

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

Ante Petrović, Dominik Kutlić

**Analiza slikovnih podataka procesa kortikogeneze nakon ishemijske lezije odraslog  
mišjeg mozga**

Zagreb, 2022.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof.dr.sc. Srećka Gajovića i Sanje Srakočić, mag. biol. mol. u sklopu znanstvenog projekta (HRZZ projekt "Multimodalni prikaz molekularnih zbivanja tijekom oporavka mišjeg mozga nakon ishemijskog oštećenja" – RepairStroke (IP-2016-06-1892); Sveučilište u Zagrebu, voditelj: prof. dr. sc. Srećko Gajović) i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2021./2022.

## POPIS KRATICA

Bcl11b - *B-cell lymphoma 11b*

BCL-6 – *B-cell lymphoma 6*

CADASIL – *Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Sub-cortical Infarcts and Leukoencephalopathy*, cerebralna autosomalna dominantna arteriopatija sa subkortikalnim infarktima i leukoencefalopatijom

CNS – *central nervous system*, središnji živčani sustav, centralni nervni sistem

COUP-TF - *Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor*

Ctip2 – *Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor-Interacting Protein 2*

DNA – *deoxyribonucleic acid*, deoksiribunukleinska kiselina

Fezf2 – *Fez family zinc finger protein 2*

FOG-1 – *zinc finger protein ZFPM1*

HAT – *histone acetyltransferase*, histonska acetiltransferaza

HDAC – *histone deacetylase*, histonska deacetilaza

IHC – imunohistokemija

MAR – *matrix attachment regions*

MBD3 – *methyl-CpG binding domain*

MCAO – *Middle Cerebral Artery occlusion*

miRNA – mikro-RNA

MP UVSH – Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede

MRI – magnetna rezonancija

MTA2 – *metastasis-associated protein 2*

NuRD – *Nucleosome Remodeling Deacetylase*

p53 – tumorski protein P53

PBS – *phosphate-buffered saline*

PFA – *paraformaldehyde*

RNA – *ribonucleic acid*, ribonukleinska kiselina

ROI – *Regions of Interest*

Satb2 – *Special AT-rich Sequence Binding Protein 2*

SD – standardna devijacija

SLE – *systemic lupus erythematosus*, sistemski eritematozni lupus

Sox5 – *SRY-Box Transcription Factor 5*

T2MAP – *T2 mapping*

T2W – *T2 weighted image*

TIA – *transient ischemic attack*, tranzitorna ishemijska ataka

## SADRŽAJ RADA

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Moždani udar</b> .....	1
<b>1.2. Kortikogeneza kod miševa</b> .....	2
<b>1.3. Satb2 i Ctip2</b> .....	2
<b>1.4. Mogućnosti pretkliničkih analiza mišjeg mozga</b> .....	4
<b>2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA</b> .....	5
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	5
<b>3.1. Etička dopusnica</b> .....	5
<b>3.2. Dizajn studije</b> .....	6
<b>3.3. Eksperimentalne životinje i izazivanje ishemijskog oštećenja mozga</b> .....	6
<b>3.4. Snimanje magnetne rezonancije i obrada snimki</b> .....	7
<b>3.5. Izolacija i priprema mozgov za histološke metode bojanja</b> .....	8
<b>3.6. Imunohistokemija</b> .....	9
<b>3.7. Obrada rezultata imunohistokemije</b> .....	9
<b>3.8. Obrada snimki preparati bojanih po Nisslu</b> .....	9
<b>3.9. Statistička obrada rezultata</b> .....	9
<b>4. REZULTATI</b> .....	10
<b>4.1. Validacija ishemijskog oštećenja mišjeg mozga</b> .....	10
<b>4.1.1. Rezultati obrade MRI snimaka</b> .....	10
<b>4.1.2. Rezultati obrade preparata bojanih po Nisslu</b> .....	12
<b>4.1.3. Neurološki deficit</b> .....	14
<b>4.2. Izražaj markera kortikogenze nakon ishemijskog oštećenja mišjeg mozga</b> ....	14
<b>5. RASPRAVA</b> .....	18
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	20
<b>7. ZAHVALE</b> .....	21
<b>8. LITERATURA</b> .....	22
<b>9. SAŽETAK</b> .....	24
<b>10. SUMMARY</b> .....	25
<b>11. ŽIVOTOPISI AUTORA</b> .....	26

# 1. UVOD

## 1.1. Moždani udar

Moždani udar jedan je od vodećih uzroka smrti i onesposobljenosti odraslih u svijetu. Definira se kao naglo nastali žarišni neurološki deficit uzrokovan akutnom fokalnom lezijom središnjeg živčanog sustava vaskularnog podrijetla, tj. riječ je o kliničkoj prezentaciji cerebrovaskularne bolesti koja traje duže od 24h ili dovodi do smrti (1,2). Etiološki postoje dvije vrste moždanog udara – ishemijski i hemoragični. Najčešći su ishemijski, koji najčešće nastaju zbog smanjenog protoka krvi zbog arterijske okluzije ili rjeđe zbog okluzije moždanih vena ili venskih sinusa. Upravo su oni tema ovoga istraživanja. Druga vrsta, hemoragični moždani udari, uzrokovani su rupturom moždane arterije (1). Također, vrijedi spomenuti i subarahnoidalno krvarenje, najčešće kao posljedicu ruptуре aneurizme cerebralnih krvnih žila (2).

