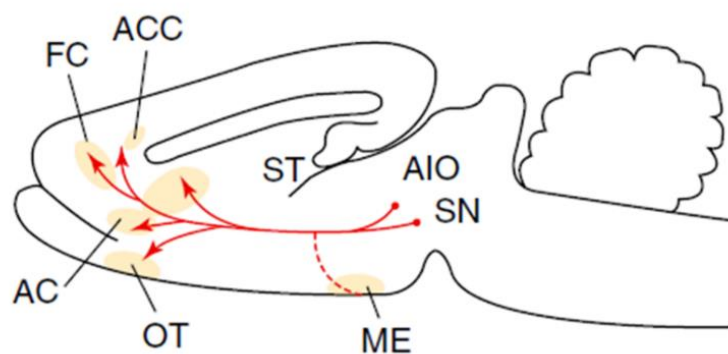
Iako većina receptora povezanih s G-proteinima ne sadrži introne, iznimku čine D₂ receptori. Ova skupina receptora sadrži višestruke introne, što omogućuje alternativno prekrajanje. Kao rezultat, javljaju se dvije forme D₂ podtipa receptora – D₂-L (engl. D₂-*Long*) i D₂-S (engl. D₂-*Short*). Podtip D₂-L sadrži dodatnih 29 aminokiselina na trećoj unutarstaničnoj petlji, zbog čega se i naziva dužom formom (engl. *Long*). Osim što je sama građa receptora drugačija, D₂-L i D₂-S imaju i različite, vjerojatno antagonističke *in vivo* funkcije. D₂-S je uglavnom D₂ presinaptički autoreceptor, koji na postsinaptičkoj razini negativno modulira odgovore ovisne o D₁R. Suprotno tome, D₂-L receptori imaju postsinaptički sinergistički učinak s D₁R (Usiello i sur., 2000).

Zbog nedostatka dovoljno specifičnih agonista i antagonista, pojedinačne uloge DA receptora za određene fiziološke funkcije često se ne mogu sa sigurnošću utvrditi. Isto tako, podtipovi DA receptora mogu stvarati i heterodimere (D₁-D₂, D₁-D₃, D₂-D₃), što dodatno komplicira spoznaje fizioloških funkcija određenih podtipova DA receptora (Maggio i sur., 2009).

1.2.1.2. Dopaminergički neuronski putevi u mozgu

Identifikacija i lokalizacija DAergičkih jezgara prvotno su izvedene uporabom Falck-Hillarpove histofluorescentne metode koja se temelji na vizualizaciji fluorescentnih monoamina

nakon tretmana formaldehidom (Falck i sur., 1962). Iako postoji barem devet dopaminergičkih puteva, tri najpoznatija puta u središnjem živčanom sustavu su nigrostrijatalni, mezolimbčki i mezokortikalni put (Slika 5) (Blaess i sur., 2020). U nigrostrijatalnom putu, striatum prima dopaminergičku inervaciju iz crne tvari srednjeg mozga (lat. *substantia nigra pars compacta*). Dotični DAergički aferentni neuroni stvaraju sinapse s populacijom GABAergičkih neurona koji ekspimiraju i D₁ i D₂ receptore (Santana i sur., 2009). D₁ skupina receptora promiče direktni/ekscitatorni put, dok D₂ receptori inhibiraju indirektni/inhibitatorni put modulacije pokreta, što u oba slučaja vodi preciznijim kretanjama (Missale i sur., 1998; Beaulieu i Gainetdinov, 2011). Promjene unutar ovog puta karakteristične su u poremećajima kretanja kao što su Parkinsonizam i Huntingtonova bolest. Mezolimbčki i mezokortikalni putevi započinju u ventralnom tegmentalnom području (VTA) srednjeg mozga. Mezolimbčki put vodi prema *nucleus accumbens*-u i amigdali, dok mezokortikalni put završava u korteksu. *Nucleus accumbens* u jednakoj mjeri ekspimirira D₁ i D₂ receptore (Le Moine i Bloch, 1995), a u području frontalnog korteksa najistaknutija je ekspresija D₁R (Muly i sur., 1998). Mezolimbčki put je uglavnom povezan s nagradom te je kao takav uključen u depresivne poremećaje i ovisnosti, dok je mezokortikalni put povezan s kognitivnim funkcijama, a njegove abnormalnosti nalazimo u podlozi shizofrenije. Dakle, dopamin može utjecati na više aspekata ljudskog ponašanja, izravno kroz striatalne projekcije i neizravno kroz promjene u nagrađivanju i spoznaji.



Slika 5. Sagitalni prikaz dopaminergičkih puteva u mozgu štakora. Označene su strukture DAergičkog sustava: SN, *substantia nigra*; AIO, ventralno tegmentalno područje; ME, eminencija medijana; ST, striatum; OT, olfaktorni trabekul; AC, *nucleus accumbens*; FC, frontalni korteks; ACC, anteriorni cingulatni korteks. (Preuzeto od Kuhar i sur., 2006)

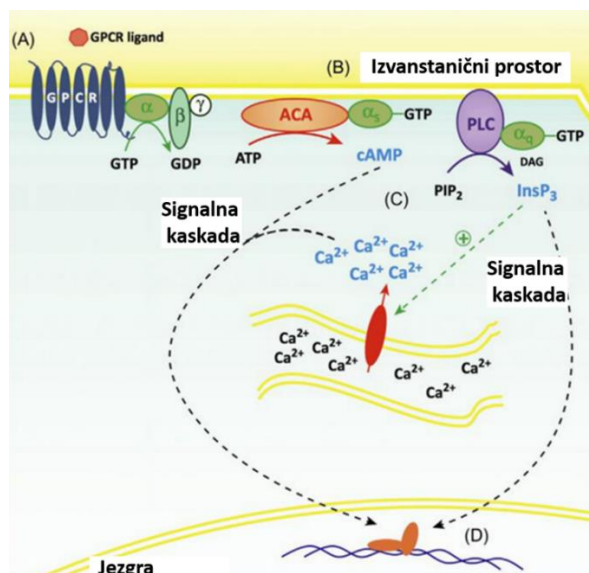
1.2.2. Noradrenalin

Noradrenalin (NA) je neuromodulator koji na više načina regulira aktivnost neuronskih i ne-neuronskih stanica. NA se sintetizira i oslobađa putem adrenergičkih aksonskih završetaka u SŽS-u i u simpatičkom autonomnom živčanom sustavu. U SŽS-u, noradrenergički sustav sudjeluje u promicanju budnosti i uzbuđenja te olakšavanju detekcije senzoričkih signala, a pojedine su studije pokazale da može utjecati i na neka područja spoznaje i ponašanja, kao što su pažnja, radna memorija i fleksibilnost u ponašanju. Nadalje, NA sudjeluje u brzom modulaciji kortikalnih krugova i metabolizmu stanične energije, kao i u neuroplastičnosti i upalama. S obzirom na niz važnih uloga, bilo kakvo remećenje ovog sustava može inducirati niz patofizioloških odgovora koji se nalaze i u podlozi neuropsihijatrijskih poremećaja, kao što su depresija, shizofrenija, ADHD, Parkinsonova i Alzheimerova bolest te je kao takav važan u farmakološkim istraživanjima (Schwarz i Luo, 2015).

1.2.2.1. Noradrenergički receptori

Prva otkrića adrenergičkih receptora potječu iz 40-ih godina prošloga stoljeća. Danas znamo da postoji devet različitih adrenergičkih receptora koji su temeljem farmakoloških svojstava, sekvenci i signalnih mehanizama svrstani u tri skupine – α_1 , α_2 i β (Tablica 2) (Kuhar i sur., 2006). Kao što je to slučaj kod DAergergičkih receptora, adrenergički receptori također pripadaju superobitelji receptora vezanih za GPCR. Receptori su građeni od sedam transmembranskih domena s izvanstaničnom N-terminalnom domenom i unutarstaničnom C-terminalnom domenom (Ciccarelli i sur., 2017).

Skupini α_1 adrenergičkih receptora pripadaju α_{1A} , α_{1B} i α_{1D} receptori koji djeluju putem G_q proteina povezanog s PLC, koji katalizira fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat (PIP₂), prilikom čega nastaju inozitol-1,4,5-trifosfat (IP₃) i diacilglicerol (DAG). IP₃ se veže na IP₃ receptor (IP₃R) koji se nalazi na endoplazmatskom retikulumu (ER), a djeluje kao Ca²⁺ kanal. Konformacijske promjene na receptoru dovode do oslobađanja Ca²⁺ u citosol (Slika 6). Sljedeća skupina receptora je α_2 skupina koja djeluje putem G_i proteina inhibicijom kaskadne reakcije unutar stanice, što dovodi do pada razine cAMP-a. Dijeli se na α_{2A} , α_{2B} i α_{2C} receptore. β adrenergički receptori djeluju aktivacijom G_s proteina, što dovodi do povećane proizvodnje cAMP-a koji vodi ka fosforilaciji glikogen fosforilaze (GP) preko protein kinaze A. Ova se skupina receptora dijeli na β_1 , β_2 i β_3 receptore (O'Donnell i sur, 2012).



