

# Utjecaj perifernih makrofaga na upalne procese nakon ishemijskog moždanog udara u miša

---

Vuraić, Kristijan

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:217:567446>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-10**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Kristijan Vuraić

**Utjecaj perifernih makrofaga na upalne  
processe nakon ishemijskog moždanog udara  
u miša**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Kristijan Vuraić

**Effect of peripheral macrophages on  
neuroinflammation after ischemic brain  
stroke in mice**

Master thesis

Zagreb, 2022

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju zavoda za histologiju i embriologiju na Medicinskom fakultetu u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Srećka Gajovića, te komentorstvom doc. dr. sc. Sofie Ane Blažević. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije (mag. biol. exp.).

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Srećku Gajoviću na mentorstvu i pomoći te susretljivosti tokom izrade diplomskog rada.*

*Zahvaljujem doc. dr. sc. Sofii Ani Blažević na komentorstvu, spremnosti za pomoć i vođenju kroz proces pisanja i prijave diplomskog rada i ispita.*

*Hvala doktorandici Sanji Srakočić za pomoć u izvođenju eksperimentalne faze te na iznimnom strpljenju i odgovoru na svako postavljeno pitanje s moje strane, a bilo ih je mnogo.*

*Hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su uvijek stajali uz mene i kojima sam se mogao okrenuti u svakom trenutku svog studiranja za bilo kakvu pomoć i potporu.*

*Hvala svim kolegama koji su uz mene probdjeli mnoge sate za knjigom i na druženju nakon i tokom svakog predavanja, praktikuma i ispita.*

*Hvala svima koji ste mi pomogli oblikovati se u ovu osobu koja jesam danas.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Utjecaj perifernih makrofaga na upalne procese nakon ishemijskog moždanog udara u miša

Kristijan Vuraić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U imunosne stanice sa sposobnošću fagocitoze spadaju makrofagi koji se nalaze u cijelom tijelu, dok u mozgu istu funkciju obavljaju stanice mikroglije. Spremište perifernih makrofaga kao i svih imunosnih stanica je slezena. Cilj ovog istraživanja je bio ustvrditi utjecaj perifernih makrofaga na upalne procese i oporavak nakon izazvanog ishemijskog moždanog udara kod miša. Miševi su podijeljeni u dvije skupine po šest miševa. Jednoj skupini je odstranjena slezena, kako bi se smanjio broj dostupnih makrofaga, dok drugoj nije. Nakon izazivanja moždanog udara miševi su žrtvovani 28. dan i napravljeni su prerezi korteksa, hipokampusa i striatuma. Ti prerezi su bojani imunohistokemijskim metodama na proupalne i specifične stanične markere kako bi se odredila prisutnost makrofaga i mikroglije na mjestu ishemijske ozljede. Nakon statističke obrade pokazano je da je upala jača kod skupine miševa kojoj je odstranjena slezena što ukazuje na važnost makrofaga u ublažavanju upale i potencijalni brži oporavak.

Ključne riječi: CD68, TLR2, IBA1, ishemijski moždani udar, mikroglija, makrofazi  
(51 stranica, 33 slike, 3 tablice, 43 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Srećko Gajović

Komentor: doc. dr. sc. Sofija Ana Blažević

Ocjenitelji:

Doc. dr. sc.

Izv. prof. dr. sc. (prije imena nastavnika navesti njihove titule)

Prof. dr. sc.

Rad prihvaćen: (navesti datum sjednice Povjerenstva za diplomske radove na kojoj je rad prihvaćen)

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master thesis

### Effect of peripheral macrophages on neuroinflammation after ischemic brain stroke in mice

Kristijan Vuraić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Macrophages and microglia are immune cells that belong to the innate immune group of cells and have the capacity to phagocytize. Macrophages can be found throughout the body while microglia can be found in the brain. The main reservoir of peripheral macrophages is the spleen. The aim of this study was to study the effect of peripheral macrophages on neuroinflammation and recovery after ischemic brain stroke in mice. The mice were divided into two groups of six mice. One group underwent splenectomy while the other was sham operated. Ischemic brain stroke was then induced in both groups on the left hemisphere of the brain and mice were sacrificed on the twenty-eighth day, brain slices consisting of the cortex, hippocampus and striatum were made. Those slices were dyed by immunohistochemistry for specific inflammation and cell markers so that the quantity of cells and severeness of inflammation could be measured at the ischemic injury. Results showed that the inflammation was more severe in mice that underwent splenectomy which potentially points to the importance of macrophages in lessening inflammation and promoting recovery.

Keywords: CD68, TLR2, IBA1, ischemic brain stroke, microglia, macrophages  
(51 pages, 33 figures, 3 tables, 43 references, original in: croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: prof. dr. sc. Srećko Gajović

Co-mentor: doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Reviewers:

Asst. Prof. , PhD

Assoc. Prof. , PhD

Prof. , PhD

Thesis accepted:

1. UVOD .....	1
1.1. MOŽDANI UDAR.....	1
1.2. UPALA NAKON MOŽDANOG UDARA.....	2
1.3. RECEPTOR TLR2 I NJEGOVA ULOGA NAKON ISHEMIJSKOG MOŽDANOG UDARA.....	3
1.4. ŽIVOTINJSKI MODELI MOŽDANOG UDARA.....	5
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	8
3. MATERIJALI I METODE .....	9
3.1. ŽIVOTINJE.....	9
3.2. MATERIJALI I UREĐAJI .....	9
3.3. METODE .....	10
3.3.1. UKLAPANJE ZA POTREBE IMUNOHISTOKEMIJE .....	10
3.3.2. REZANJE MOZGOVA NA KRIOTOMU .....	11
3.3.3. IMUNOHISTOKEMIJA .....	13
3.3.5. OBRADA REZULTATA IMUNOHISTOKEMIJE .....	16
3.3.6. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA .....	17
4. REZULTATI.....	19
4.1. KORELACIJA REZULTATA MJERENJA OPTIČKE GUSTOĆE I POVRŠINE SIGNALA .....	19
4.2. AKTIVACIJA MIKROGLIJE NAKON ISHEMIJSKE LEZIJE.....	25
4.4. UTJECAJ MAKROFAGA NA AKTIVNOST ASTROCITA I BROJ NEURONA NAKON ISHEMIJSKE LEZIJE.....	35
5. RASPRAVA.....	42
6. ZAKLJUČAK .....	46
7. LITERATURA.....	47
8. ŽIVOTOPIS .....	51



# POPIS KRATICA

ANOVA - analiza varijance od engl. *analysis of variance*

CD - grupa diferencijacije od engl. *cluster of differentiation*

DAMP - molekularni obrasci povezani s ozljedom od engl. *damage associated molecular patterns*

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol

GFAP - glijalni fibrilarni kiseli protein od engl. *glial fibrillary acidic protein*

Iba1 - ionizirana kalcij vezujuća adapter molekula 1 od engl. *ionized calcium-binding adapter molecule 1*

IL - interleukin od engl. *interleukin*

LZRN – Laboratorijski zavod za regenerativnu neurologiju

MMP - matriks metaloproteinaza od engl. *matrix metalloproteinase*

NeuN - heksaribonukleotid vezujući protein-3 od engl. *hexaribonucleotide binding protein-3*

PRR - receptori za prepoznavanje obrazaca od engl. *pattern recognition receptors*

ROI - regija od interesa od engl. *region of interest*

ROS - reaktivni kisikovi radikali od engl. *reactive oxygen species*

SPLX – splenektomirana skupina, odnosno skupina kojoj je izvađena slezena

SPLX-SHAM – skupina koja je lažno operirana i nema izvađenu slezenu, nego samo kirurški rez

TGF - faktor rasta tumora od engl. *tumor growth factor*

Th - pomoćnički T limfociti od engl. *helper T lymphocytes*

Tlr - tollu sličan receptor od engl. *toll like receptor*

PBS - fosfatni pufer od engl. *phosphate buffered saline*

tMCAO - privremena okluzija središnje cerebralne arterije od engl. *transient middle cerebral artery occlusion*

TNF - faktor nekroze tumora od engl. *tumor necrosis factor*

# 1. UVOD

## 1.1. MOŽDANI UDAR

Moždani udar je sindrom u kojem zbog poremećaja krvne opskrbe mozga dolazi do gubitka cerebralnih funkcija. Posljedice moždanog udara mogu sezati od oporavka do smrti (Bonita 1992). Postoji mnogo različitih podjela moždanog udara s puno podtipova. Prema Amarenco i sur. (2009) pet je glavnih tipova moždanog udara, a to su ishemijski, hemoragijski, subarahnoidno krvarenje, tromboza cerebralnih vena i udar leđne moždine. Ta klasifikacija ima dalje podtipove za svaku vrstu i napravljena je nakon evaluacije prednosti i mana različitih klasifikacija. S druge strane, prema Corrigan i sur. (2013) moždani udar se dijeli na dvije osnovne skupine: ishemijski i hemoragijski. U ovom radu će se koristiti ta podjela.

Rizični faktori za moždani udar su dob, krvni tlak, pušenje cigareta, serumski kolesterol, dijabetes i bolesti srca. Samim starenjem se povećava šansa za sve tipove moždanog udara i posljedično smrt. Ista stvar je i s povećanjem krvnog tlaka gdje povišeni sistolički tlak više povećava šanse za sve moždane udare, nego povišenje dijastoličkog krvnog tlaka. Primijećeno je kako je serumski kolesterol pozitivno proporcionalan s nastankom ishemijskog moždanog udara, dok je obrnuto proporcionalan s nastankom hemoragijskog moždanog udara. Dijabetes također povećava šanse za smrt od ishemijskog moždanog udara i u nešto manjoj mjeri za smrt od hemoragijskog moždanog udara. Što se tiče bolesti srca, osnovni je rizik fibrilacija atrijskih, dok osobe koje su već imale srčani udar imaju povećane šanse za smrt od ishemijskog moždanog udara, ali niže šanse za smrt od hemoragijskog (Neaton i sur. 1993).

Ishemijski moždani udar je prevalentniji oblik i nastaje opstrukcijom ili blokadom krvotoka kroz cerebralne arterije. Hemoragijski moždani udar je okarakteriziran lokalnim krvarenjem u mozgu i puno je smrtonosniji. Za ishemijski moždani udar klasična terapija je aktivator tkivnog plazminogena koja se mora primijeniti unutar tri sata od udara. U liječenju posljedica moždanog udara značajna je rehabilitacija pacijenta od kojih 80% zadrži ili ponovno nauči sposobnost hodanja (Brott i Bogousslavsky 2000). Kod hemoragijskog moždanog udara je smrtnost unutar prvih 30 dana između 40% i 80%. Postupak liječenja je kirurzijom, kraniotomijom i uklanjanjem hematoma iako nema dovoljno pouzdanih podataka o učinkovitosti ovih postupaka. Kod osobe koja je doživjela hemoragijski moždani udar potrebno je uspostaviti regularnu respiraciju i stabilnost

krvnog tlaka koji se može poremetiti zbog krvarenja. U tu svrhu koriste se lijekovi koji snižavaju krvni tlak, a time i samo krvarenje. Od ostalih pristupa mogu se koristiti lijekovi koji potiču hemostazu i stvaranje ugruška na mjestu krvarenja (Lapchak i Araujo 2007).

U novije vrijeme rade se istraživanja u kojima se nakon moždanog udara pokušava potaknuti neuroregeneracija. Primjerice, u jednoj studiji na štakorima Li i sur. (2005) su koristili mezenhimalne stanice koštane srži i primijetili su kako se povećava plastičnost mozga, sinaptogeneza, neurogeneza, a smanjuje apoptotička smrt stanica. U drugoj studiji Rabinovich i sur. (2005) su koristili stanice ljudskog fetalnog živčanog tkiva koje su injektirali u subarahnoidni prostor. Pokazalo se da takve stanice potiču mijelinizaciju i sinaptogenezu i time se pacijentima vratila sposobnost govora, bolja kontrola nad udovima i ojačao im je mentalni status.

## 1.2. UPALA NAKON MOŽDANOG UDARA

Nastankom ishemije dolazi do povećanja koncentracije reaktivnih kisikovih oblika (od engl. *reactive oxygen species* - ROS) koje proizvode neuroni i endotelne stanice žila. Zbog nastanka ROS-a dolazi do smanjenja koncentracije dušikovog monoksida što privlači trombocite i leukocite na mjesto ozljede. Leukociti povećavaju oksidativni stres i time pospješuju narušavanje krvno-moždane barijere (Vidale i sur. 2017). Neutrofili su među prvim imunosnim stanicama koje dolaze do mjesta ozljede. Njihova koncentracija najviše poraste unutar 24 sata i ostaju do preko tri dana na mjestu ozljede (Ahmad i Graham 2010). Neutrofili potiču nastanak upale stvaranjem ROS-a (poput superoksida), otpuštanjem raznih kemokina, poput interleukina 8 (od engl. *interleukin 8* – IL-8) koji privlače druge imunosne stanice, lučenjem proupalnih citokina interleukina 6 (od engl. *interleukin 6* – IL-6) i faktora nekroze tumora  $\alpha$  (od eng. *tumor necrosis factor  $\alpha$*  - TNF- $\alpha$ ) (Jin i sur. 2013) te ispuštanjem matriks metaloproteinaze 9 (od engl. *matrix metalloproteinase 9* - MMP-9) koja narušava međustaničnu tvar (Iadecola i Anrather 2011). Usporedno uz narušavanje krvno-moždane barijere, stanice ispuštaju signale s molekularnim obrascima povezanim s ozljedom (od engl. *damage associated molecular patterns* - DAMP) koje prepoznaju receptori za prepoznavanje obrazaca (od engl. *pattern recognition receptors* - PRR) na stanicama mikroglije (Anrather i Iadecola, 2016). Nakon aktivacije, mikroglija djeluje citotoksično na neurone i potiče upalu lučenjem ROS-a i TNF- $\alpha$  (Kim i Cho 2016). S druge strane, mikroglija također ima i neuroprotektivnu ulogu. To postiže lučenjem faktora rasta tumora  $\beta$  (od engl. *tumor growth factor*

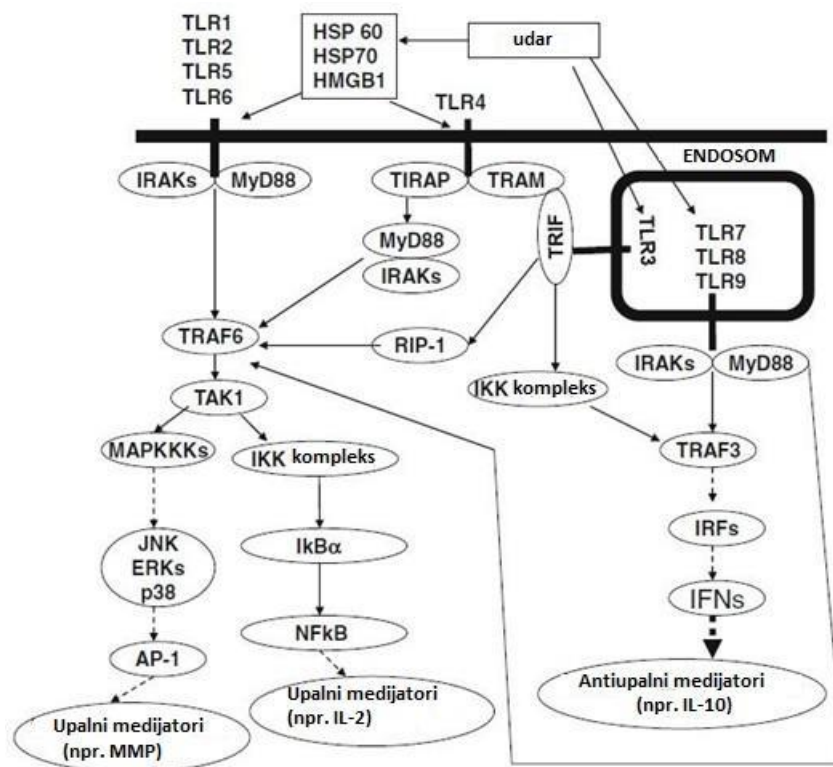
$\beta$  - TGF- $\beta$ ) i drugih neurotrofnih čimbenika te fagocitozom neutrofila koji potiču ekscitotoksičnost (Jin i sur., 2010). Mikroglia je stanica urođene imunosti sa sposobnošću fagocitoze i nalazi se isključivo u mozgu. Periferni makrofagi se u normalnim homeostatskim uvjetima ne nalaze u mozgu jer ne mogu proći krvno-moždanu barijeru. Nakon narušavanja krvno-moždane barijere, oni dolaze na mjesto ozljede u mozgu gdje mogu imati proupalnu ili antiupalnu ulogu. Tu dvostruku ulogu ima i mikroglia i ta sposobnost se naziva polarizacija. Polariziraju kada je tkivo u kojem se nalaze ozlijeđeno na bilo koji način (mehanički, kemijski, zbog prisutnosti patogena itd.). Makrofagi i mikroglia koji su polarizirani u M1 tip djeluju proupalno lučenjem citokina TNF- $\alpha$  i interleukina 1 $\beta$  (od engl. *interleukin 1 $\beta$*  - IL-1 $\beta$ ) i kemokina monocitni kemoatraktantni protein 1 (od engl. *monocyte chemoattractant protein-1* – MCP-1) između ostalih. M2 tip makrofaga i mikroglia smanjuje upalu i djeluje neuroprotektivno lučenjem TGF- $\beta$  i interleukina 10 (od engl. *interleukin 10* - IL-10) te fagocitozom apoptotičnih vezikula nakon smrti stanica (Jin i sur. 2013).

U mozgu nakon ishemijskog udara također su prisutne i dendritičke stanice koje imaju povećanu ekspresiju faktora tkivne snošljivosti II (od engl. *major histocompatibility complex II* – MHCII) i služe kao antigen prezentirajuće stanice T limfocitima s periferije. Pomoćnički T limfociti 1 s grupom diferencijacije 4 (od engl. *helper T lymphocytes 1 with cluster of differentiation 4* - Th<sub>1</sub> CD4+) luče proupalne citokine interleukin 2 (od engl. *interleukin 2* - IL-2), interleukin 12 (od engl. *interleukin 12* - IL-12), interferon  $\gamma$  (od engl. *interferon  $\gamma$*  - IFN- $\gamma$ ) i TNF- $\alpha$  koji zatim potiču djelovanje citotoksičnih T limfocita s grupom diferencijacije 8 (od engl. *cytotoxic T lymphocytes with cluster of differentiation 8* - T<sub>c</sub> CD8+). U mozak dolaze i CD4+ Th<sub>2</sub> limfociti koji zajedno s regulatornim T limfocitima (od engl. *regulatory T lymphocytes* – T<sub>reg</sub>) stanicama djeluju protuupalno (Jin i sur. 2010).

### 1.3. RECEPTOR TLR2 I NJEGOVA ULOGA NAKON ISHEMIJSKOG MOŽDANOG UDARA

Tollu sličan receptor 2 (od eng. *toll-like receptor 2* - Tlr2) se nalazi na površini stanične membrane. Sastoji se od vanjske domene koja veže ligand i građena je od ponavljajućih sekvenci leucina, transmembranske i unutarnje domene nazvane Toll-interleukin receptor (od engl. *toll-interleukin receptor* – TIR). Prilikom aktivacije receptor Tlr2 heterodimerizira s drugim

receptorima gdje se njihove TIR domene vežu, aktiviraju i zatim pokreću druge unutarstanične signalne puteve (Punt i sur. 2019). Nakon aktivacije TIR domene Tlr2 receptora za nju se veže adaptorski protein MyD88 čime se i aktivira (Sakata i sur. 2007). On dalje aktivira porodicu kinaza asociranih s interleukinom 1 (od engl. *interleukin-1 associated kinase* – IRAK). One zatim fosforiliraju i aktiviraju tumor nekrozni faktor asocirani faktor 6 (od engl. *TNF associated factor 6* – TRAF6) koji nizvodno aktivira kinazu 1 aktiviranu transformirajućim faktorom rasta  $\beta$  (od eng. *transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1* – TAK1). TAK1 zatim može pokrenuti dva signalna puta (Slika 1), Mitogenom aktivirana protein kinaza kinaze kinaze (od eng. *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase* – MAPKKK) put ili nuklearni faktor  $\kappa$ B put (od eng. *Nuclear factor  $\kappa$ B* – Nf $\kappa$ B) (Jin i sur. 2013).