Prema trajanju razlikujemo tranzitornu ishemijsku ataku (TIA), moždani udar u razvoju i dovršeni moždani udar (2). Dva najvažnija mehanizma nastanka arterijske okluzije kod ishemijskog moždanog udara jesu embolija (rupture aterosklerotskog plaka iz aorte ili njenih ogranaka ili iz srca, najčešće uslijed fibrilacije atrijske, infarkta miokarda, umjetnih valvula, kongestivnog zatajenja srca, itd.) i *in situ* tromboza. Bolest malih krvnih žila (hijalina arterioskleroza, amiloidna angiopatija, mikroateromi, CADASIL) vodi do malih subkortikalnih infarkta, tzv. lakunarnih infarkta (1,2). Disekcija cervikalne arterije je jedan od češćih uzroka moždanog udara u mlađim pacijenata (< 60 godina) (1). Kada se protok krvi u moždanoj arteriji smanji uslijed okluzije ispod kritične razine, dolazi do poremećaja električne aktivnosti neurona i razvija se klinički deficit (1). Normalna cerebralna perfuzija iznosi otprilike 60 ml/100 g tkiva/min, a do simptoma dolazi uslijed pada protoka ispod 22ml/100 g/min (2). Ukoliko je moždani protok značajno snižen i traje dovoljno dugo (5 – 10 min), razvija se ireverzibilno oštećenje tkiva. U mnogo slučajeva kolateralna opskrba krvi putem leptomeningealnih anastomoza ili Willisova kruga je dovoljna za osigurati preživljenje stanica tijekom određenog vremena (1,2). Značajne su razlike i specifičnosti pojedinih odjeljaka cerebralne cirkulacije pa tako velike intrakranijalne žile anastomoziraju putem Willisova kruga, ekstrakranijalnih i pijalnih, leptomeningealnih anastomoza i u slučaju okluzije ovih krvnih žila postoje velike varijacije zahvaćenosti parenhima. S druge pak strane površinske, kortikalne arterije anastomoziraju putem pijalnih kolaterala te su varijacije zahvaćenosti parenhima manje. Duboke, perforantne arterije imaju malu mogućnost anastomoziranja, stoga je zona ishemija ograničena i s malim varijacijama (2). Regije mozga koje su opskrbljene putem kolateralne opskrbe, a nalaze se između funkcionalnog i nekrotičnog tkiva, i koje se potencijalno mogu spasiti nazivaju se ishemijska penumbra ili zona penumbre (1,2). Nju neprestano ugrožava mogućnost prekida cirkulacije uslijed nastanke citotoksičnog i vazogenog edema (2).

Patološki gledano, kod ishemijskih infarkta prve se promjene u neuronima viđaju nakon 12 do 24 h u vidu bubrenja, gubitka Nisslove tvari i pretvorbe u neurone s piknotičnom jezgrom. Nakon 24 h razvija se upalna reakcija s neutrofilima koji se potom nadomještaju makrofazima te dolazi do nastanka područja likvefakcije nekroze s neoštrom granicom bijele i sive tvari. Od drugog dana prisutni su brojni makrofagi obilne pjenušave citoplame, a nakon petog dana astrociti postepeno stvaraju ožiljak na tom mjestu koji se razgraničuje od okolnog tkiva. U isto vrijeme, uslijed pojave zone pojačane prokrvljenosti

u sklopu reparacijskog tkiva na granici s infarktom, dolazi do resorpcije nekrotičnog tkiva i smanjena edema. U konačnici se razvija pseudocista (3).

## 1.2. Kortikogeneza kod miševa

U miševa kortikogeneza započinje prije rođenja, od 10. dana embrionalnoga razvoja. Od prvobitne skupine homogenih multipotentnih stanica razvija se slojevita struktura sa različitim skupinama neurona. Mišji mozak se razvija u kaudalno-rostralnom i medijalno-lateralnom smjeru. Kortikogeneza obuhvaća: proliferaciju multipotentnih stanica (11. – 16. dan embrionalnog razvoja), migraciju postmitotskih stanica (11. – 17. dan embrionalnog razvoja), staničnu morfogenezu (12. – 18. dan embrionalnog razvoja), gliogenezu i sinaptogenezu (16. dan embrionalnog razvoja do ranog postnatalnog razdoblja) i reorganizaciju, eliminaciju i stabilizaciju neuronalne mreže (do odraslog razdoblja) (4).

U početku se razvijaju dva germinativna sloja: ventrikularna i subventrikularna zona. One oblažu moždane komore i stvaraju piramidalne i inhibitorne neurone moždane kore. Važne stanice ovih slojeva su radijalne glija stanice i intermedijarni neuronalni prekursori (5).

Radijalne glija stanice su bipolarne progenitorske stanice iz kojih nastaju budući neuroni moždane kore, astrociti, oligodendrociti. Stanično tijelo im se nalazi u ventrikularnoj zoni te imaju bazalni nastavak koji se proteže sve do buduće moždane kore. Taj bazalni nastavak neuroni koriste za migraciju do svojega mjesta u moždanoj kori. Intermedijarni neuronalni prekursori nastaju iz asimetrične stanične diobe radijalnih glija stanica te se oni simetrično dijele u subventrikularnoj zoni da bi nastali neuroni. Brzina proliferacije i diferencijacije je određena signalima iz stanične okoline. Smatra se da povećana gustoća neuronalnih prekursora pomoću međustaničnih spojeva smanjuje brzinu proliferacije (5).

Migracija postmitotskih stanica je proces kojim novonastali neuroni iz germinativnih slojeva putuju do kortikalne ploče putem nastavka radijalnih glijalnih stanica. Na ovaj način se stvara budućih 6 slojeva moždane kore. Sloj u kojem će neuron završiti ovisi o vremenu kada je nastao, ranije rođeni neuroni nastanjuju dublje slojeve moždane kore, a kasnije rođeni neuroni nastanjuju površinske slojeve (5). Ovi se neuroni diferenciraju u ekscitacijske piramidalne neurone. Inhibitorni interneuroni moždane kore nastaju u ganglijskoj eminenciji i migriraju tangencijalno. Rast moždane kore prati i rast bazalnih nastavaka radijalnih glija stanica kako bi cijelo vrijeme održale vezu između germinativnih slojeva i moždane kore (6). Oko vremena rođenja kortikogeneza usporava, a nastavlja se neurogeneza (5).

## 1.3. Satb2 i Ctip2

Satb2 i Ctip2 čimbenici su prepisivanja aktivni tijekom kortikogeneze.