Slika 6. Mehanizmi djelovanja noradrenergičkih receptora (Preuzeto i prilagođeno prema Ciccareli i sur., 2017)

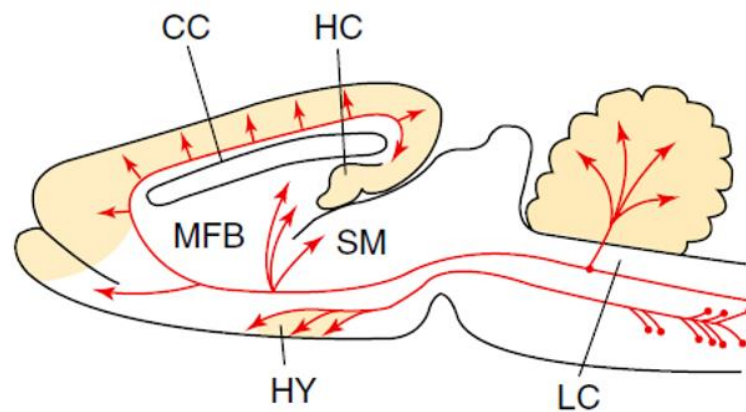
Uloga pojedinih podtipova adrenergičkih receptora u mozgu još je uvijek slabo razumljiva. Utvrđeno je da α_1 i α_2 receptori utječu na kognitivne funkcije poput radne memorije, pažnje te prostornog učenja. Općenito, α_1 i β receptori pojačavaju neurotransmisiju i plastičnost, potičući stimulatивne učinke na SŽS, dok α_2 receptori imaju inhibitorne učinke u SŽS-u, poput smanjene neuronske podražljivosti (Hussain i sur., 2021).

Tablica 2. Noradrenergički receptori i njihove karakteristike (Prema Kuhar i sur., 2006)

	α_{1A}	α_{1B}	α_{1D}
Mehanizam	\uparrow Ca ²⁺ protein kinaza C	\uparrow Ca ²⁺ protein kinaza C	\uparrow Ca ²⁺ protein kinaza C
Lokacija	Srce, jetra, mali mozak, cerebralni korteks, krvne žile	Slezena, bubrezi, fetalni mozak, krvne žile	Aorta, cerebralni korteks
	α_{2A}	α_{2B}	α_{2C}
Mehanizam	\downarrow cAMP	\downarrow cAMP	\downarrow cAMP
Lokacija	Gušterača, tanko crijevo, <i>locus coeruleus</i> , hipokampus	Jetra, talamus	Srce, pluća, aorta, hipokampus, olfaktorni bulbusi
	β_1	β_2	β_3
Mehanizam	\uparrow cAMP	\uparrow cAMP	\uparrow cAMP
Lokacija	Srce, bubrezi, cerebralni korteks, hipotalamus	Pluća, jetra, mali mozak, hipokampus, cerebralni korteks, glatki mišići, olfaktorni bulbusi	Masno tkivo, mozak (?)

1.2.2.2. Noradrenergički neuronski putevi u mozgu

Stanične jezgre noradrenergičkih neurona SŽS koncentrirane su u moždanom deblu, posebice u *locus coeruleus*, odakle projiciraju neurone u gotovo svaku regiju središnjeg živčanog sustava (Slika 7) (Frederick i Stanwood, 2009). *Locus coeruleus* je poznati kao glavni regulator budnosti, uzbuđenja i formiranja memorije. Središnji noradrenergički sustav sastoji se od dvije primarne izlazne projekcije: dorzalnog noradrenergičkog snopa (DNS) i ventralnog noradrenergičkog snopa (VNS). DNS šalje projekcije do cerebralnog korteksa, hipokampusa i malog mozga, dok VNS šalje projekcije do amigdale, hipotalamusa, područja srednjeg mozga i medule (Hussain i sur., 2021). Općenito se najviše granaju upravo neuroni LC (Stanford, 2013).



Slika 7. Sagitalni prikaz noradrenergičkih puteva u mozgu štakora. Označene su strukture NAergičkog sustava – LC, *locus coeruleus*; HY, hipotalamus; SM, *stria medullaris*; MFB, medijalni svežanj prednjeg mozga; HC, hipokampus; CC, *corpus callosum*. (Preuzeto od Kuhar i sur., 2006)

2. Cilj istraživanja

Ovaj je diplomski rad dio većeg istraživanja kojim se na bihevioralnoj, histološkoj i molekularnoj razini pokušavaju istražiti posljedice neonatalne hipoksije na razvoj mozga. Načinjene su dvije verzije blagog hipoksičnog modela štakora, pri čemu su mladunci PND1 dva sata boravili u normobaričnoj hipoksijskoj komori (8% O₂, 25°C) ili pak u hipobaričnoj komori (Atm 350mmHg, pO₂ 73mmHg), a kasnije bili podvrgnuti bateriji različitih testova ponašanja (Krizman, 2019; Stipan, 2020). Navedene studije pokazale su promijenjeno eksploratorno ponašanje životinja iz hipoksične skupine u odnosu na kontrolnu, koje se očitovalo u smanjenoj ukupnoj posjećenosti rupa (test na ploči s rupama, engl. *hole board*) te povećanom broju propinjanja (test u otvorenom polju, engl. *open field*). Sukladno ranije navedenim ulogama DA i NA, kao i studijama koje navode kako perinatalna hipoksija u štakora rezultira selektivnim i dugotrajnim oštećenjima katekolaminergičkih neurona (Burke i sur., 1992; Chen i sur., 1997), pretpostavljamo da bi katekolaminergički neuronski krugovi mogli predstavljati ključne mehanizme putem kojih hipoksija djeluje na promjenu ponašanja.

Cilj ovog diplomskog rada jest analizirati utjecaj neonatalne izloženosti štakora kratkotrajnoj akutnoj hipoksiji na koncentraciju dopamina i noradrenalina u moždanom deblu u adolescentnoj dobi. Dobivene spoznaje mogu nam pružiti uvid u neurokemijske mehanizme fetalnog oštećenja mozga izazvanog hipoksijom kao i moguća objašnjenja za ranije opažene promjene u ponašanju hipoksičnih štakora.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci tkiva

Ovo istraživanje provedeno je na uzorcima moždanog tkiva 15 kontrolnih štakora (7 mužjaka, 8 ženki) te 16 eksperimentalnih štakora (8 mužjaka, 8 ženki) soja Wistar Han®.

Parenje, okot te izlaganje hipoksiji provedeno je na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Prvog postnatalnog dana (PND1) je eksperimentalna skupina bila 2 sata izložena normobaričnim hipoksičnim uvjetima (8% O₂, 92% N₂) unutar specijalne komore (temp. 27°C), dok je kontrolna skupina boravila u normobaričnim normoksičnim uvjetima (21% O₂, 78% N₂) unutar kaveza (temp. 27°C). Nakon odvajanja od majke postnatalnog dana 28 (PND28), mladunci su dopremljeni u nastambu za životinje Zavoda za animalnu fiziologiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te su, prije žrtvovanja (PND50), podvrgnuti bateriji bihevioralnih testova (PND33-45). Uvjeti unutar nastambe bili su kontrolirani održavanjem konstantne temperature zraka (22 ± 2°C), vlažnosti zraka (oko 60%) i režima rasvjete 12 sati svjetlo: 12 sati tama, uz slobodan pristup hrani i vodi.

Žrtvovanje životinja u svrhu uzimanja tkiva provedeno je u skladu sa zakonima koje propisuje Republika Hrvatska i Europska Unija.