Slika 1. signalni put TLR nakon ishemijskog moždanog udara. TLR signalni putevi se mogu aktivirati nakon moždanog udara i proizvesti niz proupalnih i antiupalnih odgovora. Preuzeto i prilagođeno od Jin i sur. (2013.).

Porodica MAPKKK se sastoji od četiri glavne kinaze: ekstracelularne signalom regulirane kinaze 1/2 (od eng. *extracellular signal regulated kinase 1/2* – ERK1/2), ekstracelularne signalom

regulirane kinaze 5 (od eng. *extracellular signal regulated kinase 5* - ERK5), c-JUN N-terminalne kinaze (od eng. *C-JUN N-terminal kinase* – JNK) i p38 mitogen aktivirane protein kinaze (*p38 mitogen-activated protein kinase* – p38 MAPK) (Nithianandarajah-Jones i sur. 2012). ERK5 put nije dovoljno istražen, no sumnja se kako bi mogao imati ulogu u antiupalnim procesima. Prilikom staničnog stresa aktivacijom ERK1/2 puta dolazi do proizvodnje proupalnih citokina poput IL-1 $\beta$  (Wang i sur. 2004). Aktivacijom p38 MAPK također dolazi do produkcije proupalnih citokina od kojih su najznačajniji TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i IL-8. JNK put je sličan p38 MAPK putu i također uzrokuje produkciju proupalnih citokina kao i p38 MAPK put (Barnes 2010). Kod ishemijskog moždanog udara pokazalo se da ta dva puta sudjeluju u pogoršanju nakon moždanog udara (Jin i sur. 2013).

Prije aktivacije Nf $\kappa$ B puta, TAK1 aktivira inhibitorski kompleks inhibitora kinaze  $\kappa$  $\beta$  (od eng. *I $\kappa$ B kinase* – IKK). Taj kompleks se sastoji od tri podjedinice: esencijalni modifikator Nf $\kappa$ B (od eng. *Nf $\kappa$ B essential modifier* – NEMO), IKK $\alpha$  i IKK $\beta$ . U tom kompleksu IKK $\beta$  podjedinica se fosforilira od strane TAK1. IKK $\beta$  podjedinica dalje fosforilira inhibitor Nf $\kappa$ B (od eng. *inhibitor of Nf $\kappa$ B* – I $\kappa$ B) koji je u citoplazmi vezan za Nf $\kappa$ B i time ga drži inaktiviranim. Fosforilacijom I $\kappa$ B on se degradira i Nf $\kappa$ B odlazi u jezgru i pokreće ekspresiju gena (Napetschnig i Wu 2013). Nf $\kappa$ B put uzrokuje proizvodnju mnogih proupalnih citokina, adhezijskih molekula i matriks metaloproteinaza što sve pridonosi upali. Nf $\kappa$ B obitelj se sastoji od 5 članova od kojih su p50 i p65 najznačajniji u ishemijskom moždanom udaru gdje povećavaju volumen područja zahvaćen udarom (Ridder i Schwaninger 2009).

#### 1.4. ŽIVOTINJSKI MODELI MOŽDANOG UDARA

Za model moždanog udara koriste se velike i male životinje. Od malih se najčešće koriste miševi i štakori, dok od velikih se koriste psi, mačke, ovce, zečevi, svinje i ne-ljudski primati. Glavna razlika između velikih i malih životinja je u anatomiji mozga. Velike životinje imaju girencefalički mozak, dok manje životinje imaju lizencefalički mozak. Girencefalički mozak ima giruse kao i ljudski mozak te ima veći udio bijele tvari naspram sive tvari. Sam moždani udar se najčešće manifestira u području bijele tvari pa bi prema tome veće životinje bile pogodniji model za istraživanja (Sorby-Adams i sur. 2018).

Privremena okluzija središnje cerebralne arterije (engl. *transient middle cerebral artery occlusion* - tMCAO) je metoda koja izaziva patologiju ishemijskog moždanog udara, a može se postići intraluminalnim filamentom koji se progura kroz unutarnju karotidnu arteriju kako bi se prekinuo dotok krvi do središnje cerebralne arterije. Mjesto zatvaranja središnje cerebralne arterije je prikazana na Slici 2. Ovom metodom moždani udar zahvaća područje striatuma, okcipitalni korteks te talamus i hipotalamus. Prednost ove metode je što je minimalno zahtjevna i simulira uvjete koji nastaju kod ishemijskog moždanog udara u ljudi što uključuje narušavanje krvno-moždane barijere, smrt neurona, upalu u mozgu te promjenu u ponašanju koja se može utvrditi bihevioralnim testovima (Fluri i sur. 2015).

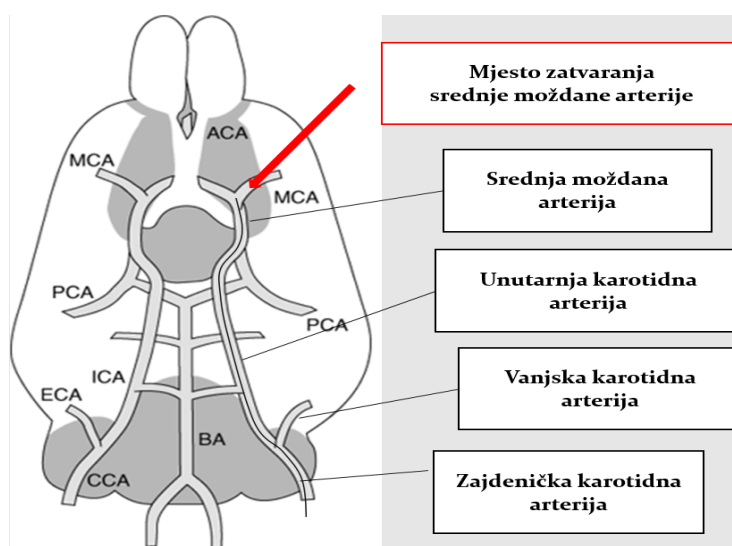
tMCAO se može napraviti i kranijektomijom što zahtjeva otvaranje lubanje i okluzija se radi kirurški stavljanjem ligatura ili elektrokoagulacijom. Prednost ove metode je dobra reproducibilnost, mala smrtnost, vizualna potvrda uspješnosti zahvata i izbjegavanje oštećenja hipotalamusa, hipokampusu i srednjeg mozga (Kumar i sur. 2016). Nedostatak tMCAO metode izazvane kranijektomijom je manji volumen zahvaćenog tkiva moždanim udarom (Fluri i sur. 2015).

Još jedna tehnika rađanja tMCAO je fototromboza. Radi se ubrizgavanjem boje i osvijetljavanjem lubanje svjetlom određene valne duljine. Tako se stvara ROS koji oštećuje endotel žila i potiče nakupljanje trombocita koji stvaraju okluziju. Prednost ove tehnike je niska smrtnost, velika reproducibilnost nastale lezije i minimalna invazivnost dok je nedostatak to što ne dolazi do edema izazvanog citotoksičnošću kao što je to slučaj u ljudi (Fluri i sur. 2015).

tMCAO se može također postići korištenjem endotelina-1. On je vazokonstriktor koji se može aplicirati injekcijom u mozak, direktno na središnju cerebralnu arteriju ili samo na površinu. Volumen nastalog ishemijskog oštećenja ovisi o dozi endotelina-1 koja se daje životinji. Prednost ove tehnike je niska smrtnost, mala invazivnost i sposobnost izazivanja lokalnih moždanih udara. Nedostatak korištenja endotelina-1 je to što on potiče proliferaciju astrocita i rast neurona pa se ne može koristiti u istraživanjima koja promatraju regeneraciju neurona i živčanog sustava (Fluri i sur. 2015).

Još jedna od tehnika izvođenja tMCAO metode je izazivanjem embolije što se može postići korištenjem sfera ili izazivanjem tromboembolije. Sfere mogu biti izrađene od različitog materijala

i ubrizgavaju se u središnju cerebralnu arteriju ili u unutarnju karotidnu arteriju. Prednost ove metode je što se izbjegava nastanak moždanog udara u području hipotalamusa. Tromboembolija se izaziva ubrizgavanjem ugrušaka iz krvi same životinje ili ubrizgavanjem trombina u središnju cerebralnu arteriju ili unutarnju karotidnu arteriju. Prednost ove metode je što oponaša uvjete nastanka moždanog udara u ljudi, a nedostatak je manji volumen nastalog moždanog udara (Fluri i sur. 2015).



Slika 2. Shema i lokacija tMCAO metode. Preuzeto i prilagođeno od O'Neill i Clemens, 2001.



## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja bio je odrediti utjecaj perifernih makrofaga na oporavak nakon ishemijskog moždanog udara i njihov utjecaj na upalne procese u mozgu. Hipoteza istraživanja bila je da periferni makrofagi usporavaju i otežavaju oporavak mozga nakon ishemijskog moždanog udara i potiču nastanak upale u mozgu.

Istraživanje se provelo bojanjem prereza mišjih mozgova kojima je na jednoj hemisferi mozga izazvana privremena okluzija središnje cerebralne arterije koja oponaša patologiju moždanog udara. Prerezi su se bojali korištenjem primarnih protutijela koja su se vezala za specifične markere. Na primarna protutijela su se vezala sekundarna protutijela koja su na sebi imala konjugiranu fluorescentnu boju. Kako bi se ustvrdila uloga perifernih makrofaga jednoj skupini miševa je kirurškim zahvatom odstranjena slezena kako bi se smanjio broj dostupnih makrofaga dok se druga skupina lažno operirala. Lažna operacija je napravljena tako da se napravio kirurški rez na mjestu slezene, no ona nije izvađena. Rezultati bojanja mjerili su se fluorescencijom pojedinačnih markera specifičnih za neurone, astrocite, mikrogliju i makrofage na konfokalnom mikroskopu.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. ŽIVOTINJE

Životinje koje su korištene u istraživanju bile su nastanjene u Nastambi za pokusne životinje (HRPOK-006 MP UVSH) Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (NN 102/17, 32/19), Izmjenama i dopunama Zakona o zaštiti životinja (NN 37/13). Eksperimenti su napravljeni u okviru projekta RepairStroke za koji je izdana etička dopusnica od strane Ministarstva poljoprivrede, Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane (KLASA: UP/I-322-01/17-01/45; URBROJ: 525-10/0255-17-7; 9.10.2017.) te Mišljenje etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (KLASA: 641-01/17-02/01; URBROJ: 380-59-10106-17-100/100; 9.10.2017.). Same životinje su bili tri mjeseca stari mišji mužjaci soja C57BL/6-Tyr<sup>c-Brd</sup>-Tg(Tlr2-luc/gfp)<sup>Kir/Gaj</sup>. To su miševi albino fenotipa s transgenom koji pod promotorom gena Tlr2 ekspirira bioluminiscentni marker, luciferazu, i zelenim fluorescentnim proteinom (od engl. *green fluorescent protein* – GFP). Miševi su podijeljeni u dvije skupine po 6 miševa. U Laboratorijskom zavodu za regenerativnu neurologiju jednoj grupi od 6 miševa napravljena je splenektomija (SPLX skupina) dok je druga skupina od 6 miševa lažno operirana (SPLX-SHAM skupina). Lažna operacija je napravljena u obliku kirurškog reza gdje je prerezan peritoneum na mjestu gdje se nalazi slezena, no ona nije izvađena te je rez zašiven. Dva tjedna nakon operacije, kod obje skupine je izazvana ishemijska lezija na lijevoj strani mozga metodom tMCAO koja je trajala 30 minuta. Dvadeset osam dana nakon tMCAO, životinje su žrtvovane te su mišji mozgovi izolirani.

### 3.2. MATERIJALI I UREĐAJI

U tablici 1. su prikazani podaci o trgovačkom nazivu, proizvođaču i zemlji porijekla korištenih kemikalija i uređaja.

TABLICA 1. Podaci o korištenim kemikalijama i strojevima			
UREĐAJ/KEMIKALIJA	TRGOVAČKI NAZIV	PROIZVOĐAČ	ZEMLJA PODRIJETLA
Medij za uklapanje smrznutog tkiva TissueTek	TissueTek O.C.T.	Sakura	SAD
Triton	Triton X-100	Sigma Aldrich	SAD
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol	Abcam	SAD
medij za očuvanje fluorescencije DAKO	Fluorescence Mounting Medium S3023	DAKO	Danska
Puferska otopina	PBS	Kemika	Hrvatska
Saharoza	Sucrose	Sigma-Aldrich	SAD
Mikrotom	Criocut Leica, model CM3050 S	Leica	Njemačka
Pozitivno nabijene predmetnice	Adhesion Microscope Slides	Epredia	SAD
Pokrovna stakla (24x50mm)	Pokrovna stakla	Biognost	Hrvatska

### 3.3. METODE

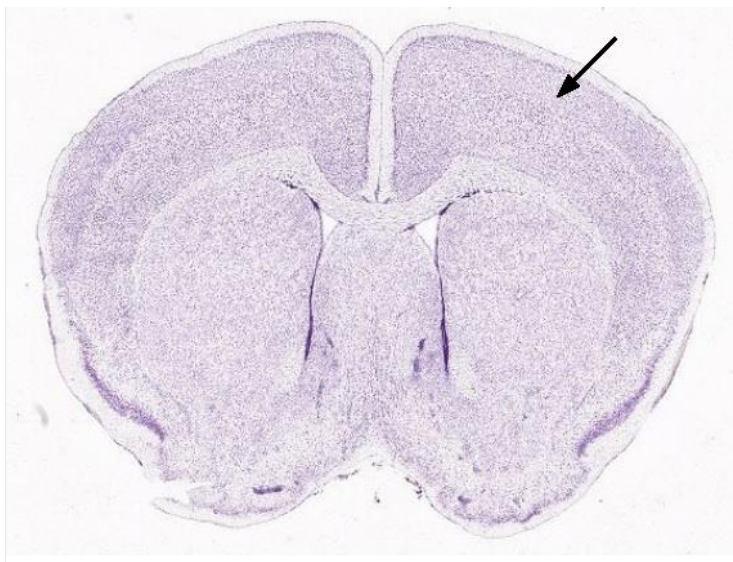
#### 3.3.1. UKLAPANJE ZA POTREBE IMUNOHISTOKEMIJE

Za potrebe ovog rada koristio sam prethodno izolirane mišje mozgove pohranjene u 4%-tni paraformaldehid. Mozgove sam isprao dva puta fosfatnim puferom (od engl. *phosphate buffered saline* – PBS) i stavio u gradijent saharoze. PBS je fiziološka puferska otopina koja služi održavanju pH vrijednosti. Korišteni PBS je imao pH 7,4 i bio je sljedećeg sastava: 13.7 mM NaCl, 0.27 mM KCl, 0.65 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.14 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Prvo sam mozgove stavio u 10%-tnu otopinu saharoze na 24 sata, zatim prebacio u 20%-tnu otopinu na 24 sata i na kraju u 30%-tnu otopinu na 24 sata. Mozgove sam nakon gradijenta stavio u aluminijske kadice i prekrpio s medijem naziva TissueTek. TissueTek je vodenasti medij na bazi glikola i smola i služi za uklopljavanje smrznutog tkiva za potrebe izrade preparata za bojanje. Takve mozgove sam stavio u zamrzivač na

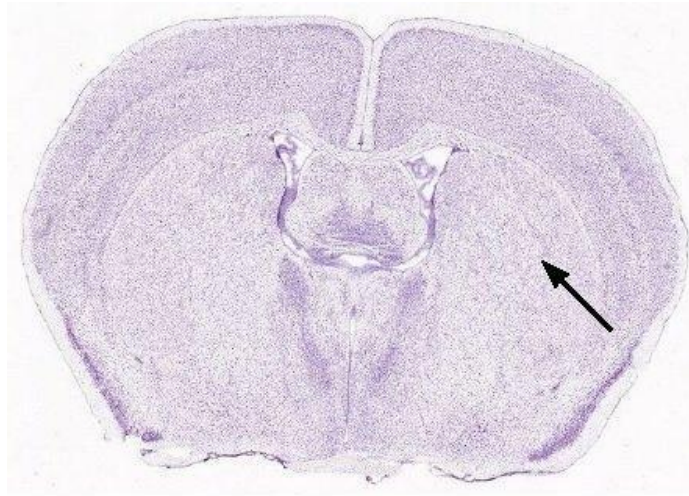
-25 °C dok se TissueTek medij nije zamrznuo. Kadice s mozgovima sam ostavio u zamrzivaču na -25 °C do korištenja.

### 3.3.2. REZANJE MOZGOVA NA KRIOTOMU

Mozgove sam rezao na kriotomu na temperaturi od -22 °C na prereze debljine 30 mikrona. Stavio sam ih na nosač tako da su olfaktorni bulbusi bili orijentirani frontalno, tako da se krenulo rezati od njih. Od svakog mozga napravio sam dvadeset predmetnih stakalca tako da su na svakom bila po tri prereza, dakle po svakom mozgu sveukupno 60 prereza. Ukupno sam dobio od svih 12 životinja 240 preparata. Na svako predmetno stakalce stavio sam jedan prerez korteksa (Slika 3), jedan prerez striatuma (Slika 4) i jedan prerez hipokampusa (Slika 5) tako da je jedan preparat, odnosno predmetno stakalce, imalo tri prereza. Od 20 preparata po životinji izabrao sam najkvalitetnije za bojanje metodama imunohistokemije.



Slika 3. Slika prereza mišjeg mozga. Strelica označuje korteks. Preuzeto i prerađeno od Allen Brain Atlas (<https://portal.brain-map.org/>).



Slika 4. Slika prereza mišjeg mozga. Strelica označuje striatum. Preuzeto i prilagođeno od Allen Brain Atlas (<https://portal.brain-map.org/>).



Slika 5. Slika prereza mišjeg mozga. Strelica označuje hipokampus. Preuzeto i prilagođeno od Allen Brain Atlas (<https://portal.brain-map.org/>).