Satb2 protein vezanjem za DNA regulira organizaciju kromatina i gensku ekspresiju (7). Prepoznavanjem šećer-fosfat struktura DNA, on se veže za sekvencije bogate adenozinom i timinom unutar regije MAR (od eng. *matrix attachment regions*), pri tom potičući remodeliranje kromatina te djelujući kao ciljno mjesto drugih proteina koji remodeliraju kromatin. Nadalje, Satb2 omogućava interakcije između genskih promotora i genskih pojačivača putem korepresora HDAC (histonska deacetilaza, eng. *histone deacetylase*) i koaktivatora HAT (histonska acetiltransferaza, eng. *histone acetyltransferase*). Ima višestruku ulogu u embrionalnom razvoju različitih vrsta tkiva, uključujući živčani, koštani, razvitku nepca. (7,8). Zanimljivo je da se smatra da Satb2 ima ulogu u razvoju

inteligencije, spacijalne i dugoročne memorije u ljudi i miševa što se povezuje s njegovom ekspresijom u CA1 regiji hipokampusa i ulogom u plastičnosti mozga koja je posredovana utjecajem Satb2 na izražaj drugih gena i miRNA (9). U mišjim embrijima Satb2 je detektirana u rombomerama, moždanoj kori i kralježničnoj moždini, dok je kod odraslih miševa eksprimiran u moždanoj kori (u svim slojevima i to isključivo u ekscitatornim neuronima), hipokampusu, strii terminalis, strii diagonalis Broca, kralježničnoj moždini, lateralnom hipotalamusu, nucleusu arcuatusu, paraventrikularnoj jezgri hipotalamusa, ventralnoj tegmentalnoj jezgri, laterodorzalnoj tegmentalnoj jezgri, dorzalnim raphe jezgrama, rostralnoj periolivarnoj regiji, parabrahijalnom nukleusu itd (9,10). Prisutnost Satb2 u dopaminergičnim neuronima hipotalamusa i serotoninergičnim neuronima dorzalnih rafe jezgara na mišjim modelima ukazuje da bi mogao imati učinak na razvoj odraslog mozga i psihičkih bolesti (10). Tijekom razvoja moždane kore, Satb2 se eksprimira u kortikalnim neuronima koji se projiciraju preko corpus callosuma, dakle, igra ulogu u kortikokortikalnom povezivanju neurona, kako ipsilateralnom, tako i u kontralateralnom, tj. u formaciji corpus callosum (7,9). Kod miševa kod kojih je nokautiran gen za Satb2 ne dolazi do razvoja corpus callosuma i piramidni se neuroni projiciraju supkortikalno (9). Ovako promijenjen tijekom neuralnih projekcija može biti posljedica defekta konstrukcije corpus callosum, poremećaja na razini ekspresije molekula zaduženih za vođenje aksona ili promjene specifikiranju stanične sudbine (eng. *cell fate specification*) (7,11,12). Kod miševa bez Satb2 pronađena je u neuronima gornjih slojeva moždane kore ektopična ekspresija transkripcijskog faktora Ctip2, koji je ključan za produbljivanje supcerebralnih projekcija supkortikalnih neurona, dok pretjerana ekspresija Satb2 u matičnim živčanim stanicama dovodi do inhibicije ekspresije Ctip2 (7,9). Kod miševa koji su nokautirani za Satb2 gen pojavljuje se ekspresija Ctip2 gena cijelom debljinom korteksa, a ne samo u donjim slojevima, dok kod ektopične ekspresije Satb2 dolazi do supresije ekspresije Ctip2 u onim neuronima koji ga inače ekspimiraju (7). Mehanizam kojim se to ostvaruje je sljedeći: Satb2 se veže za MAR sekvencije promotorske regije gena za Ctip2 i zajedno sa protoonkogenom Ski te histonskom deacetilazom HDAC1 i MTA2 (od eng. *metastasis-associated protein 2*) stvara NuRD kompleks (Nucleosome Remodeling Deacetylase), mijenjajući strukturu histona i kromatina smanjenjem dimetilacije i acetilacije histona (7,9,11,12). MAR sekvence nalaze se uzvodno i nizvodno od okvira čitanja gena za Ctip2 te Satb2 upravo tu ulazi u interakciju s DNA. Unatoč tome, Satb2 nije jedini mehanizam regulacije ekspresije Ctip2 (7). Također, u postnatalnom mozgu uslijed aktivnosti faktora Lmo4 suprimira se represija Ctip2 putem Satb2. Naime, Lmo4 dovodi do derepresije Ctip2 natječući se sa Satb2 za HDAC1 (12).

Ova su događanja usko povezana s utjecajem na ekspresiju Ctip2 (9). Ctip2 jedan je od gena uključenih u ranu specifikaciju supkortikalnih projekcijskih neurona u razvijajućem korteksu i rast njihovih aksona (7). Sam Ctip2 je transkripcijski faktor cinkova prsta koji se osim u središnjem živčanom sustavu, eksprimira u timocitima, koži, olfaktornom epitelu te oralnom i crijevnom epitelu. Između ostalog uključen je u rani razvoj T-stanica (13,14). Ctip2, punog imena protein 2 koji interagira s transkripcijskim faktorom uzvodnog promotora pilećeg ovalbumina (eng. *chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF)-interacting protein 2*), znan još kao Bcl11b (eng. *B-cell lymphoma 11b*), jako je izražen u razvijajućem mišjem mozgu i to prvenstveno u petom sloju korteksa, striatumu, olfaktornom bulbusu, hipokampusu, limbičkom sustavu, bazalnim ganglijima te intermedijarnoj regiji kralježničke moždine. Njegova uloga u CNS-u jest razvoj aksonalnog rasta

kortikospinalnih motoneurona u središnjem živčanom sustavu, a o čemu u prilog govore rezultati istraživanja na miševima defektnima za Ctip2. Svoj učinak postiže putem povezivanja s NuRD kompleksom, što se pak ostvaruje pomoću ribosomskih podjedinica RbAp46 i RbAp48. Ctip2 i NuRD vežu se za promotor gena p57KIP2 koji kodira inhibitor kinaze ovisne o ciklinu, a koja je zaslužna za kontrolu staničnog ciklusa i neuronalne diferencijacije. Tim vezanjem dolazi do represije ciljnih gena Ctip2. Važnu ulogu u tom procesu transkripcijske represije imaju različite histonske deacetilaze, npr. HDAC1, HDAC2, MTA1, MTA2, MTA3, MBD3, kao i transkripcijski faktori p53, Ikaros, BCL-6, FOG-1 (14).