3.1.2. Tehnička pomagala i pribor

- centrifuga, 5415 C (Eppendorf, Austrija)
- čitač mikrotitarskih ploča, Bio-Rad Model 550 (Bio-Rad, SAD)
- digitalna vaga, EG 220-3NM (Kern&Sohn, Njemačka)
- miješalica, IKA KS 130 basic (IKA, Njemačka)
- mikropipete, (Eppendorf, Austrija)
- minicentrifuga, Quickspin (Cleaver Scientific, Velika Britanija)
- ultrazvučni homogenizator, Bandelin electronic UW 2070, Bandelin Sonoplus HD 2070 (Bandelin, Njemačka)
- vibracijska mješalica, Vortex genius 3 (IKA, Njemačka)
- zamrzivači

3.1.3. Otopine, kemikalije i kompleti

- Korištene prilikom žrtvovanja životinja:

Izofluran ($C_3H_2ClF_5O$; $M_r = 184,49$ g/mol) (Baxter, SAD)

- Korištene za pripremu deproteinizacijske otopine:

0,01 N Klorovodična kiselina (HCl), 37 %, p.a. (Gram-Mol, Hrvatska)

1 mM EDTA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \times 2H_2O$) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka)

4 mM Natrijev metabisulfit ($Na_2S_2O_5$) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka)

dH₂O

- Korištene za određivanje koncentracije dopamina i noradrenalina metodom ELISA:

3-CAT Research ELISA (Demeditec Diagnostics GmbH, Njemačka)

3.2. Metode

3.2.1. Žrtvovanje i uzimanje uzoraka moždanog debla

Žrtvovanje životinja proveli smo 50. postnatalnog dana. Životinje smo najprije anestetizirali inhalacijom izoflurana unutar komori, a potom ih dekapitali. Uslijedilo je skidanje gornjeg dijela lubanje te pažljivo odstranjenje mozga spatulom. Uzorke smo zatim brzo izvagali te stavili na hladnu površinu, nakon čega smo skalpelom izolirali moždano deblo iz obje polutke mozga. Uzorke smo položili u prethodno izvaganu mikroeprevetu, ponovno ih vagali te ih konačno uskladištili u suhi led (-80°C).

3.2.2. Priprema homogenata

Prethodno odmrznute uzorke moždanog debla homogenizirala sam ultrazvučnim homogenizatorom u 5 volumena hladne deproteinizacijske otopine. S obzirom da se prilikom procesa homogenizacije oslobađa toplinska energija, uzorke sam homogenizirala 10 sekundi u mikroepreveti uronjenoj u led. Tkivne homogenate sam zatim centrifugirala na $24.000 \times g$ tijekom 20 minuta pri 4°C, a za mjerenje koncentracije katekolamina koristila sam alikvotne bistrog supernatanta koje sam do provedbe ELISA testa zamrznuh pri -20°C.

3.2.3. Određivanje koncentracije dopamina i noradrenalina metodom ELISA

Koncentraciju dopamina i noradrenalina u uzorcima moždanog debla odredila sam pomoću komercijalnog kompleta enzimskog imunotesta na čvrstoj fazi (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA), prema uputama proizvođača. Riječ je o kompetitivnoj metodi pri kojoj se analit niske molekularne mase iz uzorka i konjugirani antigen, vezan unutar jažica mikrotitarske pločice, natječu za vezno mjesto na određenoj količini antitijela. U uzorcima visokog sadržaja antigena dolazi do manjeg vezanja konjugiranog antigena za antitijela što za posljedicu ima slabiji signal. Tako nastaje obrnuta korelacija između koncentracije antigena u uzorku i razvoja boje u testu. Prvi je korak bila ekstrakcija i acilacija DA i NA iz uzoraka. Korak acilacije važan je kako bi primarno antitijelo moglo prepoznati i vezati se za katekolamine, a zatim je uslijedila sama ELISA.

Najprije sam uzorke, standarde i kontrolu pipetirala u jažice ekstrakcijske pločice zajedno s TE puferom, prekrila ih adhezivnom folijom i inkubirala na miješalici 60 minuta (600 okretaja u minuti pri sobnoj temperaturi). Zatim sam jažice dva puta ispirala puferom za ispiranje te na posljertku dodala acilacijski pufer i acilacijski reagens i dodatno inkubirala 20 minuta pri istim uvjetima. Pločicu sam ponovno dva puta ispirala nakon čega sam u svaku jažicu dodala HCl. Pločicu sam ponovno prekrila adhezivnom folijom i inkubirala 10 minuta. Nakon toga, jažice više nisam ispirala, već sam dobiveni supernatant koristila u daljnjem postupku.

Sljedeće sam pipetirala enzimsku otopinu u dopaminsku i noradrenalinsku mikrotitarsku pločicu, sve inkubirala 2 sata pri 37°C te konačno dodala uzorke, standarde i kontrole. Nakon što sam dodala odgovarajući DA ili NA antiserum, pločice sam 17 sati inkubirala u hladnjaku pri +4°C. Po završetku inkubacije, jažice sam ispraznila i četiri puta ispirala puferom za ispiranje, a zatim sam dodala enzimski konjugat te ponovno inkubirala 30 minuta. Prije nego što sam dodala supstrat i ponovno inkubirala pločice umotane u aluminijsku foliju (25 minuta), jažice sam četiri puta temeljito isprala. Naposljetku sam dodala otopinu za zaustavljanje reakcije i sve dobro homogenizirala. Unutar 10 minuta sam očitala apsorbanciju uzoraka pri 450 nm koristeći čitač mikrotitarskih pločica.

3.2.4. Analiza i statistička obrada podatak

Vrijednosti koncentracija katekolamina dobila sam interpolacijom očitanih apsorbancija uzoraka na baždarni pravac, korištenjem nelinearne regresijske krivulje s 4 parametra. Baždarni sam pravac nacrtali na temelju apsorbancije izmjerene pri 450 nm i poznatih koncentracija standardnih otopina. Dobivene vrijednosti katekolamina (engl. *catecholamine*, CA) izražene u ng/mL preračunala sam u pg katekolamina po mg moždanog tkiva prema sljedećoj formuli:

$$\text{pg CA / mg mozga} = \frac{\text{CF} \times \text{koncentracija CA} \left(\frac{\text{pg}}{\text{mL}} \right) \times \text{volumen homogenata (mL)}}{\text{masa moždanog debla (mg)}}$$

Pri čemu je korekcijski faktor (engl. *correction factor*, CF) izračunat prema formuli:

$$\text{CF} = \frac{30 \mu\text{L (volumen standarda)}}{\text{volumen uzorka} (\mu\text{L})}$$

Rezultate sam statistički obradila u programima *GraphPad InStat 3.01* (*GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA*) i *JMP 11.2* (*SAS Institute Inc., Cary, NC, USA*). Normalnost raspodjele testirala sam Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Dvostrukom analizom varijanci (engl. *Two-way ANOVA*), na originalnim ili transformiranim vrijednostima, provjerila sam utjecaj tretmana i spola na mjerene varijable. Vrijednosti sam prikazala kao srednju vrijednost (engl. *mean*, M) ± standardnu pogrešku (engl. *standard error of mean*, SEM) uz prag statističke značajnosti od $p < 0,05$.

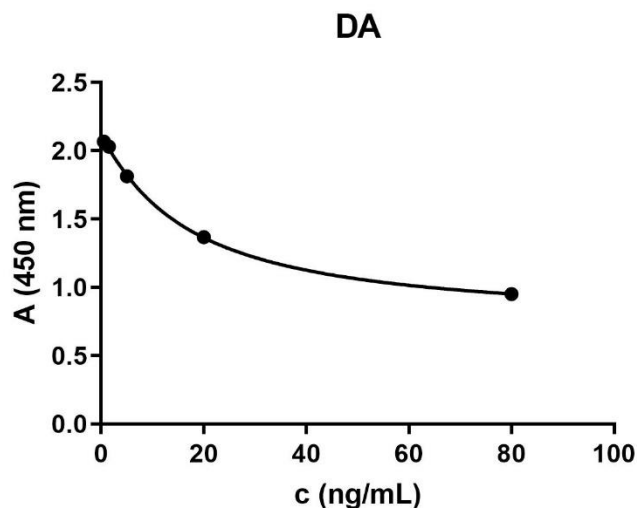
4. Rezultati

4.1. Određivanje optimalne početne količine uzorka

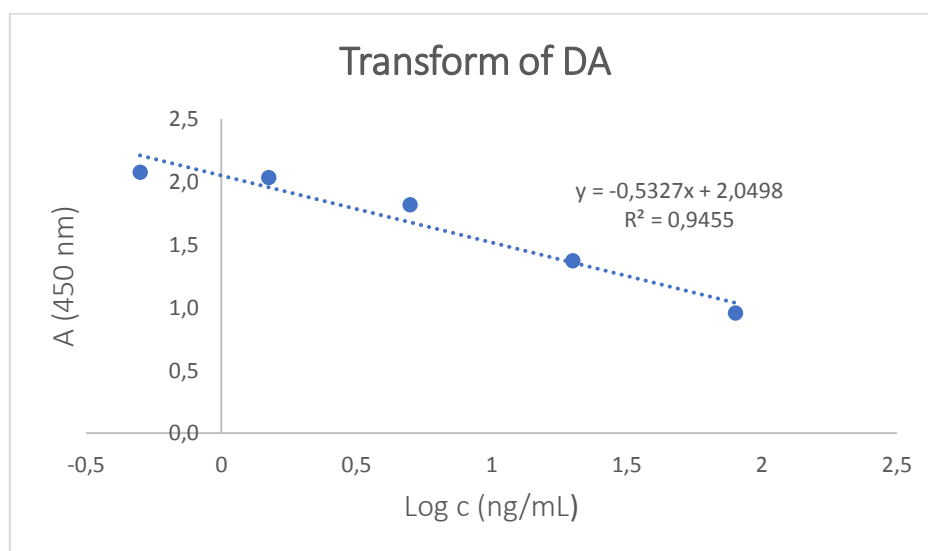
Nakon završene homogenizacije, uzorke moždanog debla mladih štakora podvrgnula sam ELISA testu kako bih odredila koncentraciju dopamina i noradrenalina. S obzirom da se u ovom kompletu ELISA početni koraci mjerenja koncentracije DA i NA odvijaju u istom alikvotu uzorka, ključno je odrediti optimalnu početnu količinu uzorka u kojem će se, u pouzdanom rasponu vrijednosti, moći izmjeriti koncentracija oba katekolamina. U tu sam svrhu izmjerila koncentracije DA i NA u tri različite početne količine homogenata (10 μ L, 50 μ L i 150 μ L) dobivenog miješanjem alikvota svih uzoraka (engl. *pool*), usporedno s nekoliko razrjeđenja standarda poznate koncentracije, priloženih u kompletu. Očitavanjem apsorbancija standarda pri 450 nm, konstruirala sam baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o logaritmu koncentracija standarda, pomoću kojeg sam odredila nepoznate koncentracije DA i NA homogenata i provjerila nalaze li se u okviru raspona standarda. Korištenjem standarda u rasponu koncentracija prikazanom u Tablici 3, konstruirali smo krivulju ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standarda (Slika 8a), koji smo zatim transformirali u baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o logaritmu koncentracije standarda (Slika 8b) te iz njega očitali koncentracije DA u homogenatima.