### 3.3.3. IMUNOHISTOKEMIJA

Prethodno pripremljene preparate sa sve tri regije mišjeg mozga od svakog pojedinačnog mišjeg mozga sam bojao dva puta uzastopno jer sam koristio više markera i jer se na konfokalnom mikroskopu koji sam koristio za vizualizaciju ne može gledati više od četiri kanala odnosno boje istodobno. Ukupno sam bojao 60 preparata sa sveukupno 180 prereza. Dodatno sam za marker Tlr2 dva puta bojao preparate jer se slabije vidio nakon prvog bojanja. Prvi puta sam ih bojao za detekciju markera grupa diferencijacije 68 (od engl. *cluster of differentiation 68* - CD68), ioniziranu kalcij vezujuću adapter molekulu 1 (od engl. *ionized calcium-binding adapter molecule 1* - Iba1) i Tlr2 dok drugi puta za markere glijalni fibrilarni kiseli protein (od engl. *glial fibrillary acidic protein* - GFAP), heksaribonukleotid vezujući protein-3 (od engl. *hexaribonucleotide binding protein-3* - NeuN) i Tlr2. Prije bojanja preparate sam isprao četiri puta po pet minuta s 200  $\mu$ L PBS-a po preparatu. Koristio sam PBS koji je istog sastava kao i PBS korišten kod uklapanja mozgova. Otopina za blokiranje se sastojala od 10%-tnog kozjeg seruma u koji je dodan 0,25%-tni Triton otopljen u PBS-u. Po preparatu sam stavio 200  $\mu$ L otopine za blokiranje i ostavio ih da se inkubiraju sat vremena na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije pripremio sam primarna protutijela za pojedine markere tako da sam ih otopio u 1%-tnom kozjem serumu u koji je dodan 0,1%-tni Triton u PBS-u. Omjer protutijela u odnosu na otopinu za marker CD68 je bio 1/1000 dok je za markere Iba1 i Tlr2 je bio 1/100 kada sam prvi put bojao preparate. Kada sam preparate bojao drugi puta omjer protutijela u odnosu na otopinu za marker GFAP je bio 1/500, za marker NeuN 1/200 dok je za marker Tlr2 omjer bio 1/100. Primarna protutijela koja su korištena za NeuN su bila mišja, za Iba1 zečja, za CD68 štakorska i za GFAP kokošja. Za marker Tlr2 kod prvog bojanja sam koristio mišja, a kod drugog bojanja štakorska protutijela. Stavio sam po 100  $\mu$ L otopine protutijela po preparatu, a za negativnu kontrolu sam stavio 100  $\mu$ L otopine 1%-tnog kozjeg seruma u koji je dodan 0,1%-tni Triton otopljen u PBS-u. Preparate sam zatim ostavio da se inkubiraju preko noći na sobnoj temperaturi. Podaci o primarnim protutijelima su prikazani u Tablici 2. Idući dan sam preparate isprao otopinom 0,1%-tnog Tritona u PBS-u pet puta po pet minuta. Nakon toga sam pripremio sekundarna protutijela tako što sam ih otopio u PBS-u. Omjer koncentracija za sekundarna protutijela je bio 1/500 za sve markere. Za marker CD68 su korištena protu-štakorska sekundarna protutijela iz koze (od engl. *goat anti rat*), za Iba1 protu-zečja sekundarna protutijela iz koze (od engl. *goat anti rabbit*), za NeuN protu-mišja sekundarna protutijela iz koze (od engl.

*goat anti mouse*) i za GFAP protu-kokošja sekundarna protutijela iz kože (od engl. *goat anti chicken*). Za marker Tlr2 sam kod prvog bojanja koristio protu-mišja sekundarna protutijela iz kože (od engl. *goat anti mouse*), a kod drugog protu-štakorska sekundarna protutijela iz kože (od engl. *goat anti rat*). Sekundarna protutijela imaju regiju koja se specifično veže za primarna antitijela. Sekundarna protutijela koja sam koristio imaju na sebe konjugirani fluorofor. Njihova detekcija je objašnjena u poglavlju 3.3.4. Po preparatu sam stavio po 100 µL pripremljene otopine sekundarnih protutijela, a za negativnu kontrolu 100 µL PBS-a. Podaci o sekundarnim protutijelima su prikazani u Tablici 3. Preparate sam ostavio da se inkubiraju 2 sata na sobnoj temperaturi nakon čega sam ih isprao PBS-om četiri puta po pet minuta. Zatim sam ih inkubirao s bojom 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) u omjeru 1/2000 tri minute nakon čega sam ih isprao tri puta PBS-om. Preparate sam bojao s bojom DAPI kako bih vizualizirao jezgre stanica, budući da se ta boja veže za samu deoksiribonukleinsku kiselinu (od engl. *deoxyribonucleic acid* – DNA). Na kraju sam preparate uklopio u Dako medij.

**TABLICA 2. Podaci o specifičnosti za protein, proizvođaču, trgovačkom imenu, podrijetlu i korištenom razrjeđenju korištenih primarnih protutijela**

SPECIFIČNOST ZA PROTEIN	PROIZVOĐAČ	TRGOVAČKO IME PROTUTIJELE	PODRIJETLO	RAZRJEĐENJE
CD68	Bio-Rad Laboratories	Mouse anti Rat CD68 Antibody   ED1	Štakor	1/1000
Iba1	FUJIFILM Wako	Anti Iba1, Rabbit (for Immunocytochemistry)	Zec	1/100
Tlr2	eBioscience	CD282 (TLR2) Monoclonal Antibody (6C2)	Miš, Štakor	1/100
GFAP	Abcam	Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein antibody produced in rabbit	Kokoš	1/500
NeuN	Merck Millipore	Anti-NeuN Antibody, clone A60	Miš	1/200

**TABLICA 3. Podaci o specifičnosti za protein, proizvođača, trgovačkom imenu odnosno fluoroforu i korištenom razrjeđenju korištenih sekundarnih protutijela**

SPECIFIČNOST ZA PROTUTIJELO	PROIZVOĐAČ	FLUOROFOR	RAZRJEĐENE
Protu-štakorsko protutijelo iz koze (od engl. <i>goat anti rat</i> )	Life Technologies	Alexa Fluor®488, zelena boja	1/500
Protu-zečje protutijelo iz koze (od engl. <i>goat anti rabbit</i> )	Life Technologies	Alexa Fluor®546, crvena boja	1/500
Protu-kokošje protutijelo iz koze (od engl. <i>goat anti chicken</i> )	Life Technologies	Alexa Fluor®546, crvena boja	1/500
Protu-mišje protutijelo iz koze (od engl. <i>goat anti mouse</i> )	Life Technologies	Alexa Fluor®647, plava boja	1/500

### 3.3.4. KONFOKALNA MIKROSKOPIJA

Konfokalni mikroskop koristi ekscitacijski laser kako bi proizveo fluorescenciju. On emitira lasersku svjetlost manje valne duljine koja prolazi kroz dikromatsko zrcalo koje prema preparatu propušta svjetlost niže valne duljine, a natrag propušta svjetlost veće valne duljine. Nakon prolaska kroz dikromatsko zrcalo laserska svjetlost niže valne duljine prolazi kroz dva zrcala koja raspršuju lasersku svjetlost preko cijelog preparata. Kada laserska svjetlost veće valne duljine dolazi do sekundarnog protutijela s konjugiranim fluoroforom, elektroni unutar njega skoče na veću energetska razinu nakon čega se spuste ponovno na nižu energetska razinu i dolazi do emitiranja svjetlosti veće valne duljine. Ta svjetlost se odbija od dva zrcala, prolazi kroz dikromatsko zrcalo i prolazi kroz fokuser iza kojega se nalazi detektor svjetlosti. Fokuser služi kako bi na detektor propustio samo svjetlost veće valne duljine, a pozadinsku svjetlost eliminirao. Na konfokalnom mikroskopu sam slikao pet preparata po životinji s prerezima korteksa, hipokampusa i striatuma s kontralateralnom i ipsilateralnom stranom mozga. Povećanje je bilo 20 puta na objektivu i 10 puta na okularu za sveukupno povećanje od 200 puta. Rezolucija u kojoj sam slikao je 1024 puta 1024. Protu-zečja sekundarna protutijela iz koze (od engl. *goat anti rabbit*) su slikana pod ekscitacijskim laserom na valnoj duljini od 561 nm za marker Iba1. Protu-štakorska sekundarna protutijela iz koze (od engl. *goat anti rat*) su slikana pod ekscitacijskim laserom na



valnoj duljini od 488 nm u prvom navratu za marker CD68, a u drugom za Tlr2 marker. Protu-mišja sekundarna protutijela iz kože (od engl. *goat anti mouse*) su slikana pod ekscitacijskim laserom na valnoj duljini od 640 nm u prvom navratu za marker Tlr2, a u drugom navratu za NeuN. Protu-kokošja sekundarna protutijela iz kože (od engl. *goat anti chicken*) su slikana pod ekscitacijskim laserom na valnoj duljini od 561 nm za marker GFAP. DAPI je slikan pod ekscitacijskim laserom na valnoj duljini od 405 nm. Od svih prereza odabrao sam po jedan najkvalitetniji za svaku regiju mozga s kontralateralnom i ipsilateralnom stranom za svaku životinju koja je bila u istraživanju za daljnju obradu rezultata.

### 3.3.5. OBRADA REZULTATA IMUNOHISTOKEMIJE

Obradu rezultata imunohistokemije sam radio u programu ImageJ (National Institute of Health – Bethesda, Maryland, SAD, v. 1.8.0). Mjerio sam optičku gustoću i površinu signala. Površina signala mjeri broj stanica koje ekspimiraju specifični marker, dok optička gustoća ovisi o samom broju stanica i razini ekspresije gena. Optička gustoća je logaritamska funkcija omjera jačine ulazne svjetlosti i jačine emitirane svjetlosti nakon što prođe kroz određeni medij. Za optičku gustoću u programu sam gledao Integriranu Gustoću (od engl. *Integrated Density*) na tri decimalne točke s postavkom Prostor (od engl. *Area*). Integrirana gustoća je suma vrijednosti svih piksela koji se nalaze u pojedinom polju. Dobiva se množenjem Prostora sa Srednjom Vrijednosti Sive (od engl. *Mean Gray Value*) gdje je Prostor površina označenog dijela, a Srednja Vrijednost Sive je suma vrijednosti crno-bijele boje svih piksela u označenom području podijeljena s brojem piksela. Koristio sam Integriranu Gustoću jer se njome može najbolje izmjeriti najsvjetlije i najtamnije piksele na biološkim preparatima. Prije samog mjerenja sliku sam morao prebaciti u 8-bitni format kako bi se pikseli mogli izmjeriti. Kalibraciju mjerenja u programu sam izvršio stvaranjem standarda za mjerenje ostalih podataka po Rodbard funkciji s parametrima za x i y os na sljedeći način Analiziraj>Kalibriraj (od engl. *Analyze>Calibrate*) na 8 bitnoj slici. Površina regija od interesa (od engl. *Region of Interest – ROI*) sam postavio na 0,5  $\mu\text{m}$ . 10 ROI-a sam postavio na slikane preparate na mjesta fluorescencije markera. Analizirao sam regije korteksa, striatuma i hipokampusa na ipsilateralnoj i kontralateralnoj hemisferi. Za svaku životinju sam radio po deset mjerenja za svaki prerez odnosno regiju za kontralateralnu i ipsilateralnu stranu pojedinačno, dakle

po životinji sveukupno šezdeset mjerenja. Slike sam zatim prebacio u slike od 8 bitova crno-bijele boje i izmjerio optičku gustoću na sljedeći način Analiziraj>Mjeri (od engl. *Analyze>Measure*). Podaci su izvezeni u Microsoft Excel (Microsoft – Redmon, Washington, SAD; v. 2019.).

Površinu signala određuje sam broj prisutnih piksela na slici. Kod mjerenja mjerio sam s postavkom Sveukupna Površina (od engl. *Total Area*). Slike sam prvo prebacio u slike od 16 bitova crno-bijele boje i postavio sam prag tako da sam uzeo fluorescenciju pozadine. Prag sam postavio na sljedeći način: Proces>Matematika>Makro (od engl. *Process>Math>Macro*) i stavio sam srednju vrijednost fluorescencije pozadine kako bi se uklonio sav pozadinski signal. Nakon toga sam slike prebacio u binarni oblik na sljedeći način: Proces>Binarno>Napravi Binarno (od engl. *Process>Binary>Make Binary*). Time su na slikama ostali isključivo crni ili bijeli pikseli. Nakon toga sam izmjerio 10 ROI-a koji su bili na istim pozicijama kao kod mjerenja optičke gustoće. Podatke za površinu signala od svakog ROI-a sam unio u Microsoft Excel.

### 3.3.6. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Radio sam dvije metode obrade podataka: Pearsonov koeficijent korelacije između dobivenih mjerenja optičke gustoće i površine signala te jednosmjerni test analize varijance (od engl. *analysis of variance* – ANOVA) za svaku metodu zasebno. Najprije sam izračunao Pearsonov koeficijent korelacije između dobivenih mjerenja optičke gustoće i površine signala u programu Microsoft Excel pomoću funkcije CORREL. To sam radio tako da sam usporedio svih 10 mjerenja od svih 6 životinja unutar jedne skupine (SPLX ili SPLX-SHAM) za svaku pojedinačnu stranu (kontralateralnu ili ipsilateralnu) svake pojedinačne regije (korteks, striatum ili hipokampus) što je na kraju rezultiralo s 60 mjerenja za svaku stranu svake pojedinačne regije te sam to napravio za sve strane svih regija obje skupine miševa. Pearsonov koeficijent korelacije služi za mjerenje linearne korelacije između podataka i koristio sam ga kako bih usporedio koliko se mjerenja poklapaju između dvije različite metode obrade rezultata. Koeficijent korelacije se može kretati između 1 i -1. Čim je koeficijent bliže broju 1 korelacija je veća dok čim je koeficijent bliže -1 korelacija je obrnuto proporcionalna. Koeficijent korelacije se također dijeli na visoku korelaciju kada je  $r > 0,7$ , umjerenu korelaciju gdje je  $r = 0,5 - 0,7$  te slabu korelaciju gdje je  $r < 0,5$  (Mukaka 2012).

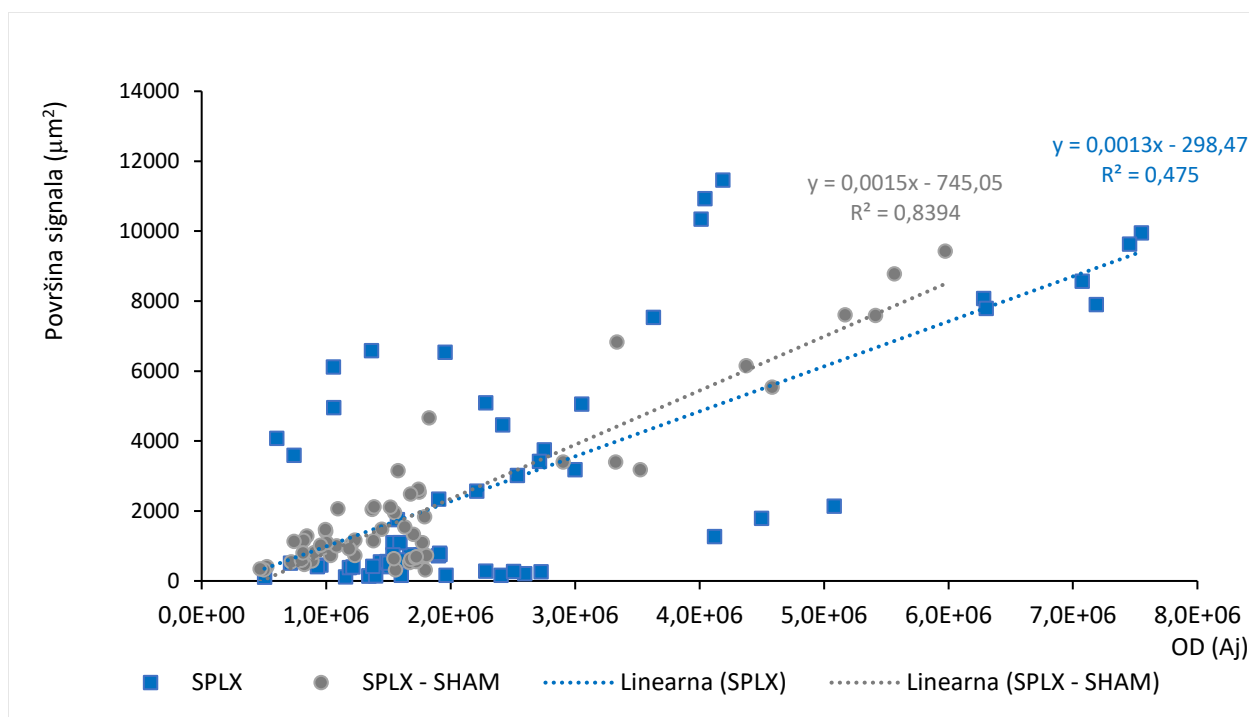
ANOVA test sam radio u programu GraphPad Prism (GraphPad Software – San Diego, California, SAD; v. 8.4.3.). ANOVA testom sam uspoređivao podatke za svaki marker zasebno i za svaku metodu mjerenja zasebno. Mjerenja sam podijelio u četiri seta podataka. Jedan set su bila mjerenja za ipsilateralnu stranu SPLX skupine, drugi set su bila mjerenja ipsilateralne strane SHAM skupine, treći set mjerenja kontralateralne strane SPLX skupine i zadnji set su bila mjerenja kontralateralne strane SHAM skupine. U svaki od tih setova je ušlo 60 mjerenja. ANOVA testom sam usporedio mjerenja međusobno unutar svakog seta podataka te sam usporedio mjerenja između svakog seta podataka. Usporedio sam podatke izmjerene za optičku gustoću zasebno i podatke izmjerene za površinu signala zasebno za svaki marker i regiju mozga.

Svaki set podataka sam analizirao tako da se testirala normalnost distribucije podataka Shapiro-Wilk testom normalnosti distribucije. U slučaju kada podaci nisu spadali u normalnu ili log-normalnu distribuciju transformirao sam ih korištenjem funkcije  $Y = \ln(Y)$ . U slučaju normalne ili log-normalne distribucije transformaciju nisam radio. Zatim sam izbacio vrijednosti koje odstupaju metodom ROUT gdje je Q jednak 5%. Statističku analizu ovako dobivenih podataka sam nadalje radio jednosmjernim ANOVA testom za neponovljena mjerenja s post-hoc testom po Tukeyu za podatke s normalnom i log-normalnom distribucijom. Statističku značajnost sam definirao na razini  $P < 0,05$ . Rezultate dobivene ANOVA testom prikazao sam kao srednju vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

## 4. REZULTATI

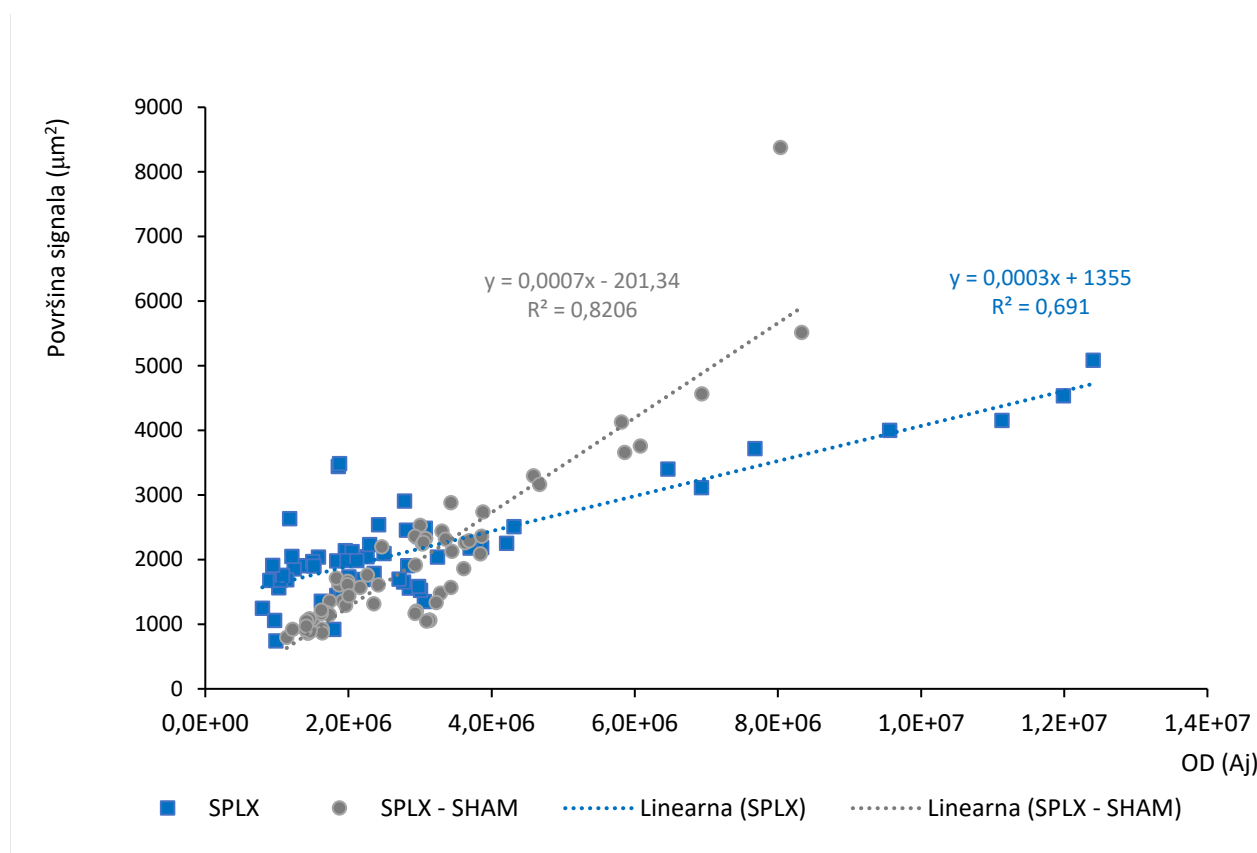
### 4.1. KORELACIJA REZULTATA MJERENJA OPTIČKE GUSTOĆE I POVRŠINE SIGNALA

Za marker CD68 visoki koeficijent korelacije između mjerenja optičke gustoće i površine signala za SPLX skupinu miševa je u području hipokampusa na ipsilateralnoj strani s koeficijentom korelacije od 0,68. Kod SPLX-SHAM skupine miševa koeficijent korelacije je također visok na ipsilateralnoj strani hipokampusa s još većom vrijednosti korelacije od 0,92. Pravci koji prikazuju korelaciju za ipsilateralnu stranu hipokampusa mogu se vidjeti na Slici 9.