Satb2 također ima ulogu u formiranju kortikospinalnog trakta (što se vidi iz činjenice da do njegovog razvoja ne dolazi kod miševa koji su nokautirani za ovaj gen) i u razvoju projekcijskih neurona (što ostvaruje aktivacijom Fezf2 i Sox5) (7,9,12). Naime, s obzirom da je riječ o transkripcijskom faktoru koji regulira aktivnost velikog broja drugih gena, nekih preko regulacije Ctip2, a nekih drugim mehanizmima, Satb2 je važan faktor u diferencijaciji različitih vrsta neurona, npr. centralnih motoneurona, neurona 5. sloja korteksa te navođenju aksona (*axon-guidance*). Smatra se odgovornim za sprječavanje diferencijacije u smjeru motoneurona koji će formirati kortikospinalni put što je u skladu s njegovom ulogom u formiranju kortikokortikalnih projekcija (7,11). Nadalje, Satb2 i Ctip2 reguliraju ekspresiju receptora za netrin1 (Unc5C) koji imaju različite mehanizme djelovanja na aksonski rast (12). Poremećaj razvoja projekcijskih neurona zabilježen je u miševa koji su nokautirani za Satb2 zbog poremećaja u diferencijaciji neurona 5 sloja korteksa (11).

#### **1.4. Mogućnosti pretkliničkih analiza mišjeg mozga**

Široko korištena metoda bojanja za proučavanje morfologije i patologije neurona i za razumijevanje citoarhitekture različitih dijelova mozga je bojanje po Nisslu. Metoda bojanja po Nisslu se temelji na interakciji bazičnih boja poput krezil ljubičaste, tionina, toluidinskog modrila, metilenskog modrila ili anilina s nukleinskim kiselinama stanice. Boje se vežu na DNA stanične jezgre, na RNA koja je visoko koncentrirana na ribosomima hrapavog endoplazmatskog retikuluma i ribosomima u citoplazmi. Pošto neuroni aktivno proizvode proteine, citoplazme im sadrže velike koncentracije hrapavog endoplazmatskog retikuluma. Zbog takvog obilježja, bojanje po Nisslu boja citoplazmu bez prikaza ostalih staničnih elemenata. Bojanje po Nisslu se često koristi nakon imunocitokemijske detekcije specifičnih molekula u mozgu, da bi se lokalizirale i zabilježile označene stanične populacije (15).

Imunohistokemija (IHC) je metoda koja koristi protutijela na ciljne antigene u određenim tkivima i stanicama da bi odredila tip stanice i organ podrijetla. Metoda se provodi na tkivima fiksiranim formalinom i uklopljenim u parafin. Koraci u provedbi imunohistokemije su sljedeći: razotkrivanje antigena, dodatak primarnog protutijela, dodatak sekundarnog protutijela koje se veže na primarno protutijelo, dodatak detekcijskog reagensa kojim se lokalizira primarno protutijelo. Prvi korak, razotkrivanje antigena, uključuje obradu tkiva kako bi se vratili antigeni koji su bili maskirani fiksacijom, da bi bili dostupni vezanju s primarnim protutijelom. Postoji više metoda razotkrivanja antigena te one najčešće uključuju kidanje veza između proteina nastalih fiksacijom, kemijskim ili fizikalnim sredstvima. Fizikalna obrada uključuje toplinu i ultrazvuk, dok kemijska obrada uključuje enzimsku razgradnju i denaturaciju. Trenutno najpopularnija metoda je toplinom inducirano razotkrivanje antigena, koristeći



mikrovalne pećnice, autoklave te vodene kupke. Općenito, monoklonalna protutijela, koja se vežu na jedan epitop su specifičnija, dok su poliklonalna protutijela, koja se vežu na više epitopa, osjetljivija. Kako bi se interakcija između protutijela i antigena mogla vidjeti pod svjetlosnim mikroskopom, primarno ili sekundarno protutijelo mora biti označeno. U direktnoj imunohistokemiji primarno protutijelo je označeno i nanoseno na rez tkiva. U indirektnoj imunohistokemiji sekundarno protutijelo je označeno i može se koristiti s više različitih primarnih protutijela. Protutijela se mogu označiti na više načina: fluorescentnim molekulama ili enzimima koju proizvode obojani produkt. Imunofluorescentne metode, koje koriste fluorescentne spojeve, za vizualizaciju trebaju fluorescentni mikroskop (16).

Magnetna rezonancija je neinvazivna slikovna metoda koja se koristi za prikazivanje poprečnih presjeka tijela. Za dobivanje slike koristi se neionizirajuće elektromagnetsko zračenje te zbog toga nema opasnosti od ozljede zračenjem (17). Zbog iznimno dobrog prikaza mekih tkiva dolazi do ranije i preciznije dijagnoze bolesti. Značajan nedostatak predstavlja velika cijena ovih postupaka (18). U prikazu slike mogu se koristiti posebni moduli, kako bi se prikazale određene strukture organa (lezije, bijela moždana tvar, arterije). Danas se magnetna rezonanca široko koristi u područjima neurologije, psihijatrije, kardiologije, muskuloskeletnog sustava, krvožilnog sustava, za prikaz abdomena, itd. (17). Za prikaz struktura se obično koriste atomi vodika zbog njegove velike količine u tkivima. Signal se prvenstveno dobiva iz vode i masti, dok je signal iz drugih spojeva koji sadrže vodik zanemariv (mala koncentracija i smanjena pokretljivost vodika). Rekonstrukcija slike traži identifikaciju signala iz svake točke unutar tkiva koji se onda mapiraju (17).