Tablica 3. Standardi i homogenati korišteni za određivanje koncentracije dopamina

Uzorak	Average A	Log c	c (ng/mL)
STD B	2,07	-0,30	0,50
STD C	2,03	0,18	1,50
STD D	1,81	0,70	5,00
STD E	1,37	1,30	20,00
STD F	0,95	1,90	80,00
10 μ L	1,49	1,16	14,30
50 μ L	1,10	1,64	43,77
150 μ L	0,72	-	-



Slika 8a. Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji dopamina (DA) u uzorcima standarda. Nakon provedbe ELISA testa, apsorbancija uzoraka poznatih koncentracija očitana je pomoću čitača mikrotitarskih pločica pri 450 nm.



Slika 8b. Transformirani grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o logaritmu koncentracije dopamina (DA) u uzorcima standarda, dobiven iz krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standarda.

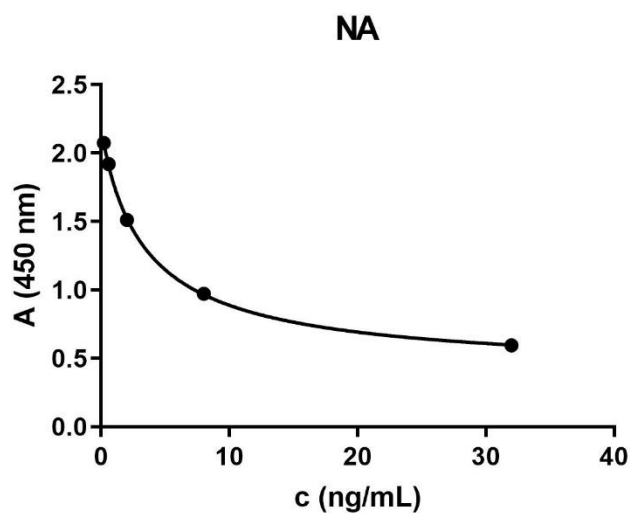
Koncentracije DA u dvije početne količine homogenata nalazile su se unutar raspona standarda i to u 10 μ L (14,30 ng/mL) i 50 μ L (43,77 ng/mL). Koncentracija DA u početnoj količini homogenata od 150 μ L bila je izvan raspona standarda te time nemjerljiva (Tablica 3).

Isti sam postupak ponovila prilikom optimizacije uzoraka za noradrenalin. Pomoću poznatog raspona koncentracija standarda (Tablica 4) i očitanih apsorbancija (450 nm),

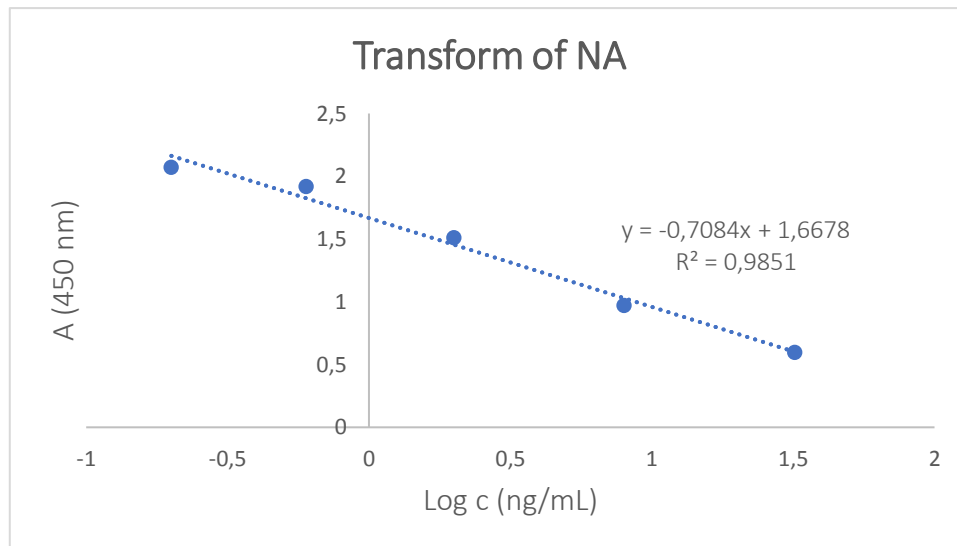
konstruirali smo krivulju ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standarda (Slika 9a) koju smo transformirali u baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o logaritmu koncentracije standarda (Slika 9b) te iz njega očitali koncentracije NA u homogenatima.

Tablica 4. Standardi i homogenati korišteni za određivanje koncentracije noradrenalina

Uzorak	Average A	Log c	c (ng/mL)
STD B	2,07	-0,70	0,20
STD C	1,92	-0,22	0,60
STD D	1,51	0,30	2,00
STD E	0,97	0,90	8,00
STD F	0,60	1,51	32,00
10 μ L	0,61	1,47	29,78
50 μ L	0,36	-	-
150 μ L	0,26	-	-



Slika 9a. Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji noradrenalina (NA) u uzorcima standarda. Nakon provedbe ELISA testa, apsorbancija uzoraka poznatih koncentracija očitana je pomoću čitača mikrotitarskih pločica pri 450 nm.



Slika 9b. Transformirani grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o logaritmu koncentracije noradrenalina (NA) u uzorcima standarda, dobiven iz krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standarda.

U ovom slučaju, samo je najmanja količina homogenata dala koncentraciju NA unutar raspona standarda. Riječ je o uzorku od 10 μ L čija je koncentracija iznosila 29,78 ng/mL. U ostala su dva homogenata iznosi koncentracija bili izvan raspona standarda (Tablica 4).

Kod odabira optimalne koncentracije uzoraka, cilj nam je bio odabrati vrijednost koja se nalazila blizu sredine transformiranih krivulja za oba katekolamina, tj. između standarda C i E. Taj smo kriterij uspješno postići peterostrukim smanjenjem najmanje početne količine homogenata pa sam za usporedbu koncentracija DA i NA u uzorcima koristila početni volumen homogenata od 2 μ L.

4.2. Određivanje koncentracije katekolamina u moždanom deblu

Iz izmjerenih apsorbancija sam, korištenjem postupka opisanog u poglavlju 3.2.4., izračunala koncentraciju dopamina (Tablica 5) i noradrenalina (Tablica 6) u uzorcima moždanog debla eksperimentalnih i kontrolnih životinja.