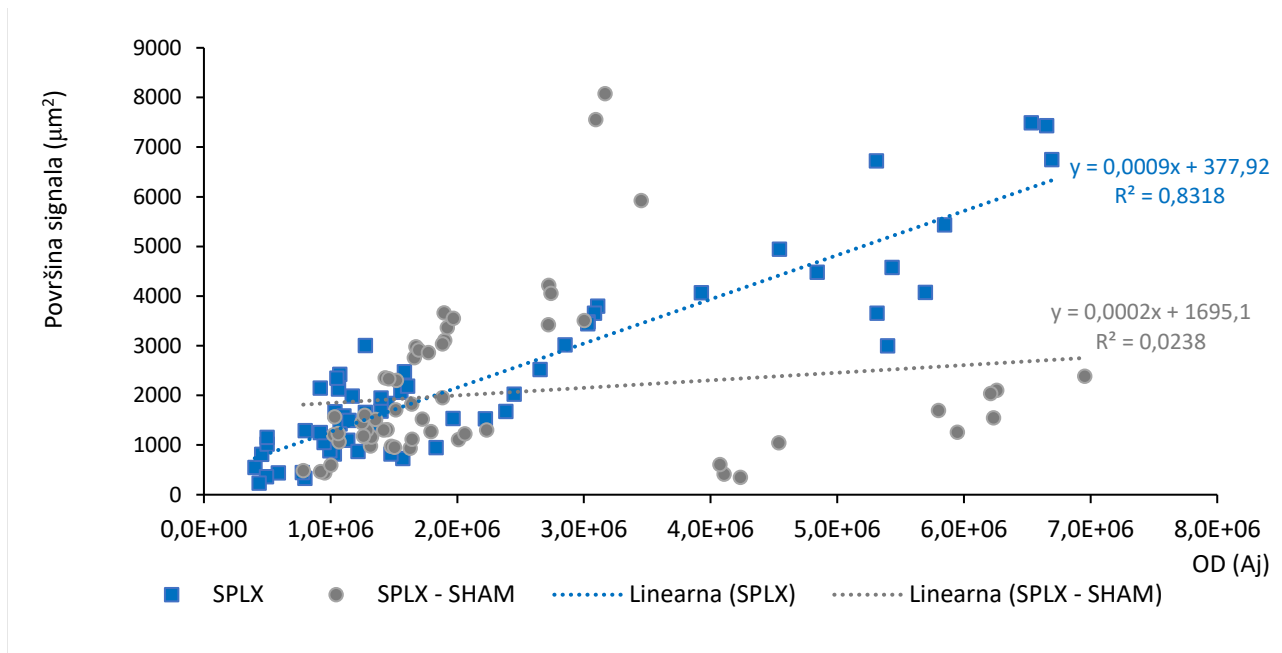
Slika 9. Prikaz korelacija između optičke gustoće (OD) i površine signala za marker grupa diferencijacije 68 (od engl. *cluster of differentiation 68* - CD68) mjenenog na ipsilaterlanoj strani hipokampusa za SPLX i SPLX-SHAM skupinu miševa. Svaka točka predstavlja jedno od mjerenja za optičku gustoću i površinu signala. Podaci za SPLX skupinu su obojani plavo, a za SPLX-SHAM skupinu sivo. Aj označava arbitrarnu jedinicu.

Za marker Iba1 koeficijent korelacije između mjerenja optičke gustoće i površine signala za SPLX skupinu je visok u području striatuma na ipsilateralnoj strani s vrijednošću od 0,83. kao što je prikazano na Slici 10. Za SPLX-SHAM skupinu koeficijent korelacije je visok na ipsilateralnoj strani korteksa s vrijednošću od 0,84.

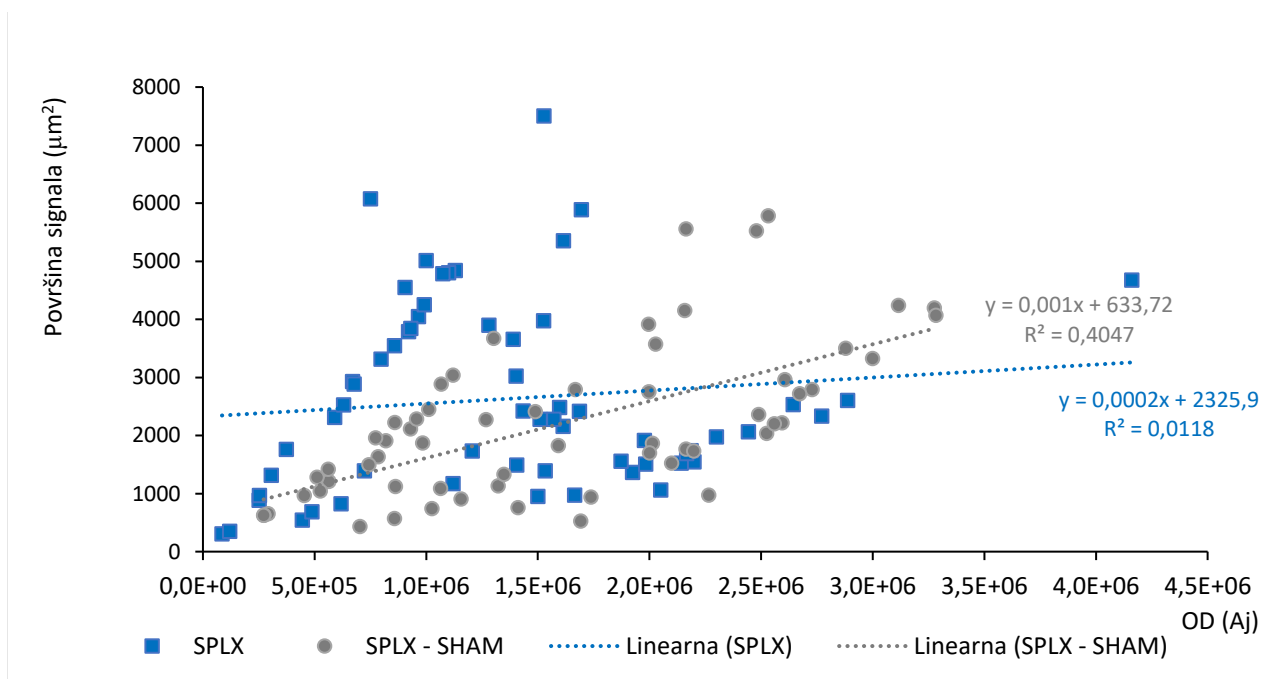


Slika 10. Prikaz korelacije između optičke gustoće (OD) i površine signala za marker ionizirana kalcij vezujuća adapter molekula 1 (od engl. *ionized calcium-binding adapter molecule 1* - Iba1) mjenog na ipsilateralnoj strani striatuma za SPLX i SPLX-SHAM skupinu miševa. Svaka točka predstavlja jedno od 60 mjerenja za optičku gustoću i površinu signala. Podaci za SPLX skupinu su obojani plavo, a za SPLX-SHAM skupinu sivo. Aj označava arbitrarnu jedinicu.

Najveći koeficijent korelacije između mjerenja optičke gustoće i površine signala za marker Tlr2 SPLX skupine je na području hipokampusa na ipsilateralnoj strani mozga s vrijednošću od 0,91 (Slika 11), dok je za SPLX-SHAM skupinu koeficijent korelacije najveći na području striatuma na ipsilateralnoj strani mozga (Slika 12) s vrijednošću od 0,63, no svejedno spada u umjerenu korelaciju.

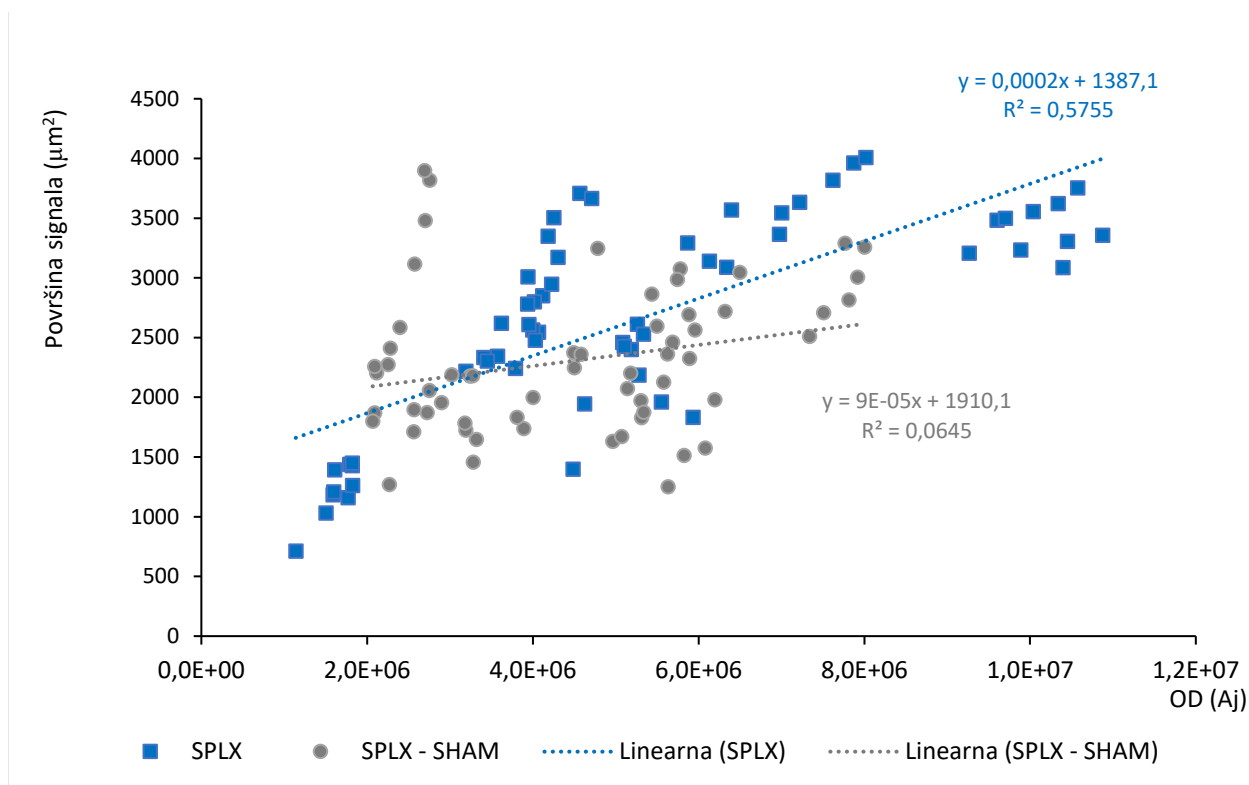


Slika 11. Prikaz korelacije između optičke gustoće (OD) i površine signala za marker tollu sličan receptor 2 (od engl. *toll like receptor 2* - Tlr2) mjenenog na ipsilateralnoj strani hipokampusa za SPLX i SPLX-SHAM skupinu miševa. Svaka točka predstavlja jedno od 60 mjerenja za optičku gustoću i površinu signala. Podaci za SPLX skupinu su obojani plavo, a za SPLX-SHAM skupinu sivo. Aj označava arbitrarnu jedinicu.

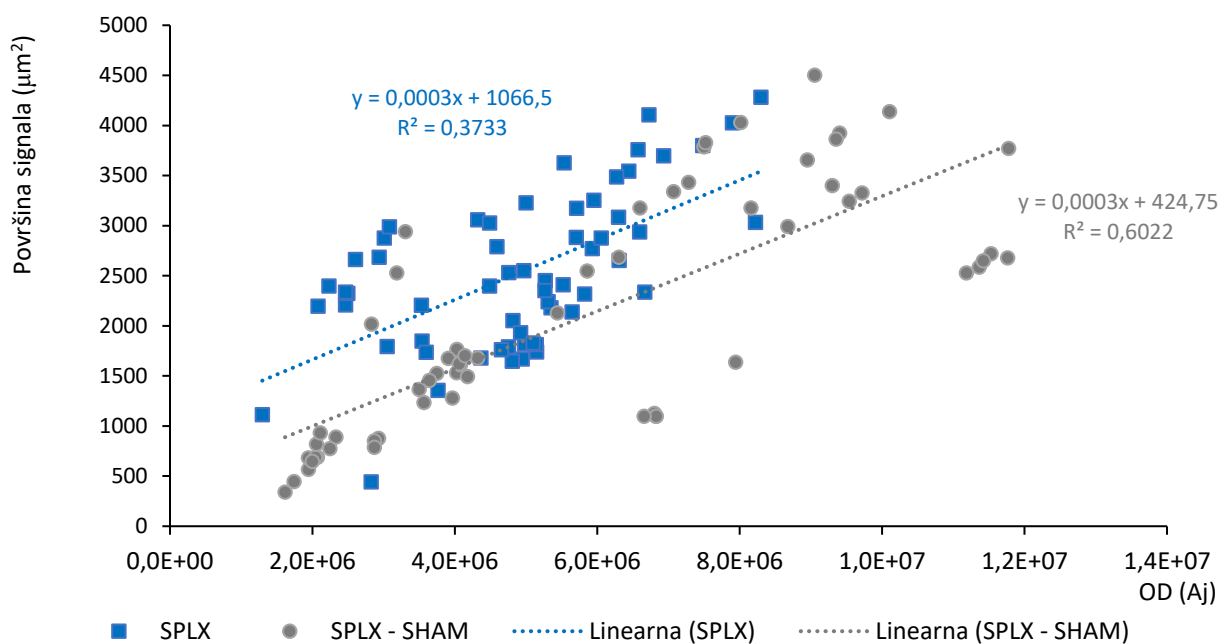


Slika 12. Prikaz korelacije između optičke gustoće (OD) i površine signala za marker tollu sličan receptor 2 – TLR2) mjenenog na ispilaterlanoj strani striatuma za SPLX i SPLX-SHAM skupinu miševa. Svaka točka predstavlja jedno od 60 mjerenja za optičku gustoću i površinu signala. Podaci za SPLX skupinu su obojani plavo, a za SPLX-SHAM skupinu sivo. Aj označava arbitrarnu jedinicu.

Marker GFAP ima visoki koeficijent korelacije između mjerenja optičke gustoće i površine signala za SPLX skupinu na području hipokampusa na kontralateralnoj strani mozga s vrijednošću od 0,75 (Slika 13). Za SPLX-SHAM skupinu visoki koeficijent korelacije je na području korteksa ipsilateralne strane mozga i iznosi 0,77 (Slika 14).



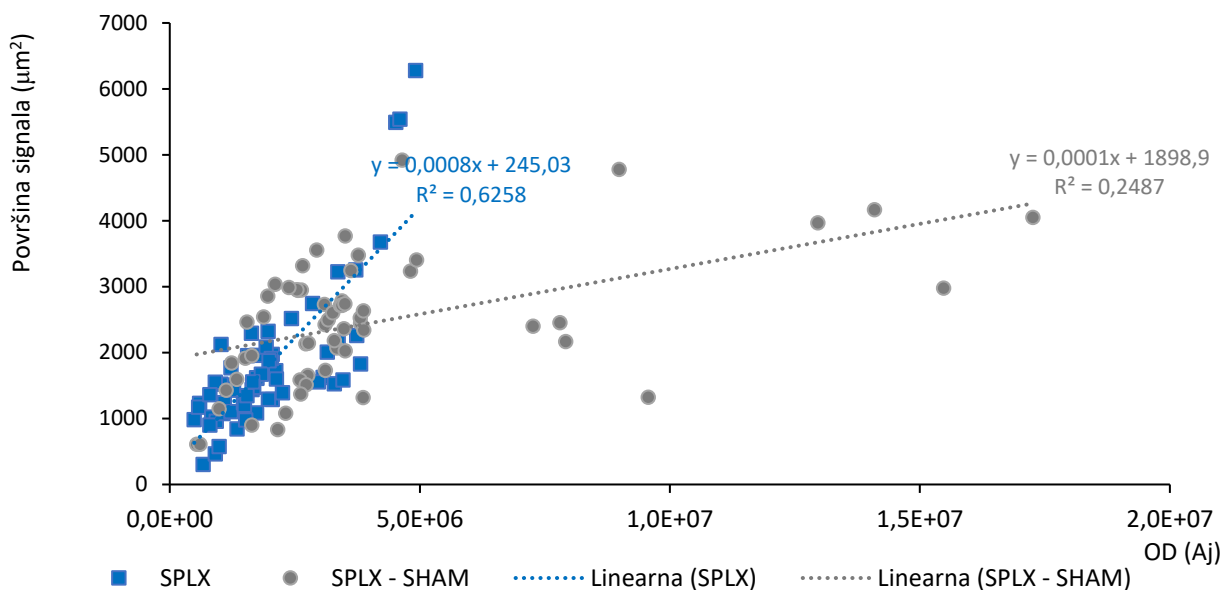
Slika 13. Prikaz korelacije između optičke gustoće (OD) i površine signala za marker glijalni fibrilarni kiseli protein (od engl. *glial fibrillary acidic protein* – GFAP) mjenog na kontralateralnoj strani hipokampusa za SPLX i SPLX-SHAM skupinu miševa. Svaka točka predstavlja jedno od 60 mjerenja za optičku gustoću i površinu signala. Podaci za SPLX skupinu su obojani plavo, a za SPLX-SHAM skupinu sivo. Aj označava arbitrarnu jedinicu.