## **2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA**

Hipoteza ovog istraživanja bila je sljedeća: Cijeljenje moždanog tkiva nakon ishemijskog moždanog udara uključuje oporavak reaktivacijom biljega kortikogeneze. Cilj istraživanja bio je analizirati i povezati promjene u mozgu nakon ishemijske lezije mozga miša i biljege kortikogeneze (Ctip2 i Satb2). Pritom smo se koristili snimkama magnetne rezonancije, preparatima bojanim po Nisslu te imunohistokemijom. Cilj analize snimki magnetne rezonancije bila je izračunati volumen moždanih polutki i područja ishemijske leziju u svakoj vremenskoj točki mjerenja postupkom ocrtavanja dijelova mozga na snimkama frontalnih presjeka te pokazati kako se tijekom tog vremena volumeni mijenjaju. Histološki preparati bojani prema Nisslu služili su validaciji mjerenja magnetnom rezonancijom. Cilj analize rezultata imunohistokemije bio je zabilježiti i odrediti broj signala čimbenika kortikogeneze Satb2 i Ctip2 u zahvaćenom području kako bismo potvrdili našu hipotezu.

## **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. Etička dopusnica**

Istraživanje na životinjama provedeno je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatski institut za istraživanje mozga, u Nastambi za pokusne životinje (HRPOK-006 MP UVSH) u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (NN 102/17, 32/19), Izmjenama i dopunama Zakona o zaštiti životinja (NN 37/13) i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13) te sukladno etičkim standardima za provedbu istraživanja u nastambi za laboratorijske životinje Hrvatskog instituta za istraživanje mozga (HR-POK-006). Istraživanje je provedeno u okviru projekta RepairStroke, a prilaže

se etička dopusnica izdana 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.).

### **3.2. Dizajn studije**

Istraživanje je provedeno u Laboratoriju za regenerativnu neuroznanost Hrvatskog instituta za istraživanje mozga. U pokus je bilo uključeno 13 miševa koji su bili raspodijeljeni u dvije grupe (MCAO i *Sham*). Cijeli je pokus trajao 3 mjeseca. Pokus je bilo podijeljen u dvije faze. U prvoj fazi koja je trajala 10 dana eksperimenti su rađeni *in vivo* na živim miševima. U toj fazi napravljen je MCAO te su miševi longitudinalno snimani magnetnom rezonancijom u trima vremenskim točkama. Nakon toga uslijedila je druga faza pokusa. Poslije izolacije mišjih mozгова provedeni su *in vitro* eksperimenti u vidu bojanja preparata metodom prema Nisslu i imunohistokemije. Važno je navesti da mi kao studenti nemamo licencu za rad na eksperimentalnim životinjama. Prema tome mi nismo vlastoručno sudjelovali u izvođenju samog pokusa nad životinjama, kao ni u postupcima snimanja magnetnom rezonancijom, izolacije mozgov a i bojanju preparata prema Nisslu te izvođenju imunohistokemije, već su to umjesto nas obavili zaposlenici Laboratorija za regenerativnu neuroznanost Hrvatskog instituta za istraživanje mozga. Materijale koje su oni pripremili prosljeđivala nam je naša komentorka Sanja Srakočić, mag. biol. mol., koja nas je detaljno upoznala sa svim postupcima koji su vršeni nad miševima uključenima u eksperiment te sa svim protokolima analize rezultata. Tijekom te edukacije stekli smo znanja potrebna za volumetrijsku analizu mozgov a miševa pomoću snimaka magnetne rezonancije i preparata bojanih prema Nisslu te znanja potrebna za kvantifikaciju snimaka imunohistokemije. Dobivene snimke magnetne rezonancije, preparate bojene prema Nisslu i snimke imunohistokemije potom smo manualno obradili na računalu pomoću programa *ImageJ*, besplatnog programa koji se može primijeniti u analizi raznovrsnih slikovnih podataka, kako će biti prikazano u daljnjem tijeku teksta.

### **3.3. Eksperimentalne životinje i izazivanje ishemijskog oštećenja mozga**

U istraživanju je korišteno 13 muških transgeničnih miševa NFH linije, starosti između 3 i 4 mjeseca. Miševi NFH linije ekspresiraju enzim luciferazu i TURBOFP635 što bi za posljedicu trebalo imati bioluminiscenciju i fluorescenciju u zrelih neuronima. Miševi su nasumično podijeljeni u dvije skupine, MCAO (n=7) i *Sham* (n=6).

Svim je miševima iz MCAO skupine izvedena okluzija srednje cerebralne arterije (MCAO, *middle cerebral artery occlusion*) pristupom na zajedničku karotidnu arteriju koristeći kirurški mikrofilament debljine 6-0. Okluzija je trajala 60 minuta nakon čega se filament izvadio i uslijedila je perfuzija. Tijekom zahvata miševi su bili anestezirani 2% izofluranom u 100% kisiku. Tjelesna je temperatura bila održavana na 37°C. Poslije operacije miševi su boravili 3 dana u grijanom kavezu i intraperitonealnom injekcijom dobivali su analgeziju i glukozu, dok im je hrana bila dostupna *ad libitum*.

*Sham* skupina miševa je bila izložena anesteziji, ulasku i izlasku mikrofilamenta. Okluzije nije bilo.

Miševi su prije zahvata, treći i sedmi ispitani na neurološki deficit. Pritom je praćena tjelesna masa miševa, izgled dlake, oka, uški, položaja tijela, mobilnost i spontana aktivnost, smetnje u kretanju, polaganje šapa te senzorni podražaji i refleksi. Ako bi životinja između dviju vremenskih točaka izgubila

više od 20% tjelesne mase ili izgubila mišićni tonus te ne bude odgovarala na podražaje, životinja se trebala bezbolno žrtvovati.