Tablica 5. Izmjerene i preračunate koncentracije dopamina (DA) u uzorcima moždanog debla kontrolnih i eksperimentalnih životinja

Uzorak	IC (ng/mL)	KC (ng/mL)	mMD (mg)	vH (μL)	m DA u H (ng)	cDA u MD (pg/mg)
KŽ						
1	1,73	25,91	67,00	402,00	10,41	155,45
2	1,20	17,93	99,00	594,00	10,65	107,55
3	0,24	3,58	40,00	240,00	0,86	21,49
4	0,15	2,19	52,00	312,00	0,68	13,15
5	1,08	16,23	28,00	168,00	2,73	97,38
6	1,39	20,83	54,00	324,00	6,75	125,01
7	0,98	14,75	71,00	426,00	6,28	88,47
8	1,50	22,51	59,00	354,00	7,97	135,05
M ± SEM						92,94 ± 18,14
KM						
1	0,66	9,89	72,00	432,00	4,27	59,31
2	0,69	10,40	82,00	492,00	5,12	62,41
3	0,76	11,33	92,00	552,00	6,25	67,97
4	1,29	19,33	65,00	390,00	7,54	115,96
5	0,52	7,76	60,00	360,00	2,79	46,54
6	0,63	9,38	59,00	354,00	3,32	56,28
7	1,13	16,98	59,00	354,00	6,01	101,86
M ± SEM						72,91 ± 9,78
HŽ						
1	1,54	23,03	72,00	432,00	9,95	138,18
2	1,46	21,94	44,00	264,00	5,79	131,66
3	1,10	16,54	43,00	258,00	4,27	99,21
4	2,77	41,56	40,00	240,00	9,97	249,35
5	3,65	54,75	43,00	258,00	14,13	328,53
6	1,40	20,93	49,00	294,00	6,15	125,60
7	4,59	68,81	41,00	246,00	16,93	412,85
8	3,33	50,02	76,00	456,00	22,81	300,14
M ± SEM						223,19 ± 41,00
HM						
1	3,39	50,79	52,00	312,00	15,85	304,75
2	1,58	23,77	50,00	300,00	7,13	142,63
3	0,90	13,57	35,00	210,00	2,85	81,42
4	2,86	42,85	44,00	264,00	11,31	257,08
5	2,23	33,43	37,00	222,00	7,42	200,57
6	3,27	49,01	53,00	318,00	15,59	294,07
7	3,67	55,12	53,00	318,00	17,53	330,70
8	2,59	38,84	43,00	258,00	10,02	233,05
M ± SEM						230,53 ± 30,22

KŽ – kontrolne ženke, KM – kontrolni mužjaci, HŽ – hipoksične ženke, HM – hipoksični mužjaci; IC - izmjerena koncentracija, KC – korigirana koncentracija (x CF), mMD – masa moždanog debla, vH – volumen homogenata (w/v x6)

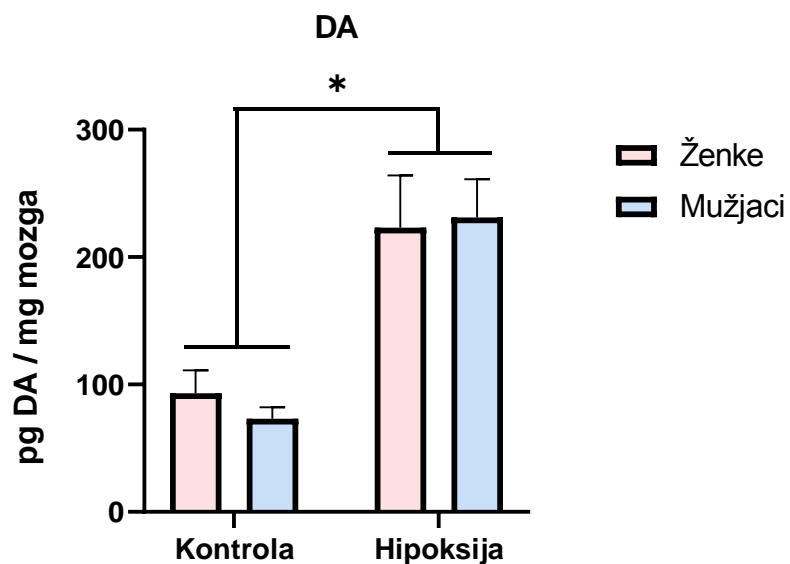
Tablica 6. Izmjerene i preračunate koncentracije noradrenalina (NA) u uzorcima moždanog debla kontrolnih i eksperimentalnih životinja

Uzorak	IC (ng/mL)	KC (ng/mL)	mMD (mg)	vH (μL)	m NA u H (ng)	cNA u MD (pg/mg)
KŽ						
1	8,06	120,87	67,00	402,00	48,59	725,24
2	5,39	80,87	99,00	594,00	48,03	485,20
3	5,04	75,65	40,00	240,00	18,16	453,88
4	5,42	81,32	52,00	312,00	25,37	487,90
5	5,96	89,35	28,00	168,00	15,01	536,09
6	6,14	92,03	54,00	324,00	29,82	552,18
7	5,30	79,54	71,00	426,00	33,88	477,23
8	4,73	71,01	59,00	354,00	25,14	426,09
M ± SEM						517,97 ± 32,91
KM						
1	5,48	82,23	72,00	432,00	35,52	493,37
2	5,73	85,92	82,00	492,00	42,27	515,51
3	5,17	77,61	92,00	552,00	42,84	465,65
4	6,55	98,25	65,00	390,00	38,32	589,51
5	6,88	103,17	60,00	360,00	37,14	619,02
6	6,32	94,84	59,00	354,00	33,57	569,05
7	5,58	83,63	59,00	354,00	29,60	501,76
M ± SEM						525,98 ± 21,38
HŽ						
1	7,08	106,21	72,00	432,00	45,88	637,28
2	4,86	72,89	44,00	264,00	19,24	437,35
3	5,84	87,54	43,00	258,00	22,59	525,26
4	7,75	116,30	40,00	240,00	27,91	697,78
5	4,83	72,42	43,00	258,00	18,68	434,49
6	4,21	63,16	49,00	294,00	18,57	378,95
7	7,05	105,70	41,00	246,00	26,00	634,18
8	6,42	96,30	76,00	456,00	43,91	577,80
M ± SEM						540,39 ± 40,64
HM						
1	6,28	94,27	52,00	312,00	29,41	565,61
2	4,83	72,42	50,00	300,00	21,72	434,49
3	6,87	103,01	35,00	210,00	21,63	618,03
4	6,91	103,67	44,00	264,00	27,37	622,01
5	4,98	74,74	37,00	222,00	16,59	448,47
6	7,17	107,61	53,00	318,00	34,22	645,69
7	7,47	112,00	53,00	318,00	35,62	672,03
8	6,27	93,98	43,00	258,00	24,25	563,90
M ± SEM						572,40 ± 31,15

KŽ – kontrolne ženke, KM – kontrolni mužjaci, HŽ – hipoksične ženke, HM – hipoksični mužjaci; IC - izmjerena koncentracija, KC – korigirana koncentracija (x CF), mMD – masa moždanog debla, vH – volumen homogenata (w/v x6)

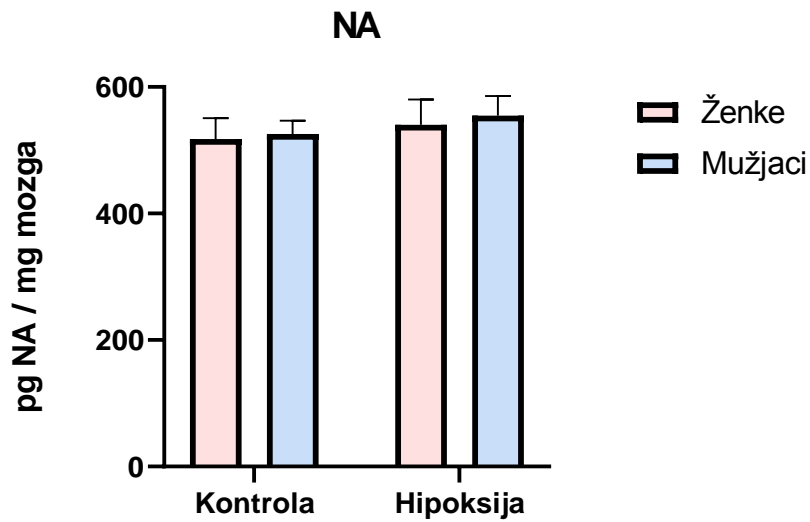
4.3. Usporedba koncentracija katekolamina u moždanom deblu između eksperimentalne i kontrolne skupine štakora

Kao što je to prikazano na Slici 10, izlaganje hipoksiji je imalo statistički značajan utjecaj ($p < 0,001$) na koncentracije dopamina u tkivu mozga. Hipoksični su štakori (ženke, $223,19 \pm 41,00$ pg/mg; mušjaci, $230,53 \pm 30,22$ pg/mg) imali oko tri puta veću koncentraciju dopamina u moždanom deblu od kontrolnih štakora (ženke, $92,94 \pm 18,14$ pg/mg; mušjaci, $72,91 \pm 9,78$ pg/mg). Spol ($p = 0,827$) te interakcija tretman x spol ($p = 0,6348$) nisu značajno utjecali na ovaj parametar.



Slika 10. Koncentracija dopamina (DA) u uzorcima mozga štakora iz kontrolne (ženke, $N = 7$; mušjaci, $N = 8$) i eksperimentalne skupine (ženke, $N = 8$; mušjaci, $N = 8$). Vrijednosti su izražene kao srednje vrijednosti \pm SEM. * $p < 0,001$

Kao što je prikazano na Slici 11, ni tretman hipoksijom ($p = 0,3915$), ni spol ($p = 0,4621$), a niti njihova interakcija ($p = 0,8499$) nisu imali statistički značajan utjecaj na razinu noradrenalina u mozgu. Srednje koncentracije NA bile su slične u eksperimentalnoj (ženke, $540,39 \pm 40,64$ pg/mg; mušjaci $572,40 \pm 31,15$ pg/mg) i kontrolnoj skupini (ženke, $517,97 \pm 32,91$ pg/mg; mušjaci, $525,98 \pm 21,38$ pg/mg) životinja.