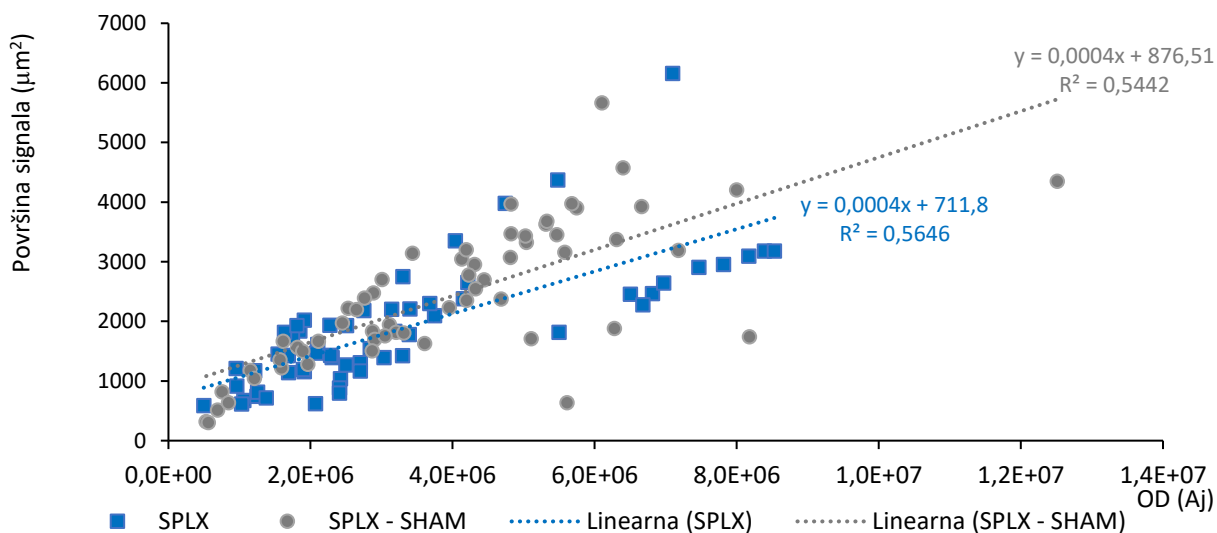
Slika 14. Prikaz korelacije između optičke gustoće (OD) i površine signala za marker glijalni fibrilarni kiseli protein (od engl. *glial fibrillary acidic protein* – GFAP) mjenog na ipsilateralnoj strani korteksa za SPLX i SPLX-SHAM skupinu. Svaka točka predstavlja jedno od 60 mjerenja za optičku gustoću i površinu signala. Podaci za SPLX skupinu su obojani plavo, a za SPLX-SHAM skupinu sivo. Aj označava arbitrarnu jedinicu.

Visoki koeficijent korelacije između mjerenja optičke gustoće i površine signala za marker NeuN kod SPLX skupine je na području korteksa ipsilateralne strane mozga s vrijednošću od 0,79 (Slika 15). Za SPLX-SHAM skupinu visoki koeficijent korelacije je na području hipokampusa na ipsilateralnoj strani mozga s vrijednošću 0,73 (Slika 16).





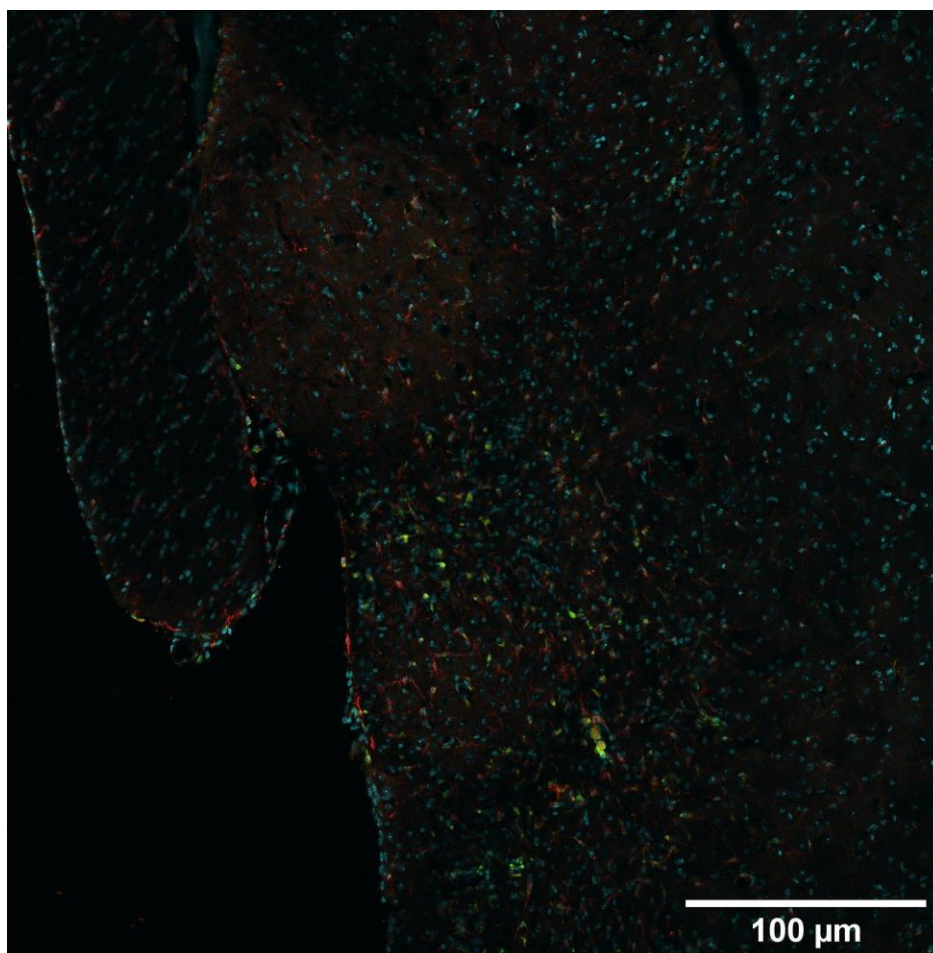
Slika 15. Prikaz korelacije između optičke gustoće (OD) i površine signala za marker heksaribonukleotid vezujući protein-3 (od engl. *hexaribonucleotide binding protein-3* – NeuN) mjenenog na ipsilateralnoj strani korteksa za SPLX i SPLX-SHAM skupinu miševa. Svaka točka predstavlja jedno od 60 mjerenja za optičku gustoću i površinu signala. Podaci za SPLX skupinu su obojani plavo, a za SPLX-SHAM skupinu sivo. Aj označava arbitrarnu jedinicu.



Slika 16. Prikaz korelacije između optičke gustoće (OD) i površine signala za marker heksaribonukleotid vezujući protein-3 (od engl. *hexaribonucleotide binding protein-3* – NeuN) mjenenog na ipsilateralnoj strani hipokampusa za SPLX i SPLX-SHAM skupinu miševa. Svaka točka predstavlja jedno od 60 mjerenja za optičku gustoću i površinu signala. Podaci za SPLX skupinu su obojani plavo, a za SPLX-SHAM skupinu sivo. Aj označava arbitrarnu jedinicu.

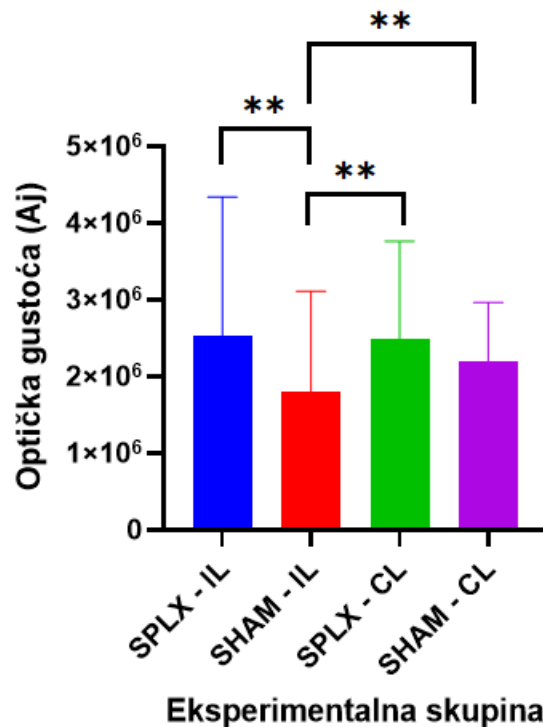
## 4.2. AKTIVACIJA MIKROGLIJE NAKON ISHEMIJSKE LEZIJE

Obojani CD68 marker je prikazan na Slici 17 zelenom bojom. Aktivacija CD68 markera mjerena optičkom gustoćom veća je kod SPLX skupine miševa, a najveća je u području hipokampusa. U području hipokampusa se statističkom obradom pokazalo da je aktivacija markera na ipsilateralnoj strani SPLX skupine veća od aktivacije markera na ipsilateralnoj strani SPLX-SHAM skupine ( $F(3, 235) = 5,802$  i  $P < 0,001$ ).

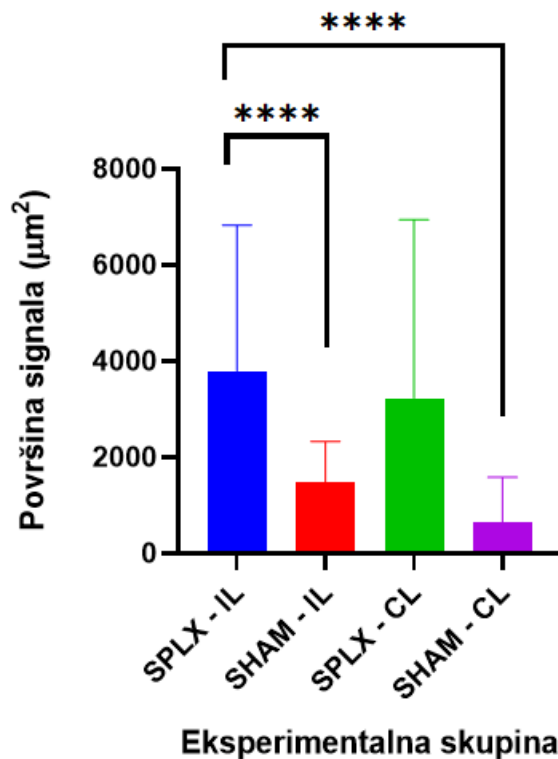


Slika 17. Slika ipsilateralne strane hipokampusa uzorka pripremljenog u Laboratorijskom zavodu za regenerativnu neurologiju 0903 (LZRN 0903) koji sam obojao za imunodetekciju markera i slikao s konfokalnim mikroskopom. Zelenom je bojom označen marker grupa diferencijacije 68 (od engl. *cluster of differentiation 68* - CD68), crvenom marker ionizirana kalcij vezujuća adapter molekula 1 (od engl. *ionized calcium-binding adapter molecule 1* - Iba1) i tirkiznom jezgre stanica obojane bojom 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

Također je aktivacija CD68 marker na kontralateralnoj strani u obje skupine veća od aktivacije markera na ipsilateralnoj strani SPLX-SHAM skupine (Slika 18). Aktivacija markera CD68 mjerena površinom signala je veća u SPLX skupini i to u području striatuma (Slika 19). Mjerenja su pokazala da je aktivacija na ipsilateralnoj strani SPLX skupine veća od aktivacije u SPLX-SHAM skupine na ipsilateralnoj strani, dok statistički značajne razlike u aktivaciji između SPLX ipsilateralne i SPLX kontralateralne strane nema. Kod mjerenja je statistika bila sljedeća  $F(3, 235) = 49,60$  i  $P < 0,0001$ .

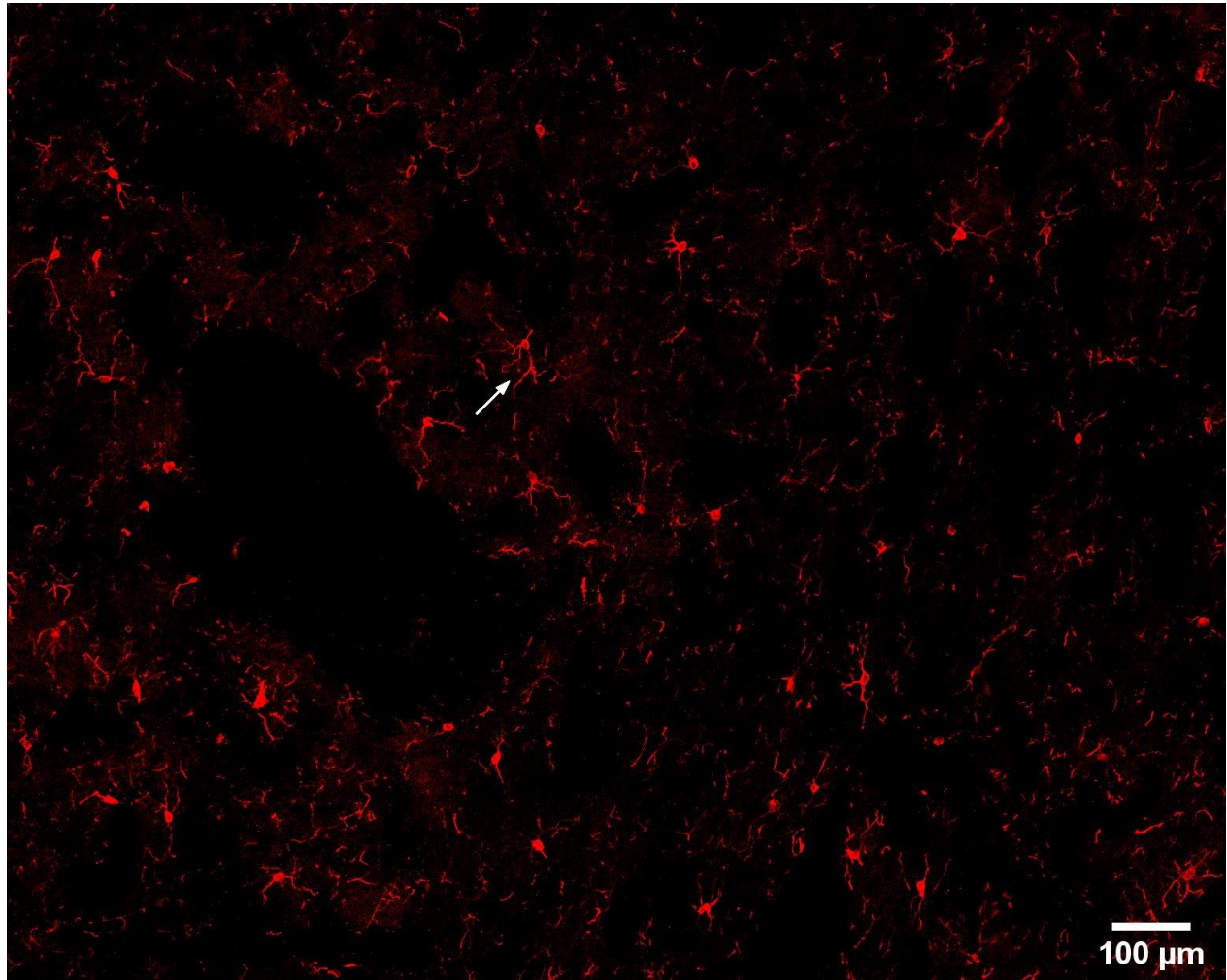


Slika 18. Optička gustoća za marker grupa diferencijacije 68 (od engl. *cluster of differentiation 68* - CD68) na području hipokampusa za splenektomiranu (SPLX) i lažno operiranu (SPLX-SHAM) skupinu. Rezultati prikazuju srednju vrijednost  $\pm$  standardnu devijaciju od 60 mjerenja za SPLX-IL, SHAM-IL i SPLX-CL skupinu i 59 mjerenja za SHAM-CL skupinu. IL označava ipsilateralnu stranu, a CL kontralateralnu stranu mozga. Aj označava arbitrarnu jedinicu. Podaci su analizirani ANOVA testom (\*\* $p < 0,01$ ).

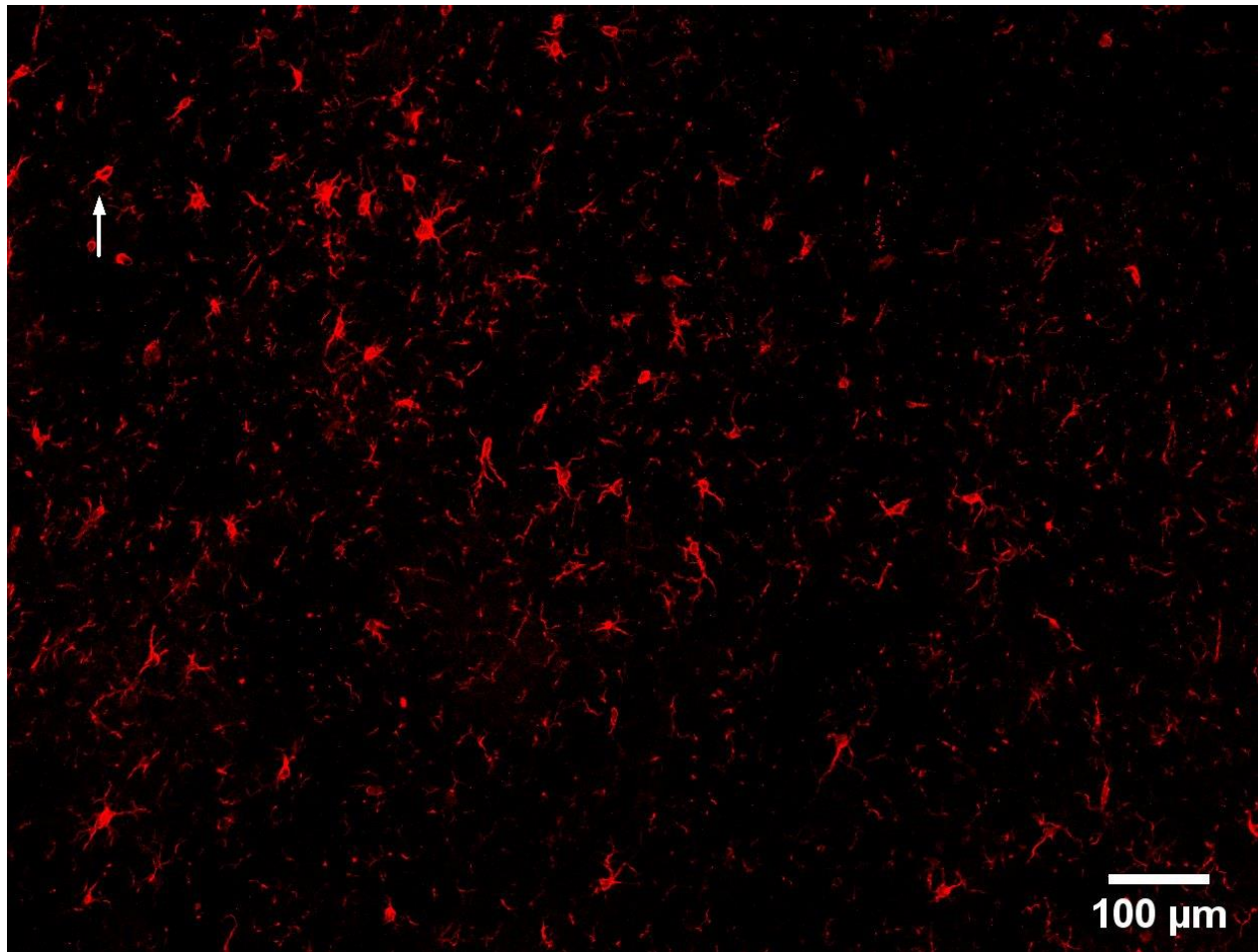


Slika 19. Površina signala za marker grupa diferencijacije 68 (od engl. *cluster of differentiation 68* - CD68) na području striatuma za splenektomiranu (SPLX) i lažno operiranu (SPLX-SHAM) skupinu. Rezultati prikazuju srednju vrijednost  $\pm$  standardnu devijaciju od 60 mjerenja za SPLX-IL, SHAM-IL i SPLX-CL skupinu i 59 mjerenja za SHAM-CL skupinu. IL označava ipsilateralnu stranu, a CL kontralateralnu stranu mozga. Podaci su analizirani ANOVA testom (\*\*\*\* $p < 0,001$ ).