### 3.4. Snimanje magnetne rezonancije i obrada snimki

U svim trima vremenskim točkama, prije MCAO te 3. i 7. dan nakon MCAO, mišji mozgovi snimani su putem magnetne rezonancije. U tu je svrhu korišten uređaj Bruker BioSpec 70/20 USR jakosti 7T. Mišji mozgovi snimani su u projekcijama T2W i T2MAP. Za svaku vremensku točku snimke u T2W i T2MAP sekvencama spremljene su obliku dijaprojeksija pri čemu je svaka sadržavala 25 snimki. Tijekom snimanja miš je bio uspavan inhalacijskim anestetikom izofluranom (1.5-2% izoflurana u mješavini 70% N<sub>2</sub>O i 30% O<sub>2</sub>) čija se doza prilagođavala ovisno o frekvenciji disanja i tjelesnoj temperaturi miša. Stoga se postolje u MR-u grijalo kako bi se održavala stalna tjelesna temperatura miša.

Snimke dobivene putem magnetne rezonancije obrađene su pomoću programa *ImageJ*. T2W sekvence magnetne rezonancije korištene su za ocrtavanje moždanih hemisfera, a T2MAP sekvence magnetne rezonancije korištene su za ocrtavanje područja ishemije, tj. infarkta. Slike smo unijeli u *ImageJ* tako što smo u alatnoj traci odabrali opciju *File* kojom se otvara padajući izbornik i odabrali smo opciju *Open*. Potražili smo ciljani dijapozitiv MR snimaka na računalu i unijeli ih u program u *NIFTY-1 (NII)* formatu. Nakon unošenja u program slike su bile obrađene na sljedeći način. Prvi korak ovog procesa bila je *Data Preparation*. U padajućem izborniku pod opcijom alatne trake *Edit* potražili smo opciju *Options*, nakon koje se otvorio izbornik gdje smo zatim odabrali *Appearance* i odabrali smo samo jedanput za svaku pojedinu dijaprojeksiju komandu *Interpolate zoomed image* kojom se smanjuje pikselizacija slike tijekom zumiranja. Dodatno za T2MAP trebalo je donji *slider* pomaknuti na sredinu, pod padajućim izbornikom *Image* odabrati *Hyperstacks* i iz njega odabrati naredbu *Reduce dimensionality* kako bi nam ostale samo snimke intenziteta signala T2 mape. Značajke samih slika modificirali smo tako što smo pod funkcijom *Image* potražili opciju *Adjust* i odabrali komandu *Brightness/Contrast* kojom se namještaju svjetlina i kontrast kako bi prikaz slike bio jasniji. Nadalje, zadali smo postavke za analizu samih slika. Iz alatne trake odabrali smo opciju *Analyze* nakon čega smo u padajućem izborniku pod opcijom *Set Scale* postavljali vrijednosti za više varijabli. Za varijablu razmak u pikselima (*Distance in Pixels*) izabrali smo 1, a za mjernu jedinicu milimetre. Za varijablu *Known Distance*, koja odgovara dimenziji vokselu, odabrali smo 0,100 za T2W sekvence i 0,125 za T2MAP sekvence. Za varijablu *Pixel Aspect Ratio*, koja predstavlja omjer širine i dužine piksela, odabrana je vrijednost 1. Nadalje, pod istim izbornikom *Analyze* odabrali smo funkciju *Set measurements* gdje smo odabrali varijable koje su nakon ocrtavanja trebale biti izračunate. Odabrana je varijabla *Area* koja predstavlja površinu ocrtane hemisfere, tj. područja ishemije.

Nakon ovih postavki, slijedio je proces ocrtavanja. Ocrtane su prvo infarktu ipsilaterne hemisfere, potom kontralaterne hemisfere, a nakon toga samo područje infarkta. Na dijaprojeksijama T2W sekvenci bilo je prikazano 25 frontalnih presjeka mozga miševa od rostralno prema kaudalno. Hemisfere su ocrtane počevši od 5. presjeka u nizu, a završno s 20. presjekom u nizu. Analizirali smo isključivo te presjeke jer se samo na njima nalazi veliki mozak jer se s obzirom na dizajn studije očekivalo da će se područje infarkta naći samo u velikom mozgu. Infarkt se ocrta na onim snimkama T2MAP sekvence na kojima se nalazi. Nakon ocrtavanja svakog pojedinog područja svake snimke,

uključili smo *Fit spline* pomoću prečaca na tipkovnici, slova Q. Ovom se naredbom inače kubične linije koje ocrtavaju područje interesa zaglade i one postaju krivulje koje bolje ocrtavaju područje interesa. Svako ocrtavanje sprema se u ROI (*Regions of interest*). Nakon što su sva područja ocrtavanja spremljena na ROI, ona tvore *ROI Set* koji se sprema u obliku zip-a.

Podatci dobiveni ocrtavanjem potom su izračunati putem podprocedure u *ImageJ* koja se naziva *ROI Manager*. Taj se alat koristi za rad s više odabranih područja na istoj slici ili s odabranim područjem/područjima s različitih presjeka iz skupa. Koristili smo opciju *Measure* kojom smo izračunali površinu ocrtanih regija. Dobivene rezultate sistematizirali smo tako što smo na alatnoj traci prozora tražili *Results* nakon čega smo iz padajućeg izbornika birali naredbu *Summarize*, tj. sažimanje. Tako prikazane rezultate spremili smo na računalo u obliku .csv. Ovako dobiveni rezultati potom su ubačeni u Microsoft Office Excel program u kojem su za svakog pojedinog miša analizirane promjene volumena pojedinih hemisfera, odnosno infarkta tijekom vremena. Prilikom importa kao delimitatore odabrali smo TAB+comma, kao *decimal separator* kojim se cijeli brojevi odvajaju od decimala odabrali smo decimalnu točku, a kao *thousand separator* kojim se tisućice odvajaju od stotica odabrali smo *blank*, tj. prazno polje. Kako bismo izračunali volumen iz površina za područja od interesa, bila je potrebna treća dimenziju, debljina prereza, koja iznosi 0,5 mm. Debljina prereza određena je debljinom vokselu (0,1 mm) i razmakom između vokselu (0,4 mm).