Slika 11. Koncentracija noradrenalina (NA) u uzorcima mozga štakora iz kontrolne (ženke, $N = 7$; mušjaci, $N = 8$) i eksperimentalne skupine (ženke, $N = 8$; mušjaci, $N = 8$). Vrijednosti su izražene kao srednje vrijednosti \pm SEM.

5. Rasprava

U nastojanju da se razumije prenatalna hipoksijska-ishemija u ljudi i razvije potencijalna terapija, znanstvena je zajednica osmislila čitav spektar različitih animalnih modela koji simuliraju različita hipoksična stanja središnjeg živčanog sustava. Jedan od češćih je upravo štakorski animalni model. Zbog svoje veličine, kirurški su modeli štakora tehnički manje zahtjevni od miševa, a prednost im je i kratak životni vijek, veći broj potomaka i niski troškovi održavanja u odnosu na velike životinje poput svinja, ovaca i primata. Iako je danas najpoznatiji i najprimjenjiviji model hipoksije onaj Rice-Vannucci-a, koji uključuje ligaciju karotide u kombinaciji s izlaganjem hipoksiji (Rice i sur., 1981; Vannucci i Vannucci, 1997), uz svoje prednosti, modeli tog tipa imaju određene nedostatke. Primjerice, operacija jednostrane ligacije arterije može izazvati ishemiju mozga tijekom same operacije, operacijski postupak je prilično zahtjeva i stresan, a sama anestezija može imati negativan utjecaj na tek rođene životinje (Zhang i sur., 2013). Zbog navedenih nedostataka invazivne metode, znanstveni je imperativ bio osmisliti novi neinvazivni hipoksijski model kod kojeg će hipoksija biti inducirana isključivo pomoću komore za deprivaciju kisika, bez prethodne ishemijske procedure. Hou i sur. (2009) prvi su predstavili jedan takav primjer na animalnom modelu svinje, kojim je dokazao kako samo deprivacija kisika, bez kirurškog zahvata ligacije arterije, može simulirati novorođenačku HI ozljedu. Prvi takav eksperiment na modelu štakora izveli su Zhang i sur. tek 2013. godine, a kasnije je korišten u raznim varijacijama s obzirom na dob (prenatalno/postnatalno), trajanje (akutno/kronično) i uvjete (hipobarično/normobarično) izlaganja hipoksiji. Ovakav model hipoksije, uz to što ga je mnogo lakše izvesti, manje je invazivan i traumatičan što smanjuje stres i smrtnost, a umanjuje i mogućnost ljudske pogreške te troškove eksperimenta.

U našem smo istraživanju štakore neonatalne dobi izložili akutnoj normobaričnoj hipoksiji. Izloženost štakora hipoksiji prvog postnatalnog dana dobro oponaša hipoksičnu ozljedu mozga ljudskog fetusa u ranoj i srednjoj gestacijskoj dobi (24.-32. tjedan), razdoblju u kojem se odvija značajna proliferacija i morfogeneza moždanih regija zbog koje je mozak osobito osjetljiv na nedostatak kisika (Clowry i sur., 2014). Akutna normobarična hipoksija oponaša stanje u trudnoći do kojeg može doći zbog kontrakcije maternice, kompresije pupkovine ili višestruke trudnoće (Giussani, 2015), a koja, zbog narušavanja ionske homeostaze i inhibicije stanične aktivnosti, dovodi do blage cerebralne disfunkcije. Blagi prenatalni insulti često prođu

neprimijećeni u ranom djetinjstvu, a postaju vidljivi tek u adolescentnoj dobi u smislu neuroloških i bihevioralnih problema. Kasno uočavanje posljedica sprečava ranu intervenciju koja je preduvjet pozitivnog terapijskog ishoda.

Opisani model pogodan je za istraživanje dugotrajnih neuroloških i bihevioralnih poremećaja izazvanih hipoksijom, kao i njihove strukturne, neurokemijske i molekularno-biološke podloge. Ovaj diplomski rad bio je usredotočen na dugotrajne neurokemijske promjene u koncentraciji katekolamina u moždanom deblu, pri čemu smo pokazali da akutna neonatalna hipoksija u našim eksperimentalnim uvjetima dovodi do značajnog povećanja razine dopamina, ali ne i noradrenalina.

Raniji eksperimentalni modeli perinatalne hipoksije pokazali su kako hipoksija fetusa rezultira selektivnim i dugotrajnim poremećajima središnjeg dopaminergičkog sustava štakora koji su očitije i u odrasloj dobi (Burke i sur., 1992).

Dopaminergičke jezgre mezencefalona posebno su osjetljive na perinatalnu hipoksiju, što je imunohistokemijski pokazano na humanim posmrtnim uzorcima SN i VTA (Pagida i sur., 2013). Čini se da je hipoksija glavni regulator ekspresije TH, proteina koji regulira ključni korak u sintezi dopamina. Naime, nekoliko transkripcijskih faktora koji se aktiviraju u hipoksičnim uvjetima mogu regulirati brzinu ekspresije TH i stabilnost same mRNA (Czyzyk-Krzeska i Beresh, 1996). Također, Barath i sur. (2020) u svojoj studiji navode kako brzo povećanje razine izvanstaničnog kalija uzrokovano hipoksijom povećava oslobađanje dopamina, dok je ponovna pohrana dopamina proces ovisan o ATP-u, što u hipoksiji rezultira njegovim oslabljenim vraćanjem u stanice.

Iako u našem modelu blage prolaze neonatalne hipoksije nismo pokazali značajnu razliku u koncentraciji noradrenalina u odnosu na kontrolu, Pagida i sur. (2015) su uočili dugotrajni poremećaj u noradrenergičkom, kao i u serotonergičkom sustavu moždanog debla hipoksičnih štakora u odnosu na kontrolne. Buller i sur. (2008) su u svome istraživanju ispitali utjecaj neonatalne HI na noradrenergičke neurone moždanog debla štakora (PND3) te su primijetili značajno smanjen ukupan broj TH-pozitivnih neurona u ligiranoj u usporedbi s neligiranim stranom mozga. U oba navedena rada uvjeti izazivanja hipoksije su bili drastičniji od naših, što je mogući uzrok razlika u rezultatima vezanim za NA.

S obzirom na uključenost dopaminergičkih puteva, opisanih u Uvodu, u regulaciju ponašanja, možemo pretpostaviti da bi značajno povišena razina dopamina u moždanom deblu mogla stajati u podlozi promjena u eksploratornom ponašanju, ranije uočenih na ovom modelu (Krizman, 2019; Stipan 2020).

Naime, kad se životinja izloži promjeni okoliša, odvija se složen skup ponašanja s ciljem mapiranja novog prostora. Ključna komponenta ovog složenog obrasca ponašanja naziva se propinjanje i očituje se kao stajanje na stražnjim nogama i promatranje okoliša (Barth i sur., 2018). S obzirom na poznatu ulogu dopamina u lokomociji i motivaciji, opažena promjena u učestalosti propinjanja mogla bi biti uzrokovana izrazito povećanom koncentracijom dopamina u moždanom deblu.

Povećano propinjanje može ukazivati na poremećaj u hipokampusu. Naime, dopamin iz srednjeg mozga promiče pažnju, stvaranje memorije, prostorno učenja i sinaptičku plastičnost vezanjem za D_1 i D_5 receptore hipokampusa. Neurotransmisija dopamina u dorzalnem hipokampusu kritična je za niz bitnih funkcija, a promjena njegove koncentracije nalazi se u osnovi neuroloških poremećaja, poput poremećaja hiperaktivnosti s manjkom pažnje, ADHD (Kempadoo i sur., 2016).

Nadalje, s obzirom da talamus igra važnu ulogu u kortikalnoj komunikaciji, pretpostavlja se kako promijenjeni modulacijski utjecaj dopamina na talamus za posljedicu ima narušenu somatosenzoriku. Raspodjela aferentnih dopaminergičkih vlakana i receptora u talamusu ima značajnu ulogu u emocijama, pažnji, spoznaji i složenoj somatosenzoričkoj i vizualnoj obradi. Talamokortikalni se neuroni nalaze u središnjoj poziciji gdje se osjetne informacije s periferije prenose u moždanu koru i druge moždane strukture. Govindaiah i sur. (2010) spominju kako promjene u obrascima aktiviranja DA neurona talamokorteksa mogu biti povezane s promjenama u ponašanju.