Proteinski marker Iba1 se nalazi na membrani monocita, a jače je eksprimiran kod aktivirane mikroglije. Neaktivirana i aktivirana mikroglija ima različitu morfologiju. Kao što je prikazano na Slici 20 neaktivirana mikroglija ima ramificirani oblik dok aktivirana mikroglija ima ameboidnu morfologiju kao što je prikazano na Slici 21. Za marker Iba sveukupna aktivacija izmjerena optičkom gustoćom otprilike je jednaka za SPLX i SPLX-SHAM skupinu na području striatuma ( $F(3, 236) = 25,91$  i  $P = 0,0001$ ).



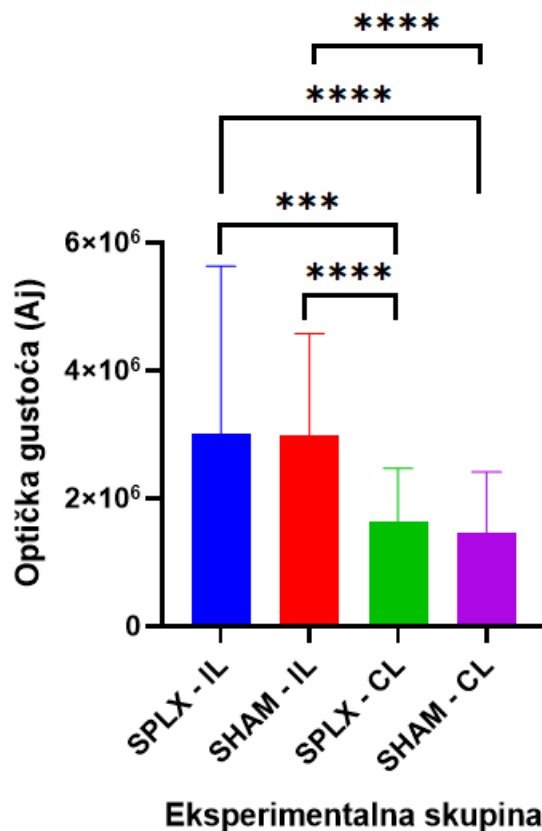
Slika 20. Prikaz kontralateralne strane korteksa uzorka pripremljenog u Laboratorijskom zavodu za regenerativnu neurologiju 0417 (LZRN 0417). Strelica pokazuje neaktiviranu mikrogliju koja ima ramificirani oblik. Mikrogliju sam obojao pomoću markera ionizirana kalcij vezujuća adapter molekula 1 (od engl. *ionized calcium-binding adapter molecule 1* – Iba1) i imunodetektirao konfokalnim mikroskopom.



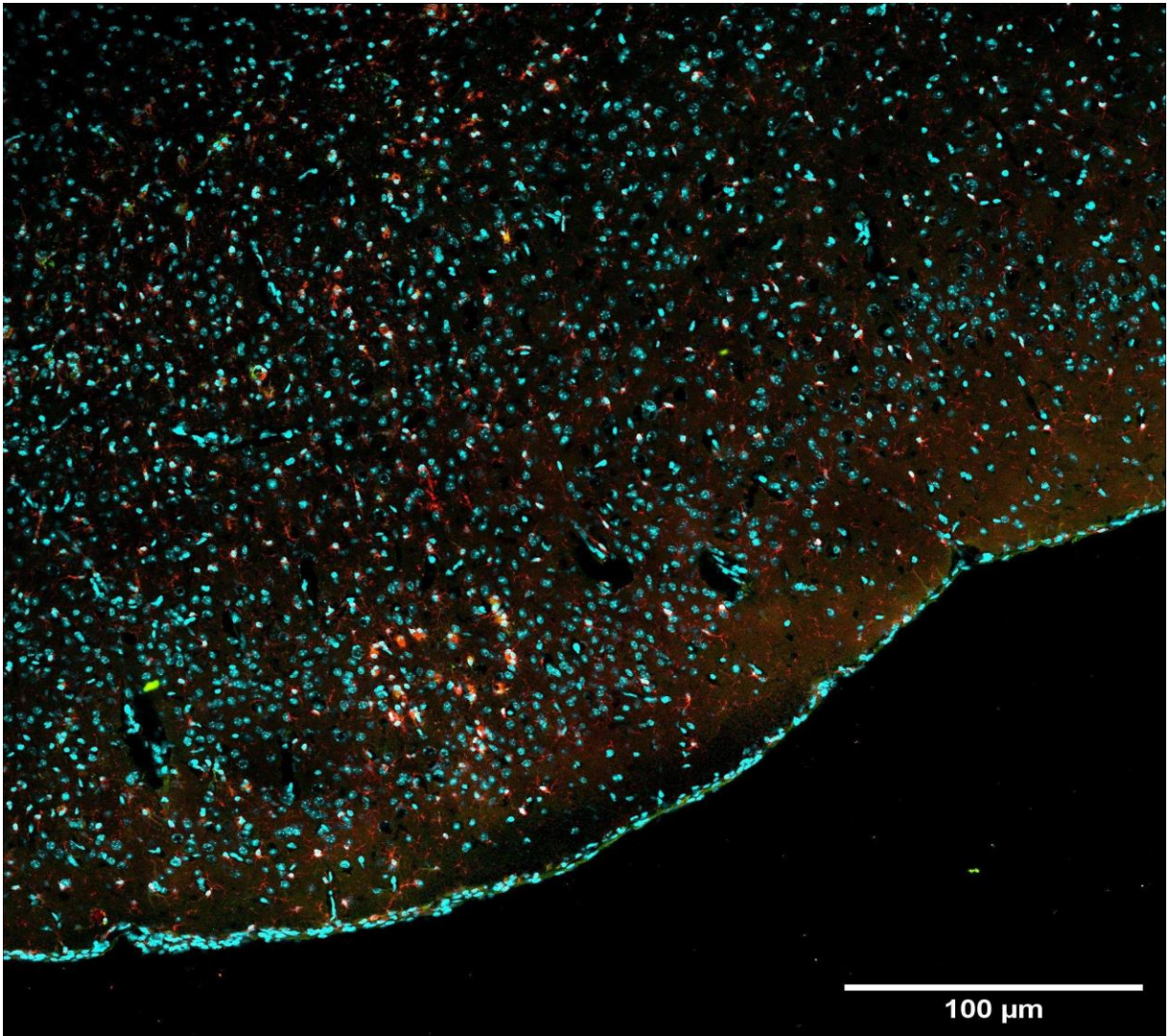
Slika 21. Prikaz ipsilateralne strane korteksa uzorka pripremljenog u Laboratorijskom zavodu za regenerativnu neurologiju 0417 (LZRN 0417). Strelica pokazuje aktiviranu mikrogliju koja ima ameboidni oblik. Mikrogliju sam obojao za marker ionizirana kalcij vezujuća adapter molekula 1 (od engl. *ionized calcium-binding adapter molecule 1* – Iba1) i imunodetektirao konfokalnim mikroskopom.

Aktivacija na ipsilateralnoj strani striatuma izmjerena optičkom gustoćom SPLX skupine znatno je veća od aktivacije na kontralateralnoj strani SPLX i SPLX-SHAM skupine. Također je aktivacija na ipsilateralnoj strani SPLX-SHAM skupine veća od aktivacije na kontralateralnoj strani SPLX i SPLX-SHAM skupine (Slika 22). Na Slici 23 je prikazana aktivacija mikroglije. Kod mjerenja aktivacije markera Iba1 metodom površine signala aktivnost je također veća kod SPLX skupine i to u svim regijama. Unatoč tome, najznačajnija razlika u aktivaciji je bila u području korteksa gdje je nakon obrade podataka vidljivo da je aktivacija na ipsilateralnoj strani SPLX skupine veća od aktivacije na ipsilateralnoj strani SHAM skupine ( $F(3, 235) = 19,48$  i  $P=0,0001$ ). Razina aktivacije ipsilateralne strane SPLX skupine također je veća od razine aktivacije

kontralateralne strane SPLX i SPLX-SHAM skupine. Aktivacija u SPLX-SHAM skupini je veća na ipsilateralnoj strani i prelazi razinu aktivacije kontralateralne strane SPLX skupine (Slika 24).

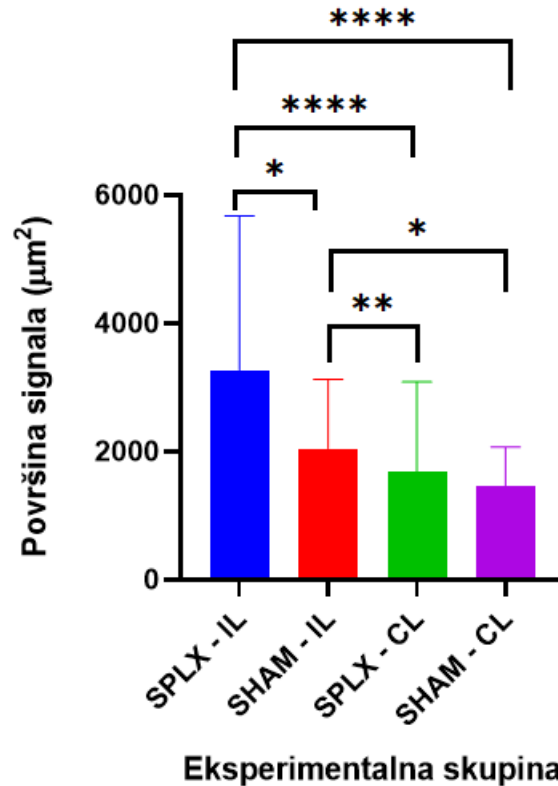


Slika 22. Optička gustoća za marker ionizirana kalcij vezujuća adapter molekula 1 (od engl. *ionized calcium-binding adapter molecule 1* – Iba1) na području striatuma za splenektomiranu (SPLX) i lažno operiranu (SPLX-SHAM) skupinu. Rezultati prikazuju srednju vrijednost ± standardnu devijaciju od 60 mjerenja za sve četiri skupine. IL označava ipsilateralnu stranu, a CL kontralateralnu stranu mozga. Aj označava arbitrarnu jedinicu. Podaci su analizirani ANOVA testom (\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001).



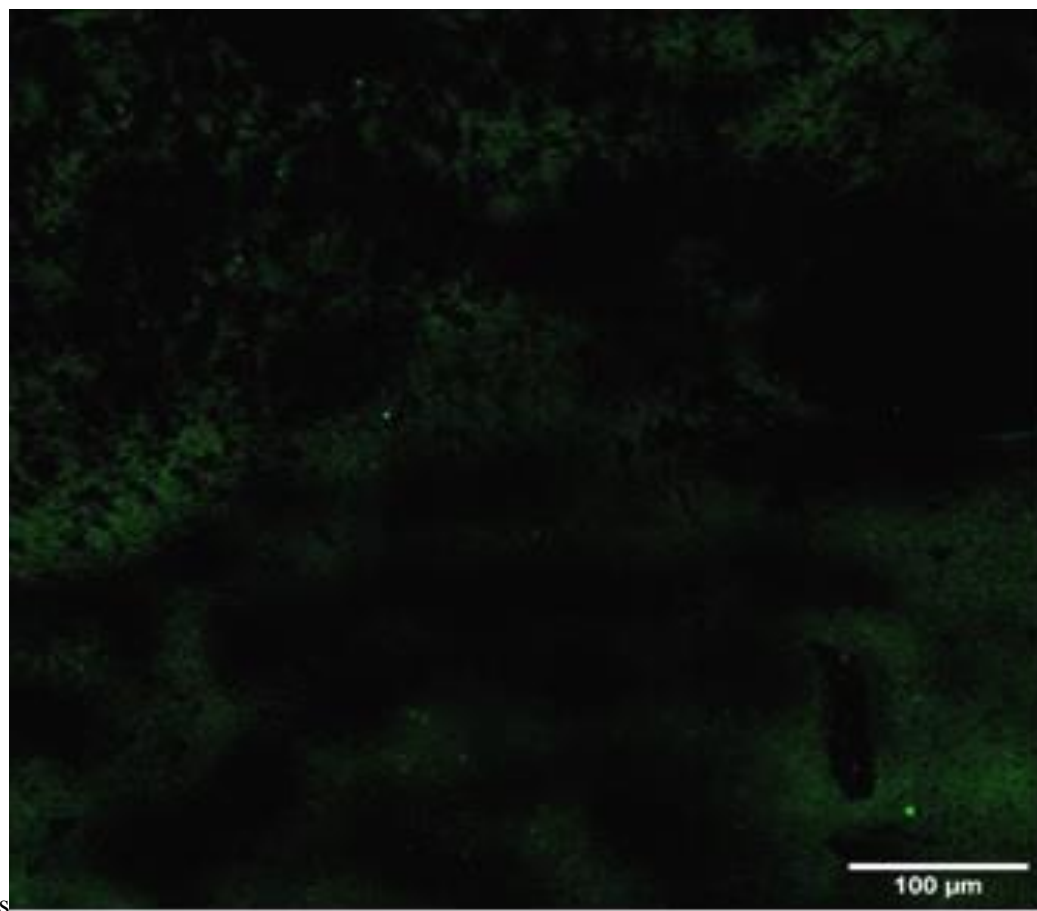
Slika 23. Slika ipsilateralne strane korteksa uzorka pripremljenog u Laboratorijskom zavodu za regenerativnu neurologiju 0902 (LZRN 0902) koji sam obojao za imunodetekciju markera i slikao konfokalnim mikroskopom. Zelenom bojom je označen marker grupa diferencijacije 68 (od engl. *cluster of differentiation 68* - CD68), crvenom marker ionizirana kalcij vezujuća adapter molekula 1 (od engl. *ionized calcium-binding adapter molecule 1* – Iba1) i tirkiznom jezgre stanice obojane bojom 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).





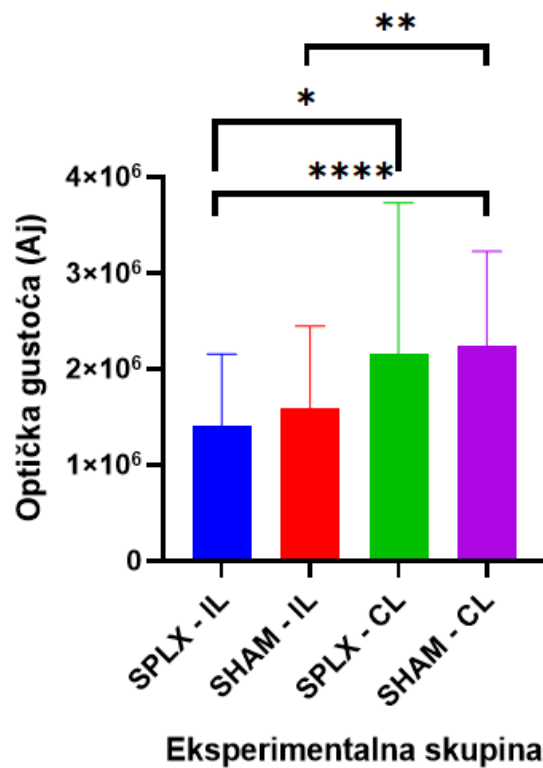
Slika 24. Površina signala za marker ionizirana kalcij vezujuća adapter molekula 1 (od engl. *ionized calcium-binding adapter molecule 1* – Iba1) na području korteksa za SPLX i SPLX-SHAM skupinu. Rezultati prikazuju srednju vrijednost ± standardnu devijaciju od 60 mjerenja za SPLX-IL, SPLX-CL i SHAM-CL skupinu i 59 mjerenja za SHAM-IL skupinu. IL označava ipsilateralnu stranu, a CL kontralateralnu stranu mozga. Podaci su analizirani ANOVA testom (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001).

Tlr2 je receptor koji se nalazi na površini stanične membrane imunskih stanica. Aktivirani Tlr2 marker se može vidjeti na Slici 25. Aktivacija markera Tlr2 izmjerena optičkom gustoćom je otprilike jednaka ako ne i veća u SPLX-SHAM skupini.

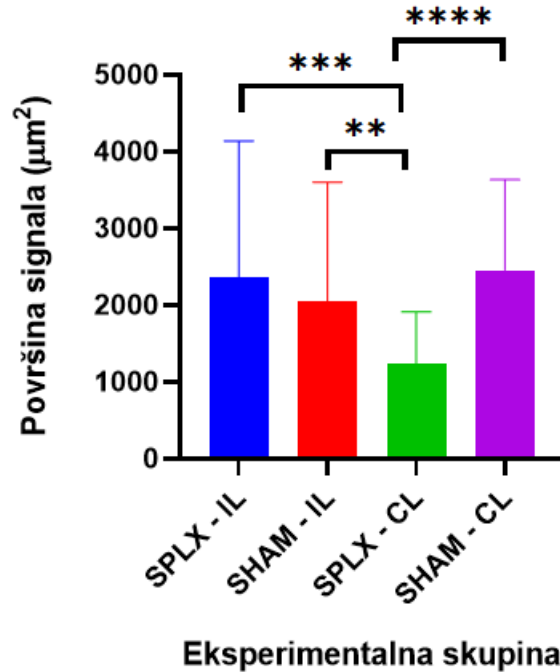


Slika 25. Slika kontralateralne strane striatuma uzorka pripremljenog u Laboratorijskom zavodu za regenerativnu neurologiju 0743 (LZRN 0743) koji sam obojao za imunodetekciju i slikao konfokalnim mikroskopom. Zelenom bojom je označen marker tollu sličan receptor 2 (od engl. *toll like receptor 2* - Tlr2).

Statistički najznačajniji rezultati su u regiji striatuma ( $F(3, 234) = 8,417$  i  $P=0,0001$ ) gdje je aktivacija kontralateralnih strana jednaka kod SPLX i SHAM-SPLX skupine. Također je kontralateralna strana SPLX skupine značajno veća od aktivacije na ipsilateralnoj strani SPLX skupine te je aktivacije na kontralateralnoj strani SPLX-SHAM skupine veća od aktivacije na ipsilateralnoj strani SPLX i SHAM-SPLX skupine (Slika 26). Aktivacija Tlr2 markera izmjerena površinom signala također je otprilike jednaka između dvije skupine, no neznatno je veća kod SPLX skupine. Statistički najznačajnija regija je područje hipokampusa ( $F(3, 235) = 12,49$  i  $P=0,0001$ ) gdje je aktivacija ipsilateralnih strana SPLX i SPLX-SHAM skupine veća od aktivacije na kontralateralnoj strani SPLX skupine. Također je i aktivacija na kontralateralnoj strani SPLX-SHAM skupine veća od aktivacije na kontralateralnoj strani SPLX skupine (Slika 27).



Slika 26. Optička gustoća za marker tollu sličan receptor 2 (od engl. *toll like receptor 2* - Tlr2) na području striatuma za SPLX i SPLX-SHAM skupinu. Rezultati prikazuju srednju vrijednost ± standardnu devijaciju od 60 mjerenja za SHAM-IL, SPLX-CL i SHAM-CL skupinu i 58 mjerenja za SPLX-IL skupinu. IL označava ipsilateralnu stranu, a CL kontralateralnu stranu mozga. Aj označava arbitrarnu jedinicu. Podaci su analizirani ANOVA testom (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).