Također smo za svaku pojedinu ocrtanu hemisferu i ocrtano područje infarkta napravili montažu koristeći se programom *ImageJ*. Iz alatne trake izabrali smo opciju *Image* pri čemu se otvara padajući izbornik u kojem smo birali opciju *Overlay*, odnosno preklapanje, koja otvara novi padajući izbornik iz kojem smo upotrijebili opciju *From Roi Manager* kojom smo odredili da se koriste podatci iz *ROI Managera* za dani slijed slika. Nakon toga smo iz padajućeg izbornika *Overlay* upotrijebili opciju *Flatten* kojim se svaki ROI fiksira na pripadajući presjek. Zadnji korak prije formiranja montaže je odabir opcije *Stacks* iz padajućeg izbornika opcije *Image*. Opcijom *Stacks* otvorio se novi padajući izbornik u kojem smo birali opciju *Make Montage* kojom smo potom namjestili postavke montaže. Za *Scaling factor* uzeli smo broj 1,5 te smo odabrali opciju *Label slices* kojom su frontalni presjeci naznačeni na montaži brojevima od 1 do 25.

Nakon obrade podataka za svakog pojedinog miša, izračunali smo prosječne vrijednosti volumena te vrijednosti standardne devijacije, intervala pouzdanosti, a gdje je su rezultati u skupini bili varijabilni i gdje je broj jedinki bio veći izračunali smo medijan i modul.

### **3.5. Izolacija i priprema mozгова za histološke metode bojanja**

Sedam dana nakon operacije miševi su bezbolno žrtvovani intraparietonealnom injekcijom letalne doze Avertina. Zatim je još napravljen pneumotoraks kako bi se omogućio pristup srcu. Miševi su transkardijalno perfundirani najprije s PBS-om, a zatim s 4% PFA (20 mL svake otopine). Mozgovu su izolirani i stavljeni u otopinu 4% PFA. Zatim su mozgovu prebačeni u gradijent saharoze tako da su stavljeni najprije u 10% otopinu saharoze na 24 h, nakon toga su premješteni u 20% otopinu saharoze (isto na 24h) i na kraju u 30% otopinu saharoze u PBS-u. Nakon toga su uklopljeni u krioprezervacijski medij TissueTek i zamrznuti na -20°C. Koronarni presjeci mišjeg mozga su narezani pomoću *cryocuta*, a debljina reza je iznosila 16 µm.

### 3.6. Imunohistokemija

U izradi imunohistokemijskih preparata, preparati su prvo 2 sata stajali na sobnoj temperaturi, zatim se razotkrivanje antigena napravilo nanošenjem limunske kiseline, slijedila je DNA denaturacija s klorovodičnom kiselinom (HCl). Blokiranje se postiglo nanošenjem 4% kozjeg seruma i 0.25% tritona u PBS-u (fosfatni pufer), inkubiralo se 1 sat. Naneseno je primarno protutijelo (*Tablica 1.*) razrijeđeno u 2% kozjem serumu i 0.25% tritonu u fosfatnoj puferskoj slini te se ispralo, zatim se proces ponavljao s pripadajućim sekundarnim protutijelom (AlexaFluor, razrijeđenje 1:500). Post fiksacijski preparati su se inkubirali u 4% PFA na sobnoj temperaturi 1 sat, zatim su se isprali s fosfatnom puferskom slinom, pa s vodom te se naneo Dako fluorescentni medij i preparati su se skladištili na sobnoj temperaturi 24 sata, pa su se nakon toga premjestili na -20°C. Za fluorescentnu mikroskopiju filteri su se namjestili na 44 FITC special, (E) EX BP 475/40, BS FT 500, EM BP 530/50, 50 Cy 5 (E) EX BP 640/30, BS FT 660, EM BP 690/50, 45 HQ TexasRed, (E) EX BP 560/40, BS FT 585, EM BP 630/75. Za konfokalnu mikroskopiju koristio se Olympus FV300, povećanje 20x, rezolucija 1024x1024. Promatralo se se boje: AlexaFluor 488: EM BP 500-540 nm, AlexaFluor 546: EM BP 570-620 nm, AlexaFluor 647: EM BP 650-710 nm.

*Tablica 1: Popis primarnih protutijela koja se koriste u imunohistokemiji*

Protutijelo	Domaćin	Razrjeđenje	Tip	Proizvođač
BCL11B	štakor	1:250	Primarno	Abcam
SATB2	zec	1:200	Primarno	Abcam
ATF3	zec	1:200	Primarno	Sigma
HDAC2	zec	1:250	Primarno	Abcam

### 3.7. Obrada rezultata imunohistokemije

Snimke rezultata imunohistokemije analizirali smo manualno. Nakon što smo dobili snimke imunohistokemije točno određenih regija mozga, korteksa i striatuma, bojanih za Ctip2 i Satb2, signale za svaki marker u pojedinoj regiji smo manualno izbrojili i unijeli u tablice.

### 3.8. Obrada snimki preparati bojanih po Nisslu

Snimke preparata bojanih prema Nisslu obradili su se zapravo jednakim načinom kao što su obrađene MRI snimke pomoću programa *ImageJ* i obradom u Excelu, ali s nekoliko razlika. MRI snimke posložile su se u seriji snimaka koje dijapozitivno idu jedna iza druge od prednjeg do stražnjeg dijela mozga, a snimke preparata bojanih po Nisslu bili su rezovi mozga poredani po redu u dva stupca na jednoj pozadini. Debljina rezova je bila 0,25 mm. MRI prerezi pravilno su ocrtavali konture mozga živih životinja, dok su preparati bojani po Nisslu nerijetko sadržavali defekte.