Buduća istraživanja, usmjerena na razinu ekspresije dopaminergičkih receptora i nizvodnih elemenata DA-signalizacije u hipokampusu, talamusu i somatosenzoričkom korteksu te ciljano testiranje prostornog pamćenja i senzoričkog procesiranja, trebala bi dati poveznicu između hipoksije, narušene dopaminergičke homeostaze i dugoročno promijenjenih obrazaca ponašanja.

6. Zaključak

- U odnosu na kontrolnu skupinu, hipoksični su štakori imali značajno povišenu koncentraciju dopamina u moždanom deblu.
- Koncentracija noradrenalina u moždanom deblu nije se značajno razlikovala između eksperimentalne i kontrolne skupine životinja.
- Možemo zaključiti da izloženost štakora blagoj akutnoj hipoksiji u neonatalnoj dobi dugoročno narušava homeostazu moždanog dopamina ali ne i noradrenalina.
- Poremećena dopaminergična signalizacija mogla bi stajati u podlozi promijenjenog eksploratornog ponašanja uočenog na ovom modelu u ranijim istraživanjima.

7. Literatura

Babenko, O., Kovalchuk, I., Metz, G. A. 2015. Stress-induced perinatal and transgenerational epigenetic programming of brain development and mental health. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 48: str. 70–91.

Bahrami, S., Drabløs, F. 2016. Gene regulation in the immediate-early response process. *Adv. biol.*, 62: str. 37–49.

Barath, A. S., Rusheen, A. E., Rojas, Cabrera, J. M., Price, J. B., Owen, R. L., Shin, H., Jang, D. P., Blaha, C. D., Lee, K. H., Oh, Y. 2020. Hypoxia-Associated Changes in Striatal Tonic Dopamine Release: Real-Time in vivo Measurements With a Novel Voltammetry Technique. *Front. Neurosci.*, 18: str. 14-869.

Barth, A. M., Domonkos, A., Fernandez-Ruiz, A., Freund, T. F., Varga, V. 2018. Hippocampal Network Dynamics during Rearing Episodes. *Cell reports*, 23: str. 1706–1715.

Beaulieu, J. M., Gainetdinov, R. R. 2011. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol. Rev.*, 63: str. 182– 217.

Blaess, S., Stott, S. R. W., Ang, S. L. 2020. Chapter 17 - The generation of midbrain dopaminergic neurons, Editor(s): Rubenstein, J., Rakic, P., Chen, B., Y. Kwan K. *Patterning and Cell Type Specification in the Developing CNS and PNS (Second Edition)*. Academic Press. SAD: str. 369-398.

Brochu, M. E., Girard, S., Lavoie, K., Sebire, G. 2011. Developmental regulation of the neuroinflammatory responses to LPS and/or hypoxia-ischemia between preterm and term neonates: an experimental study. *J. Neuroinflammation*, 8: str. 55.

Brown, J. H., Makman, M. H. 1972. Stimulation by dopamine of adenylate cyclase in retinal homogenates and of adenosine-3':5'-cyclic monophosphate formation in intact retina. *Proc. Nat. Acad. Sci.* SAD, 69: str. 539–543.

Buller, K., Wixey, J., Pathipati, P. et al. 2008. Selective Losses of Brainstem Catecholamine Neurons After Hypoxia-Ischemia in the Immature Rat Pup. *Pediatr. Res.*, 63: str. 364–369.

Burke, R. E., Macaya, A., DeVivo, D., Kenyon, N., and Janec, E. M. 1992. Neonatal hypoxic-ischemic or excitotoxic striatal injury results in a decreased adult number of substantia nigra neurons. *Neuroscience*, 50: str. 559–569.

Chen, Y., Herrera-Marschitz, M., Bjelke, B., Blum, M., Gross, J., Andersson, K. 1997. Perinatal asphyxia-induced changes in rat brain tyrosine hydroxylase-immunoreactive cell body number: effects of nicotine treatment. *Neurosci. Lett.*, 221: str. 77–80.

Ciccarelli, M., Sorriento, D., Coscioni, E., Iaccarino, G., Santulli, G. 2017. Chapter 11 Adrenergic Receptors, Editor(s): Jonathan C. Schisler, Charles H. Lang, Monte S. Willis, *Endocrinology of the Heart in Health and Disease*, Academic Press. SAD: str. 285-315.

- Clowry, G. J., Basuodan, R., Chan, F. 2014. What are the Best Animal Models for Testing Early Intervention in Cerebral Palsy? *Front. Neurol.*, 5: str. 258.
- Czyzyk-Krzeska, M. F., Beresh, J. E. 1996. Characterization of the hypoxia-inducible protein binding site within the pyrimidine-rich tract in the 3'-untranslated region of the tyrosine hydroxylase mRNA. *J. Biol. Chem.*, 271: str. 3293–3299.
- de Vries, L. S., Groenendaal, F. 2010. Patterns of neonatal hypoxic–ischaemic brain injury. *Neuroradiology*, 52: str. 555–566.
- Desplats, P. A., 2015. Perinatal programming of neurodevelopment: epigenetic mechanisms and the prenatal shaping of the brain. *Adv. Neurobiol.*, 10: str. 335–361.
- Falck, B., et al. 1962. Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J. Histochem. Cytochem.*, 10: str. 348–354.
- Frederick, A. L., Stanwood, G. D 2009. Drugs, biogenic amine targets and the developing brain. *Dev. Neurosc.*, 31: str. 7-22.
- Giussani D. A. 2016. The fetal brain sparing response to hypoxia: physiological mechanisms. *J. Physiol.*, 594.5: str. 1215-1230.
- Govindaiah, G., Wang, Y., Cox, C. L 2010. Dopamine enhances the excitability of somatosensory thalamocortical neurons. *Neuroscience*, 170: str. 981-91.
- Grimes, M. T., Powell, M., Gutierrez, S. M., Darby-King, A., Harley, C. W., McLean, J. H. 2015. Epac activation initiates associative odor preference memories in the rat pup. *Learn. Mem.*, 22: str. 74–82.
- Gunn, A. J., Bennet, L., 2009. Fetal hypoxia insults and patterns of brain injury: insights from animal models. *Clin. Perinatol.*, 36: str. 579–593.
- Himmelman, K., Hagberg, G., Wiklund, L. M., Eek, M. N., Uvebrant P. 2007. Dyskinetic cerebral palsy: a population-based study of children born between 1991 and 1998. *DMCN*, 49: str. 246–251.
- Hussain, L. S., Reddy, V., Maani, C. V. 2021. Physiology, Noradrenergic Synapse. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls SAD.
- Hutter, D., Kingdom, J., Jaeggi, E. 2010. Causes and Mechanisms of Intrauterine Hypoxia and Its Impact on the Fetal Cardiovascular System: A Review. *Int. J. Pediatr.*: str. 1-9.
- Kebabian, J. W., Petzold, G. L., Greengard, P. 1972. Dopamine-sensitive adenylate cyclase in caudate nucleus of rat brain, and its similarity to the 'dopamine receptor'. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69: str. 2145–2149.
- Kempadoo, K. A., Mosharov, E. V., Choi, S. J., Sulzer, D., Kandel, E. R. 2016. Dopamine release from the locus coeruleus to the dorsal hippocampus promotes spatial learning and memory. *PNAS*, 113: str. 14835-14840.

- Kingdom, J. C. P., Kaufmann, P. 1997. Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia. *Placenta*, 18: str. 613–621.
- Krizman, M. 2019. Posljedice neonatalne hipoksije na ponašanje štakora. Diplomski rad. Prirodoslovno - matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Kuhar, J. M., Minneman, K., Muly, E. C. 2006. Catecholamines. U: Siegel, G.J., Albers, R.W., Brady, S.T., Price, D.L. (ur.) *Basic Neurochemistry*. Elsevier Academic Press, London: str. 211-226.
- Lavrenova, S. M., Nalivaeva, N. N., Zhuravin, I. A. 2003. Activity of Acetylcholinesterase in the Motor-Sensory Cortex in Early Ontogenesis of Rats Exposed to Prenatal Hypoxia. *J. Evol. Biochem. Physiol.*, New York, 39:str. 203-210.
- Le Moine, C., Bloch, B. 1995. D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J. Comp. Neurol.*, 355: str. 418–426.
- Levine, S. 1960. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am. J. Pathol.* 36: str. 1–17.
- Li, F., Wong, R., Luo, Z., Du, L., Turlova, E., Britto, L. R. G., Feng, Z. P., Sun, H. S. 2019. Neuroprotective effects of AG490 in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. Mol. larger in males emerge before those larger in females. *Nat. Commun.*, 9: str. 2615.
- Lopez-Barneo, J., Pardal, R., Ortega-Sáenz, P. 2001. Cellular mechanism of oxygen sensing. *Annu. Rev. Physiol.*, 63: str.259-87.
- Maggio, R. Aloisi, G., Silvano, E., Rossi, M., Millan, M. J. 2009. Heterodimerization of dopamine receptors: new insights into functional and therapeutic significance. *Parkinsonism Relat. Disord.*, 15(Suppl 4): str. 2–7.
- Marshall, F. H. 2001. Heterodimerization of G-protein-coupled receptors in the CNS. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 1: str. 40–44.
- Millar, L. J., Shi, L., Hoerder-Suabedissen, A., Molnar, Z., 2017. Neonatal hypoxia ischaemia: mechanisms, models, and therapeutic challenges. *Front. Cell. Neurosci.* 11: str. 78.
- Mishra, A., Singh, S., Shukla, S. 2018. Physiological and Functional Basis of Dopamine Receptors and Their Role in Neurogenesis: Possible Implication for Parkinson's disease. *J. Exp. Neurosci.*, 12: 1179069518779829.
- Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., and Caron, M. G. 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.*, 78: str. 189–225.
- Money, K. M., Stanwood, G. D. 2013. Developmental origins of brain disorders: roles for dopamine. *Front. Cell Neurosci.*, 7: str. 260.
- Muly, E. C., Szigeti, K., Goldman-Rakic, P. S. 1998. D1 receptor in interneurons of macaque prefrontal cortex: distribution and subcellular localization. *J. Neurosci.*, 18: str.10553–10565.