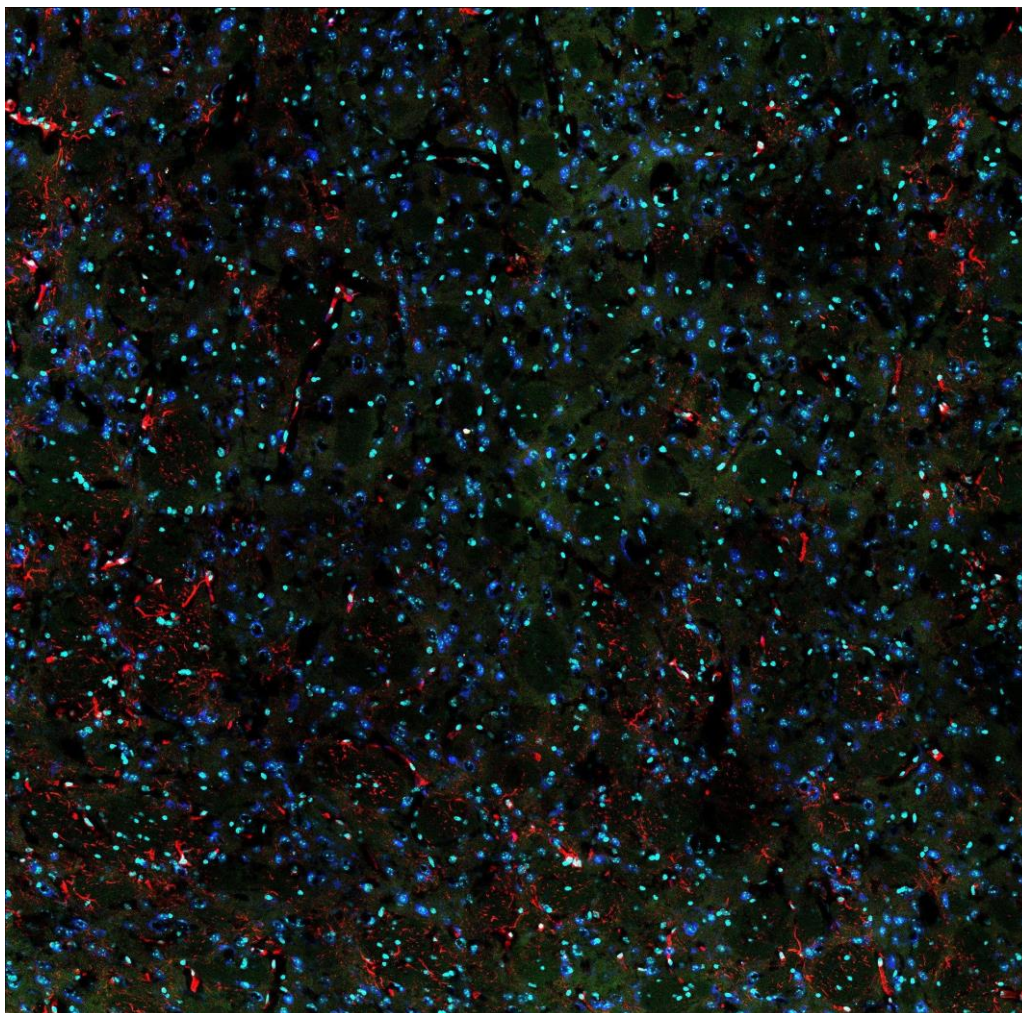
Slika 27. Površina signala za marker tollu sličan receptor 2 (od engl. *toll like receptor 2* - Tlr2) na području hipokampusa za SPLX i SPLX-SHAM skupinu. Rezultati prikazuju srednju vrijednost ± standardnu devijaciju od 60 mjerenja za SPLX-IL, SHAM-IL i SHAM-CL skupinu i 59 mjerenja za SPLX-CL skupinu. IL označava ipsilateralnu stranu, a CL kontralateralnu stranu mozga. Podaci su analizirani ANOVA testom (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

#### 4.4. UTJECAJ MAKROFAGA NA AKTIVNOST ASTROCITA I BROJ NEURONA NAKON ISHEMIJESKE LEZIJE

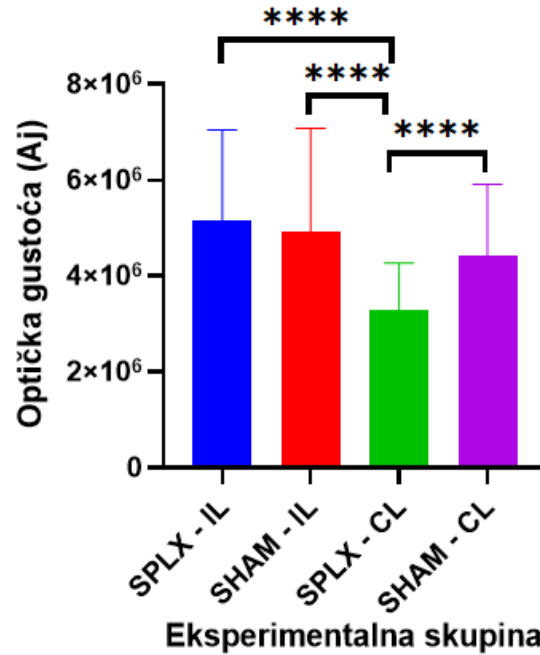
Marker GFAP je protein koji se nalazi u astrocitama. Aktivacija markera GFAP mjerena optičkom gustoćom je otprilike jednaka između SPLX i SPLX-SHAM skupine. Sama aktivnost markera GFAP se može vidjeti na Slici 28. Statistički najznačajniji podaci ( $F(3, 236) = 14,36$  i  $P = 0,0001$ ) su u području striatuma gdje je aktivnost markera kontralateralne i ipsilateralne strane SPLX-SHAM skupine veća od aktivnosti na kontralateralnoj strani SPLX skupine te je aktivnost na ipsilateralnoj strani SPLX skupine veća od aktivnosti na kontralateralnoj strani iste skupine (Slika 29).

S druge strane, kod mjerenja aktivnosti površinom signala SPLX skupina ima veću aktivnost i to na području striatuma koje je statistički najznačajnije ( $F(3, 230) = 16,42$  i  $P = 0,0001$ ).

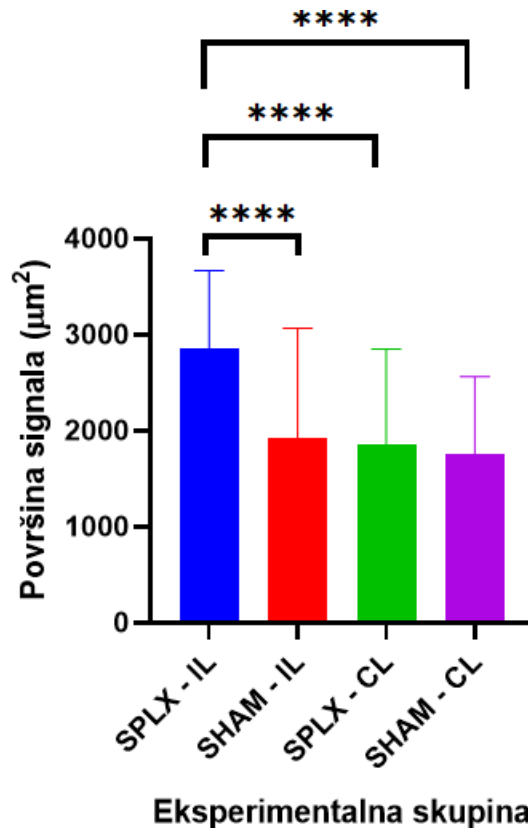
Aktivnost na ipsilateralnoj strani SPLX skupine je značajno veća od aktivnosti na ipsilateralnoj strani SPLX-SHAM skupine i od aktivnosti na kontralateralnoj strani kod SPLX i SPLX-SHAM skupina (Slika 30).



Slika 28. Slika ipsilateralne strane striatuma uzorka pripremljenog u Laboratorijskom zavodu za regenerativnu neurologiju 0902 (LZR0902) koji sam obojao za imunodetekciju markera i slikao konfokalnim mikroskopom. Crvenom bojom je označen marker glijalni fibrilarni kiseli protein (od engl. *glial fibrillary acidic protein* – GFAP), plavom marker heksaribonukleotid vezujući protein-3 (od engl. *hexaribonucleotide binding protein-3* – NeuN) i tirkiznom jezgre stanica obojane bojom 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).



Slika 29. Optička gustoća za marker glijalni fibrilarni kiseli protein (od engl. *glial fibrillary acidic protein* – GFAP) na području striatuma za SPLX i SPLX-SHAM skupinu. Rezultati prikazuju srednju vrijednost ± standardnu devijaciju od 60 mjerenja za sve skupine. IL označava ipsilateralnu stranu, a CL kontralateralnu stranu mozga. Aj označava arbitrarnu jedinicu. Podaci su analizirani ANOVA testom (\*\*\*\*p<0,0001).

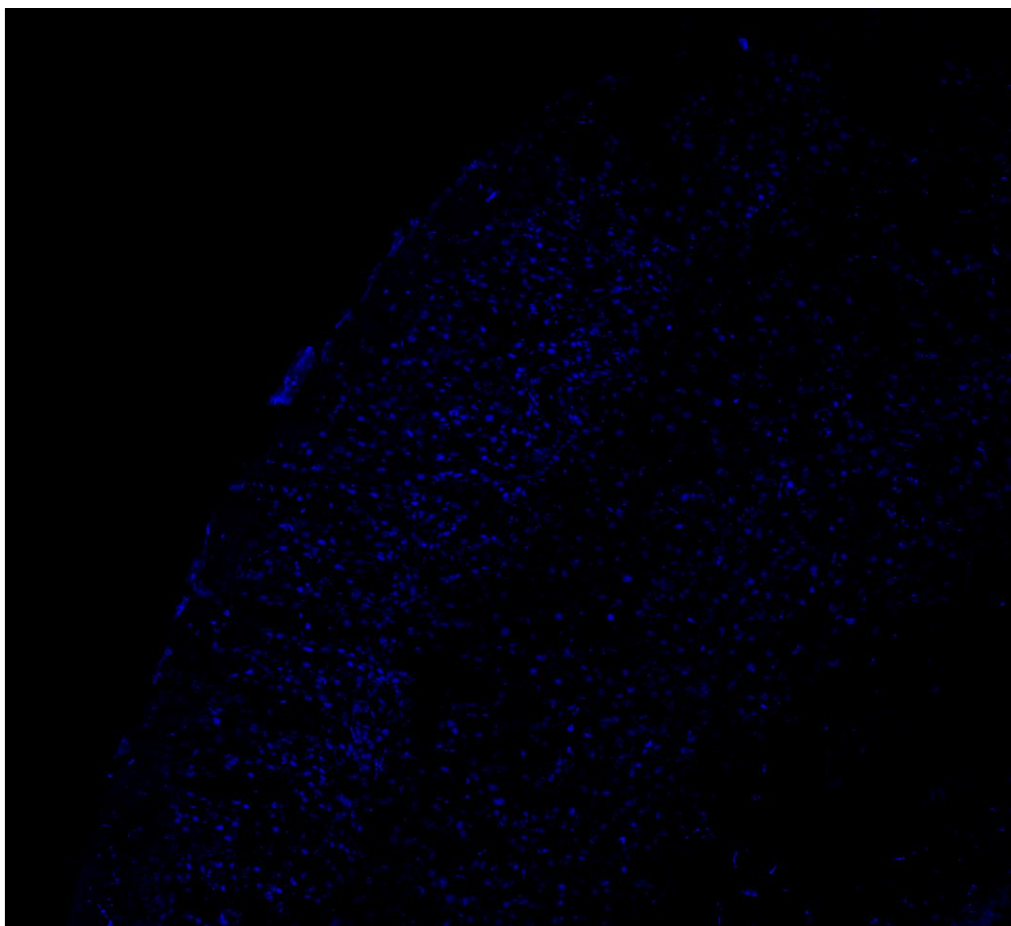


Slika 30. Površina signala za marker gljalni fibrilarni kiseli protein (od engl. *glial fibrillary acidic protein* – GFAP) na području striatuma za SPLX i SPLX-SHAM skupinu. Rezultati prikazuju srednju vrijednost ± standardnu devijaciju od 57 mjerenja za SPLX-IL, 58 za SHAM-IL, 60 za SPLX-CL i 59 za SHAM-CL skupinu. IL označava ipsilateralnu stranu, a CL kontralateralnu stranu mozga. Podaci su analizirani ANOVA testom (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

NeuN je protein koji se nalazi u jezgri neurona. Njegovo bojanje se može vidjeti na Slici 31. Izmjerena aktivnost za marker NeuN optičkom gustoćom je značajno veća kod SPLX-SHAM skupine u odnosu na SHAM skupinu. Statistički najznačajnija razlika ( $F(3, 231) = 24,30$  i  $P = 0,0001$ ) je u području striatuma gdje je aktivnost kontralateralne strane SPLX-SHAM skupine veća od kontralateralne strane SPLX skupine.

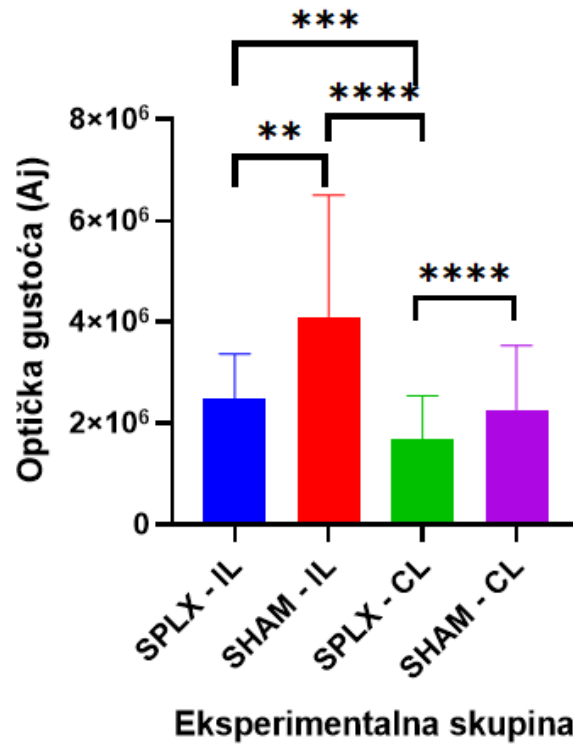
Također je aktivnost na ipsilateralnoj strani SPLX-SHAM skupine znatno veća od aktivnosti na ipsilateralnoj i kontralateralnoj strani SPLX skupine. Uz to je i aktivnost na ipsilateralnoj strani SPLX skupine veća u odnosu na kontralateralnu stranu iste skupine (Slika 32). Aktivnost izmjerena površinom signala također je veća u SPLX-SHAM skupini te je statistički najpouzdanija ( $F(3, 223) = 33,77$  i  $P = 0,0001$ ) u području korteksa. Aktivnost na ipsilateralnoj

strani SPLX-SHAM skupine osrednje je veća u usporedbi s aktivnošću na kontralateralnoj strani iste skupine. S druge strane, aktivnost na ipsilateralnoj strani SPLX-SHAM skupine znatno je veća od aktivnosti na kontralateralnoj i ipsilateralnoj strani SPLX skupine. Ujedno je i aktivnost kontralateralne strane SPLX-SHAM skupine znatno veća od aktivnosti kontralateralne strane SPLX skupine. Također je i aktivnost ipsilateralne strane SPLX skupine dostatno veća od aktivnosti kontralateralne strane iste skupine (Slika 33).

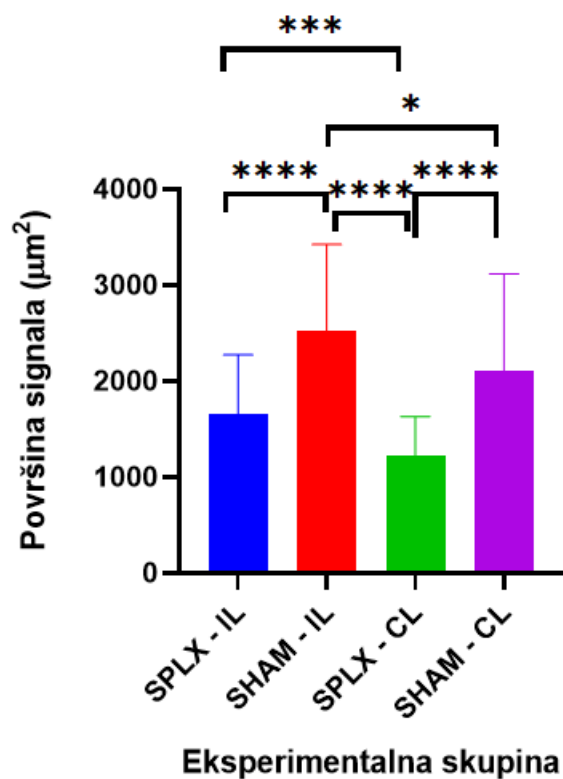


Slika 31. Slika kontralateralne strane korteksa uzorka pripremljenog u Laboratorijskom zavodu za regenerativnu neurologiju 0419 (LZRN 0419) koji sam obojao za imunodetekciju markera i slikao konfokalnim mikroskopom. Plavom bojom je označen marker heksaribonukleotid vezujući protein-3 (od engl. *hexaribonucleotide binding protein-3* – NeuN).





Slika 32. Optička gustoća za marker heksaribonukleotid vezujući protein-3 (od engl. *hexaribonucleotide binding protein-3* – NeuN) na području striatuma za SPLX i SPLX-SHAM skupinu. Rezultati prikazuju srednju vrijednost  $\pm$  standardnu devijaciju od 60 mjerenja za SHAM-IL, SPLX-CL i SHAM-CL skupinu i 55 za SPLX-IL skupinu. IL označava ipsilateralnu stranu, a CL kontralateralnu stranu mozga. Aj označava arbitrarnu jedinicu. Podaci su analizirani ANOVA testom (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).



Slika 33. Površina signala za marker heksaribonukleotid vezujući protein-3 (od engl. *hexaribonucleotide binding protein-3* – NeuN) na području korteksa za skupine SPLX i SPLX-SHAM. Rezultati prikazuju srednju vrijednost  $\pm$  standardnu devijaciju od 55 mjerenja za SPLX-IL, 58 za SHAM-IL, 57 za SPLX-CL i 57 za SHAM-CL skupinu. IL označava ipsilateralnu stranu, a CL kontralateralnu stranu mozga. Podaci su analizirani ANOVA testom (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

## 5. RASPRAVA

Ipsilateralna strana mozga je u ovom eksperimentu mjesto ozljede na koje dolaze imunosne stanice, dok je kontralateralna strana kontrolna strana, kod koje prema hipotezi istraživanja, aktivacija markera bi trebala biti manja. Također je velika važnost u razlici između SPLX i SHAM skupine gdje je SHAM skupina kontrolna grupa i ima slezenu.

CD68 marker je glikoprotein koji se nalazi na mononuklearnim fagocitima u koje spada mikroglija i makrofagi. U stanicama se nalazi u endosomima i može migrirati na površinu stanice. Na njega se vežu apoptotične stanice i fosfatidilserin i potencijalno ima ulogu u procesiranju i prezentaciji antigena (Chistiakov i sur. 2017). Prema dobivenim rezultatima izmjerenima optičkom gustoćom i površinom signala za marker CD68 može se zaključiti da nakon ishemijskog moždanog udara dolazi do migracije mikroglije na mjesto ozljede i poticanja upale. To se potvrđuje jer je aktivacija veća u skupini miševa kojoj je izvađena slezena pa nema perifernih makrofaga koji bi utjecali na upalu. Dodatna potvrda je razlika u aktivaciji na ipsilateralnoj strani SPLX skupine i kontralateralnoj strani SHAM skupine jer kontralateralna strana nije bila zahvaćena ishemijskim moždanim udarom i SHAM skupina ima slezenu.

Iba1 je protein koji veže aktin i nalazi se u naborima stanične membrane mikroglije i prema Sasaki i sur. (2001) mutacija u tom proteinu onemogućuje stvaranje pravilnih nabora i samu fagocitozu. Njegova aktivacija također ide u prilog tvrdnji da je glavni pokretač upale u mozgu mikroglija. To se vidi iz podataka izmjerenih optičkom gustoćom i površinom signala gdje je aktivacija tog markera značajno veća na ipsilateralnoj strani SPLX skupine, nego na ipsilateralnoj strani SHAM skupine.

Tlr2 receptor je po građi transmembranski protein koji se nalazi na stanicama urođene imunosti i prepoznaje različite antigene od patogena i umirućih stanica (Flo i sur 2001). Podaci za Tlr2 se mogu dvojako protumačiti ovisno o metodi mjerenja. Prema podacima dobivenim optičkom gustoćom kontralateralna strana SHAM i SPLX skupine ima veću aktivaciju ovog markera od ipsilateralne strane što upućuje na to da nema uopće upale nakon oštećenja što je kontradiktorno podacima za Iba1 i CD68 marker. To se može objasniti zbog korištenja optičke gustoće kao metode mjerenja, a to će biti kasnije više objašnjeno. S druge strane, podaci o aktivaciji

dobiveni mjerenjem površine signala pokazuju da je aktivacija veća na ipsilateralnoj strani i SHAM i SPLX skupine od kontralateralne strane SPLX skupine. To upućuje na aktivaciju i mikroglije i makrofaga na mjestu oštećenja.

GFAP je protein koji se nalazi u citosolu, a u centralnom živčanom sustavu isključivo u astrocitima gdje ima ulogu intermedijarnog filameta i time ulogu u međustaničnoj komunikaciji, održavanju krvno moždane barijere i mitozu (Baba i sur. 1997). Njegova aktivacija je veća na ipsilateralnoj strani SPLX i SHAM skupine izmjerena optičkom gustoćom i površinom signala. Iz toga se da zaključiti da je došlo do oštećenja na ipsilateralnoj strani jer stanice astrocite pomažu u oporavku od ozljede u mozgu i imaju potpurnu ulogu ostalim stanicama. Također, prema podacima izmjerenim površinom signala GFAP markera ozljeda je veća kod SPLX skupine kojoj je izvađena slezena što potencijalno upućuje na to da makrofagi imaju ulogu u smanjenju upale što ću kasnije detaljnije objasniti.

NeuN je protein koji se nalazi u jezgri neurona. Zbog njegove sposobnosti vezanja DNA i RNA prema Gusel'nikova i Korzhevskiy (2015) sumnja se da ima regulatornu ulogu u jezgri, no ne zna se točno koju. U prilog tvrdnji da je opseg ozljede veći kod SPLX skupine idu podaci o aktivaciji izmjereni optičkom gustoćom i površinom signala po kojima se vidi smanjena aktivacija na ipsilateralnoj strani SPLX skupine u odnosu na istu stranu SHAM skupine. Smanjena aktivacija ukazuje na manji broj neurona i na veću ozljedu uzrokovanu dodatnom upalom koju je uzrokovala mikroglija, a ne periferni makrofagi.

Sama splenektomija je rađena kako bi se uklonio učinak perifernih makrofaga na upalne procese u mozgu u SPLX skupini te kako bi se rezultati mogli usporediti sa skupinom životinja koja ima slezenu (SPLX-SHAM skupina) i time vidjeti kakvu ulogu makrofagi imaju u upali. Dosad je primijećeno kod životinja kako se u akutnoj fazi ishemijskog moždanog udara slezena smanjuje te da je smanjenje u pozitivnoj korelaciji s opsegom ozljede (Liu i sur. 2015). To se može objasniti migracijom imunskih stanica u mozak. Kod prethodno rađenih istraživanja na splenektomiranim životinjama dobiveni su dvojaki rezultati gdje u nekim slučajevima splenektomija djeluje neuroprotektivno (Lai i Todd 2006), a u drugim pogoršava nastalu ozljedu (Konsman i sur. 2007). To se može potencijalno objasniti vremenskim periodom u kojem je rađena splenektomija, prije ili nakon izazivanja ishemijskog moždanog udara (Liu i sur. 2015). Tako je u jednoj studiji pokazano kako splenektomija dva tjedna prije izazivanja trajne okluzije središnje

cerebralne arterije (od eng. *permanent middle cerebral artery occlusion* – pMCAO) djeluje neuroprotektivno smanjujući volumen zahvaćenog tkiva moždanim udarom u štakora za 80% (Honner i Docherty 1999). U drugoj studiji na miševima i štakorima ustanovljeno je kako splenektomija odmah nakon izazivanja MCAO ne poboljšava ishode (Zierath i sur. 2017). Objašnjenje za to je da dolazi do imunskog odgovora zbog same operacije čime je zaključeno da je najbolje vrijeme za raditi splenektomiju dva tjedna prije izazivanja moždanog udara (Seifert i Offner 2018), a u prilog tome ide izmjerena površina signala za Tlr2 marker u području hipokampusa koja sugerira prisutnost makrofaga.

Splenektomija može pogoršati upalne procese u mozgu zbog same prirode makrofaga i mikroglije. Naime, obje vrste stanica imaju sposobnost polarizacije u proupalni M1, oblik koji pogoršava upalu, i u antiupalni M2 oblik, koji pospješuje zacjeljivanje i time oporavak (Xiong i sur. 2016). Sveukupna količina mikroglije (dakle M1 i M2 tip) se smanjuje nakon 48 do 72 sata (Zhao i sur. 2017) dok se makrofagi počinju pojavljivati unutar prva dva sata (Elali i Leblanc 2016) i postignu najveću koncentraciju sedmi dan od udara nakon čega ona počinje padati (Jayaraj i sur. 2019). Međutim, koncentracija M2 tip mikroglije se povećava unutar 12 sati i nakon 3 dana pada, dok se koncentracija M1 tip mikroglije konstantno održava i do 14 dana nakon ishemijskog moždanog udara (Kanazawa i sur. 2017). Prema rezultatima dobivenim u ovom radu za markere CD68 i Iba1 prisutnost mikroglije je veća kod splenektomiranih miševa na ipsilateralnoj strani što sugerira da je mikroglija u M1 tipu polarizacije i pogoršava upalu. Koncentracija makrofaga M1 i M2 tipa je oko 7. dana otprilike ista, no s vremenom koncentracija M1 tip makrofaga pada i nakon 14 dana najviše je prisutan M2 tip makrofaga (Jayaraj i sur. 2019). Prema ovim podacima i rezultatima za NeuN marker čija je prisutnost manja na ipsilateralnoj strani SPLX skupine može se zaključiti da je mikroglija najviše zaslužna za lošu prognozu zbog poticanja upale, dok makrofazi imaju veću ulogu u samom oporavku od ozljede iako same mikroglije imaju sposobnost poticanja zacjeljenja i aksonalnog rasta neurona. Također, količina izmjerenog GFAP markera je veća na ipsilateralnoj strani vjerojatno zbog uloge astrocita u oporavku od ozljede. U prilog tome objašnjenju ide da su rezultati dobiveni 28. dana nakon izazivanja ishemije, što prelazi u kroničnu fazu ishemijske lezije.

Prema jednoj studiji blokiranjem C-C kemokinskog receptora tipa 2 (od eng. *C-C chemokine receptor type 2* - CCR2), koji se nalazi na makrofagima, jedan tjedan nakon tMCAO

dolazi do smanjenja M2 tipa djelovanja makrofaga i smanjena poboljšanja bihevioralnih sposobnosti miševa nakon ishemijskog moždanog udara (Wattananit i sur. 2016). U jednoj drugoj studiji je pokazano kako M1 tip makrofaga pomaže u oporavku i smanjenju oštećenja tako da se polariziraju u M2 tip i potiču polarizaciju drugih makrofaga u M2 tip. U prilog tome ide smanjenje koncentracije M1 tip makrofaga nakon 7 dana s najvećom koncentracijom nakon 3 dana. Nadalje, jedna studija je potvrdila kako splenektomija prije izazivanja moždanog udara smanjuje koncentraciju i infiltraciju M1 tip i M2 tip makrofaga u mozak, no u toj studiji u isto vrijeme nije primijećen nikakav učinak splenektomije na ozljedu koja je nastala nakon moždanog udara (Elali i Leblanc 2016), no prema rezultatima za CD68 marker i Tlr2 marker može se primijetiti da je prisutnost makrofaga manja u SPLX skupini, nego u SPLX-SHAM skupini. Nedostatak učinka se može objasniti time što je splenektomija rađena neposredno prije izazivanja moždanog udara čime se imunostani sustav nije mogao prilagoditi na novonastale uvjete.

Računanjem koeficijenta korelacije između optičke gustoće i površine signala može se primijetiti kako je korelacija većinom velika kod svih markera osim kod markera Tlr2 i NeuN što se može vidjeti i prema izmjerenim podacima. Korelacija je manja za optičku gustoću isto kao što je i izmjerena aktivacija manja. Do razlike dolazi zbog načina na koji metoda radi. Površina signala može biti osjetljivija metoda ako se pravilno postavi prag jer ona mjeri pojedinačne piksele dok optička gustoća mjeri gradijent sive boje. Time, ako ima malo aktivacije ona se izgubi tijekom mjerenja optičke gustoće dok je kod površine signala svaki aktivirani marker reprezentiran pikselom. Sam koeficijent korelacije je mjereno kako bi se ustvrdilo koja je metoda bolja za analizu podataka dobivenih imunohistokemijskim bojanjem.

## 6. ZAKLJUČAK

Splenektomija koja je rađena dva tjedna prije izazivanja ishemijskog moždanog udara metodom tMCAO je pogoršala upalne procese u mozgu nakon moždanog udara što je dokazano statistički značajnim razlikama u SPLX skupini kod kojih je glavni uzročnik upale mikroglia. Također je pokazano kako je upala manja u SPLX-SHAM skupini. Jedno od objašnjenja je to da zbog sposobnosti polarizacije makrofagi pretežno prelaze u M2 tip i time smanjuju upalu djelujući povoljno na posljedice ishemijske lezije u SPLX-SHAM skupini. S druge strane, u SPLX skupini makrofagi nisu prisutni i samim time je upala veća zbog same aktivnosti M1 tipa mikroglie. Također, ovim radom možemo potvrditi da optička gustoća i površina signala mogu dati pouzdane rezultate ovisno o jačini aktivacije. Ako je manje markera koji je aktiviran, površina signala je pogodnija za mjerenje zbog same prirode metode, no obje metode su validne metode mjerenja podataka.

## 7. LITERATURA

- Ahmad, M., Graham, S. H. (2010). Inflammation After Stroke: Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Translational Stroke Research*, 1(2), 74–84
- Amarenco, P., Bogousslavsky, J., Caplan, L. R., Donnan, G. A., Hennerici, M. G. (2009). Classification of stroke subtypes. *Cerebrovascular Diseases*, 27(5), 493–501
- Anrather, J., Iadecola, C. (2016). Inflammation and Stroke: An Overview. *Neurotherapeutics*, 13(4), 661–670
- Baba, H., Nakahira, K., Morita, N., Tanaka, F., Akita, H., Ikenaka, K. (1997). GFAP gene expression during development of astrocyte. *Developmental Neuroscience*, 19(1), 49–57
- Barnes, P. J. (2010). Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 120(2–3), 76–85
- Bonita, R. (1992). Epidemiology of stroke. *The Lancet*, 339(8789), 342–344
- Brott, T., Bogousslavsky, J. (2000). Treatment of acute ischemic stroke. *New England Journal of Medicine*, 343(10), 710–722
- Chistiakov, D. A., Killingsworth, M. C., Myasoedova, V. A., Orekhov, A. N., Bobryshev, Y. V. (2017). CD68/macrosialin: Not just a histochemical marker. *Laboratory Investigation*, 97(1), 4–13
- Corrigan, M. L., Escuro, A. A., Kirby, D. F. (2013). Handbook of clinical nutrition and stroke. *Handbook of Clinical Nutrition and Stroke*, 1–310
- Elali, A., Leblanc, N. J. (2016). *The Role of Monocytes in Ischemic Stroke Pathobiology : New Avenues to Explore*. 8(February), 1–7
- Flo, T. H., Halaas, O., Torp, S., Ryan, L., Lien, E., Dybdahl, B., Sundan, A., Espevik, T. (2001). Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 69(3), 474–481



- Fluri, F., Schuhmann, M. K., Kleinschnitz, C. (2015). Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 3445–3454
- Gusel'nikova, V. V, Korzhevskiy, D. E. (2015). NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae*, 7(2), 42–47
- Honner, V., Docherty, J. R. (1999). Investigation of the subtypes of  $\alpha 1$ -adrenoceptor mediating contractions of rat vas deferens. *British Journal of Pharmacology*, 128(6), 1323–1331
- Iadecola, C., Anrather, J. (2011). The immunology of stroke: From mechanisms to translation. *Nature Medicine*, 17(7), 796–808
- Jayaraj, R. L., Azimullah, S., Beiram, R., Jalal, F. Y., Rosenberg, G. A. (2019). Neuroinflammation : friend and foe for ischemic stroke. *Journal of Neuroinflammatioan* , 142(16), 1–24.
- Jin, R., Liu, L., Zhang, S., Nanda, A., Li, G. (2013). Role of Inflammation and Its Mediators in Acute Ischemic Stroke. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 6 (September), 834–851
- Jin, R., Yang, G., Li, G. (2010). Inflammatory mechanisms in ischemic stroke : role of inflammatory cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 87 (May), 779–789
- Kanazawa, M., Ninomiya, I., Hatakeyama, M., Takahashi, T. (2017). Microglia and Monocytes / Macrophages Polarization Reveal Novel Therapeutic Mechanism against Stroke. *International Journal of Molecuar Sciences*, 18(10), 2135-2153
- Kim, E., Cho, S. (2016). Microglia and Monocyte-Derived Macrophages in Stroke. *Neurotherapeutics*, 13(4), 702–718
- Konsman, J. P., Drukarch, B., Van Dam, A. M. (2007). (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. *Clinical Science*, 112(1–2), 1–25.
- Kumar, A., Aakriti, Gupta, V. (2016). A review on animal models of stroke: An update. *Brain Research Bulletin*, 122, 35–44
- Lai, A. Y., Todd, K. G. (2006). Microglia in cerebral ischemia: Molecular actions and interactions. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 84(1), 49–59.

- Lapchak, P. A., Araujo, D. M. (2007). Advances in hemorrhagic stroke therapy: Conventional and novel approaches. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 12(3), 389–406.
- Li, Y., Chen, J., Zhang, C. L., Wang, L., Lu, D., Katakowski, M., Gao, Q., Shen, L. H., Zhang, J., Lu, M., Chopp, M. (2005). Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia*, 49(3), 407–417
- Liu, Z., Chen, C., Li, F., Shen, J., Yang, Y., Leak, R. K., Ji, X., Du, H., Hu, X. (2015). Splenic Responses in Ischemic Stroke : New Insights into Stroke Pathology Splenic Changes after Stroke Changes in the Cellular Components of the How are Splenic Responses Triggered after Stroke ? *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 21(4), 320-326
- Mukaka, M. M. (2012). Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Medical Journal : The Journal of Medical Association of Malawi*, 24(3), 69–71
- Napetschnig, J., Wu, H. (2013). Molecular basis of NF- $\kappa$ B signaling. *Annual Review of Biophysics*, 42(1), 443–468
- Neaton, J. D., Wentworth, D. N., Cutler, J., Stamler, J., Kuller, L. (1993). Risk factors for death from different types of stroke. *Annals of Epidemiology*, 3(5), 493–499.
- Nithianandarajah-Jones, G. N., Wilm, B., Goldring, C. E. P., Müller, J., Cross, M. J. (2012). ERK5: Structure, regulation and function. *Cellular Signalling*, 24(11), 2187–2196
- Punt J., Stranford S.A., Jones P.P., Owen J.A. (2019): Kuby immunology (8th edition), W.H. Freeman and Company, New York
- Rabinovich, S. S., Seledtsov, V. I., Banul, N. V., Poveshchenko, O. V., Senyukov, V. V., Astrakov, S. V., Samarin, D. M., Taraban, V. Y. (2005). Cell therapy of brain stroke. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 139(1), 126–128.
- Ridder, D. A., Schwaninger, M. (2009). NF- $\kappa$ B signaling in cerebral ischemia. *Neuroscience*, 158(3), 995–1006

- Sakata, Y., Dong, J. W., Vallejo, J. G., Huang, C. H., Baker, J. S., Tracey, K. J., Tacheuchi, O., Akira, S., Mann, D. L. (2007). Toll-like receptor 2 modulates left ventricular function following ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 292(1), 503–509
- Sasaki, Y., Ohsawa, K., Kanazawa, H., Kohsaka, S., Imai, Y. (2001). Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286(2), 292–297
- Seifert, H. A., Offner, H. (2018). The splenic response to stroke: from rodents to stroke subjects. *Journal of Neuroinflammation* 195(15), 1-7.
- Sorby-Adams, A. J., Vink, R., Turner, R. J. (2018). Large animal models of stroke and traumatic brain injury as translational tools. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 315(2), R165–R190.
- Vidale, S., Consoli, A., Arnaboldi, M., Consoli, D. (2017). Postischemic inflammation in acute stroke. *Journal of Clinical Neurology (Korea)*, 13(1), 1–9.
- Wang, Z. Q., Wu, D. C., Huang, F. P., Yang, G. Y. (2004). Inhibition of MEK/ERK 1/2 pathway reduces pro-inflammatory cytokine interleukin-1 expression in focal cerebral ischemia. *Brain Research*, 996(1), 55–66
- Wattananit, S., Tornero, D., Graubardt, N., Memanishvili, T., Monni, E., Tatarishvili, J., Miskinyte, G., Ge, R., Ahlenius, H., Lindvall, O., Schwartz, M., Kokaia, Z. (2016). Monocyte-derived macrophages contribute to spontaneous long-term functional recovery after stroke in mice. *Journal of Neuroscience*, 36(15), 4182–4195
- Xiong, X., Liu, L., Yang, Q. (2016). Functions and Mechanisms of Microglia/Macrophages in Neuroinflammation and Neurogenesis during Stroke. *Progress in Neurobiology*.
- Zhao, S. C., Ma, L. S., Chu, Z. H., Xu, H., Wu, W. Q., Liu, F. (2017). Regulation of microglial activation in stroke. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(4), 445–458.
- Zierath, D., Shen, A., Stults, A., Olmstead, T., Becker, K. J. (2017). Splenectomy Does Not Improve Long-Term Outcome after Stroke. *Stroke*, 48(2), 497–500.

## 8. ŽIVOTOPIS

Opću gimnaziju u Srednjoj školi Zlatar završio sam 2016. godine te upisao Preddiplomski sveučilišni studij Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom druge godine preddiplomskog studija primao sam STEM stipendiju. 2019. godine završio sam Preddiplomski studij Biologije i upisao Diplomski sveučilišni studij Eksperimentalna biologija modul fiziologija i imunobiologija. Tijekom druge godine studija primao sam Stipendiju za izvrsnost grada Zagreba.

U akademskoj godini 2018./2019. odradio sam Laboratorijsku stručnu praksu na Zavodu za Molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. U periodu od 18.10.2021. do 01.03.2022. radio sam u Poliklinici za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku Synlab na molekularnoj dijagnostici spolno prenosivih bolesti i SARS-CoV-2. Od 01.03.2022. sam krenuo raditi u Poliklinici Breyer na izolaciji plazme iz krvi koja se dalje koristila za prenatalnu dijagnostiku. 2021. godine sam položio certifikat LabAnim A kategorije za osposobljenost za rad s laboratorijskim životinjama. Od 06. do 09.04.2022. sam sudjelovao na sedamnaestoj RECOOP konferenciji (Regional Cooperation for Health, Science and Technology) gdje sam bio jedan od izlagača.

Položio sam IELTS ispit za služenje engleskim jezikom 2019. godine te sam po samoprocjeni na C1 razini. Govorim i pišem njemački po samoprocjeni na B1 razini. Snalazim se s francuskim jezikom na A1 razini. Dobro se služim s Microsoft Office paketom te imam osnovno znanje u radu s programom ImageJ.