- Nalivaeva, N. N., Turner, A. J., Zhuravin, I. A., 2018. Role of prenatal hypoxia in brain development, cognitive functions, and neurodegeneration. *Front. Neurosci.*, 12.
- O'Donnell, J., Zeppenfeld, D., McConnell, E., Pena, S., Nedergaard, M. 2012. Norepinephrine: a neuromodulator that boosts the function of multiple cell types to optimize CNS performance. *Neurochem. Res.*, 37: str. 2496-512.
- O'Neill, R. D. 2005. Long-Term Monitoring of Brain Dopamine Metabolism In Vivo with Carbon Paste Electrodes. *Sensors (Basel)*, 5: str. 317-342.
- Pagida, M. A., Konstantinidou, A. E., Korelidou, A., Katsika, D., Tsekoura, E., Patsouris, E., Panayotacopoulou, M. T. 2015. The Effect of Perinatal Hypoxic/Ischemic Injury on Tyrosine Hydroxylase Expression in the Locus Coeruleus of the Human Neonate. *Dev. Neurosci.*, 38: str. 41-53.
- Pagida, M. A., Konstantinidou, A. E., Tsekoura, E., Mangoura, D., Patsouris, E., Panayotacopoulou, M. T. 2013. Vulnerability of the mesencephalic dopaminergic neurons of the human neonate to prolonged perinatal hypoxia: an immunohistochemical study of tyrosine hydroxylase expression in autopsy material. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 72: str. 337–350.
- Pearce, W., 2006. Hypoxic regulation of the fetal cerebral circulation. *J. Appl. Physiol.*, 100: str. 731–738.
- Peers, C. 2002. The G.L. Brown Prize Lecture. Hypoxic regulation of ion channel function and expression. *Exp. Physiol.*, 87: str. 413–422.
- Pellicer, B., Herraiz, S., Leal, A., Simón, C., and Pellicer, A. 2011. Prenatal brain damage in preeclamptic animal model induced by gestational nitric oxide synthase inhibition. *J. Pregnancy*: str. 809569.
- Rice, J. E., Vannucci, R. C., Brierley, J. B. 1981. The Influence of Irmnahty on Hypoxic-Ischemic Brain Damage in the Rat. *Ann. Neurol.*, 9: str. 131–141.
- Richardson, B., Korkola, S., Asano, H., Challis, J., Polk, D., and Fraser, M., 1996. Regional blood flow and the endocrine response to sustained hypoxemia in the preterm ovine fetus. *Pediatr. Res.*, 40: str. 337–343.
- Santana, N., Mengod, G., and Artigas, F. 2009. Quantitative analysis of the expression of dopamine D1 and D2 receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb. Cortex*, 19: str. 849–860.
- Schultz, W., 1997. Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 7: str. 191–197.
- Schwarz, L. A., Luo, L. 2015. Organization of the locus coeruleus-norepinephrine system. *Curr. Biol.*, 25: str. 1051-1056.

- Silvestro, S., Calcaterra, V., Pelizzo, G., Bramanti, P., and Mazzon, E., 2020. Prenatal Hypoxia and Placental Oxidative Stress: Insights from Animal Models to Clinical Evidences. *Antioxidants*, 9: str. 414.
- Stanford, S. 2013. Adrenaline and Noradrenaline: Introduction. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Stipan, M., 2020. Utjecaj neonatalne hipoksije u hipobaričnim uvjetima na ponašanje mladunaca štakora. Diplomski rad. Prirodoslovno - matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Stockwell, B. R., Angeli, J. P. F., Bayir, H. 2017. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease. *Cell*, 171: str. 273–85.
- Tashima, L., Nakata, M., Anno, K., Sugino, N., Kato, H. 2001. Prenatal influence of ischemia-hypoxia-induced intrauterine growth retardation on brain development and behavioral activity in rats. *Biol. Neonate.*, 80: str. 81-7.
- Tyul'kova, E. I., Semenov, D. G., Vataeva, L. A., Belyakov, A. V., Samoilov, M. O 2011. Effect of prenatal hypobaric hypoxia on glutamatergic signal transduction in rat brain. *Bull Exp Biol Med.*, 1: str. 275-7.
- Usiello, A., Baik, J. H., Rougé-Pont, F., Picetti, R., Dierich, A., LeMeur, M., Piazza, P. V., Borrelli, E. 2000. Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature.*, 408, str. 199-203.
- Vannucci, R. C., Vannucci, S. J., 1997. A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 835, str. 234–249.
- Volpe, J. J., Inder, T. E., Darras, B. T., de Vries, L. S., du Plessis, A. J., Neil, J. J., Perlman, J. M. 2018. *Volpe's Neurology of the Newborn*. Sixth Edit. Elsevier, Philadelphia, SAD.
- Wang, H., Xu, J., Lazarovici, P., Quirion, R., Zheng, W. 2018. cAMP Response Element-Binding Protein (CREB): A Possible Signaling Molecule Link in the Pathophysiology of Schizophrenia. *Front. Mol. Neurosci.*, 11: str. 255.
- Hou, X. L., Zhou, Y. X., Zhou, C. L., Ding, H. Y., Ding, H. S. 2009. Comparison of the models of acute hypoxia and hypoxic-ischemia in newborn piglets. *Peking Univ. J.* 41: str. 702-6.
- 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: e83589.
- Zhou, J. 2004. Norepinephrine transporter inhibitors and their therapeutic potential. *Drugs Future*, 29: str. 1235-1244.

8. Životopis

Zovem se Kristina Košić i rođena sam 28. listopada 1996. godine u gradu Varaždinu. Odrasla sam u selu Vidovec kao najstarija od petero braće. Osnovnoškolsko obrazovanje sam stekla u OŠ Vidovec, a srednjoškolsko u Drugoj gimnaziji Varaždin. Godine 2016. upisala sam preddiplomski studij biologije s modulom kemije na Odjelu za biologiju, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku. Tijekom trogodišnjeg obrazovanja, dvije sam godine bila demonstrator iz kolegija Opća zoologija i Stablašice, sudjelovala sam na VI. Festivalu znanosti kao predavač s temom *Otkriće fotosinteze*, također sam sudjelovala na projektu popularizacije znanosti *Biologija* i *Mini Maker Faire* te sam koautor znanstveno popularnog članka *Umjetnost fotosinteze* objavljenog u 108. volumenu časopisa Priroda. Diplomski sam studij nastavila 2018. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu upisavši diplomski studij Molekularne biologije. Godine 2019. uspješno sam položila tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama; *LabAnim* A kategorija, u trajanju od 60 sati. Laboratorijsku stručnu praksu sam odradila na Zavodu za animalnu fiziologiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom Prof. dr. sc. Dubravke Hranilović. Uz studij, dodatna znanja i vještine stekla sam kroz studentske poslove u proizvodnji, marketingu i prodaji.

PUBLIKACIJE

Nikolić, B., Trnski, S., Košić, K., Hranilović, D., Jovanov Milošević, N. 2021. Long-term changes of *Drd1* and *Drd2* gene expression in a rat model of mild neonatal normobaric hypoxia // ENCODS 2021 - Book of abstracts, Glasgow, UK, str. P5A08-P5A08

Nikolić, B., Trnski, S., Košić, K., Hranilović, D., Jovanov Milošević, N. 2020. Increased rearing and brainstem dopamine levels in a rat model of mild neonatal normobaric hypoxia // FENS 2020 - Virtual Forum, 11-15 July 2020. Virtualni forum (Glasgow, UK), str. 1-1.