### 3.9. Statistička obrada rezultata

Statistička obrada rezultata imunohistokemije je napravljena u programu Microsoft Excel korištenjem dodatka *Analysis Tool Pak*. Razlika između eksperimentalnih skupina (MCAO i *Sham*) je određena pomoću Studentovog t-testa za neponovljena mjerenja. Razlika je smatrana statistički značajnom ukoliko je *P* vrijednost bila manja od 0,05.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Validacija ishemijskog oštećenja mišjeg mozga

#### 4.1.1. Rezultati obrade MRI snimaka

U priloženim tablicama nalaze se podatci o prosječnim vrijednostima volumena hemisfera mišjih mozgova i ishemijske lezije u trima vremenskim točkama za MCAO skupinu miševa te o vrijednostima volumena hemisfera mišjih mozgova koji pripadaju *Sham* skupini miševa.

Tablica 2: Prosječne vrijednosti volumena hemisfera i ishemijske lezije za MCAO skupinu (mm<sup>3</sup>)

Vremenska točka	Ipsilateralno	Kontralateralno	Ishemijska lezija
Prije MCAO	156,49	155,91	0
D03	162,12	152,44	40,65
D07	152,83	155,43	31,94

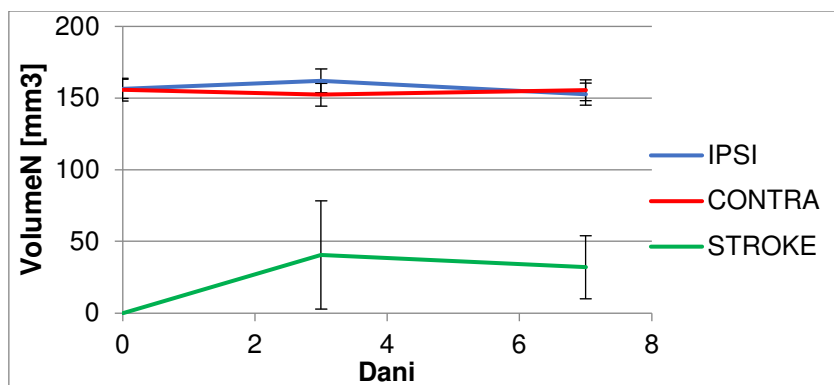
Uz 95% vjerojatnost, u uzorku MCAO skupine miševa koja obuhvaća 8 jedinki, vrijednosti volumena ipsilateralne moždane hemisfere nultni dan iznosile su 156,489 (SD = 6,64), treći dan 162,12 (SD = 8,24), a sedmi dan 152,83 (SD = 7,73). Uz iste uvjete, vrijednosti volumena kontralateralne moždane hemisfere nultni dan iznosile su 155,91 (SD = 7,97), treći dan 152,44 (SD = 7,97), a sedmi dan 155,43 (SD = 7,27), dok vrijednosti volumena ishemijske lezije iznosile su treći dan 40,65 (SD = 37,77), a sedmi dan 31,94 (SD = 22,03). Iz rezultata za ishemijsku leziju vidljivo je da je uzorak bio poprilično varijabilan. Stoga uz njih prilažemo i dodatke statističke podatke: Za treći dan najmanja vrijednost iznosila je 1,26 mm<sup>3</sup>, a najviša 93,9 mm<sup>3</sup>, medijan vrijednosti iznosio je 32,36, moduli ne postoje jer se svaka vrijednost pojavljivala samo jednom pa nije bilo nikakve specifične modalne raspodjele. Sedmi dan najmanja vrijednost iznosila je 2,73 mm<sup>3</sup>, a najviša 63,86 mm<sup>3</sup>, medijan vrijednosti iznosio je 36,4, modula nije bilo jer se svaka vrijednost pojavljivala samo jednom pa nije bilo nikakve specifične modalne raspodjele.

Tablica 3: Prosječne vrijednosti volumena hemisfera i ishemijske lezije za Sham skupinu (mm<sup>3</sup>)

Vremenska točka	Ipsilateralno	Kontralateralno
Prije MCAO	152,29	155,21
D03	151,3975	152,61
D07	152,91	154,31

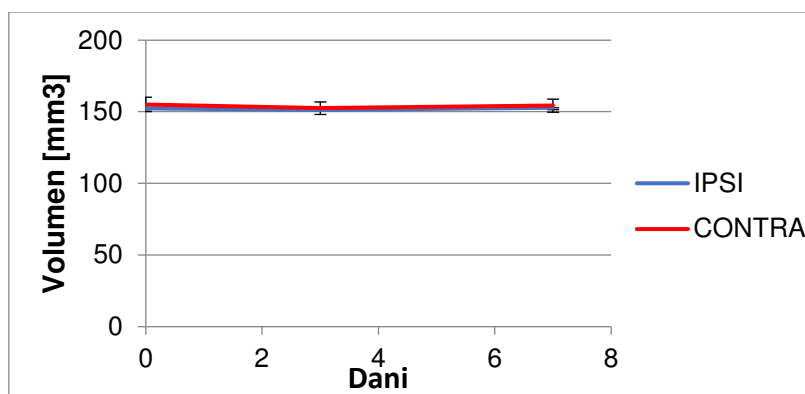
Uz 95% vjerojatnost, u uzorku *Sham* skupine miševa koja obuhvaća 5 jedinki, vrijednosti volumena ipsilateralne moždane hemisfere nultni dan iznosile su 152,29 ± 4,46 (SD = 5,09), treći dan 151,3975 ± 4,24 (SD = 4,33), a sedmi dan 152,91 ± 2,599 (SD = 2,97). Uz iste uvjete, vrijednosti volumena kontralateralne moždane hemisfere nultni dan iznosile su 155,21 ± 4,398 (SD = 5,02), treći dan 152,61 ± 3,86 (SD = 4,41), a sedmi dan 154,31 ± 4,06 (SD = 4,64).

Priloženi slike prikazuje promjenu volumena mišjih mozgova tijekom vremena mjerenu u trima vremenskim točkama.



Slika 1. Promjene prosječnih vrijednosti volumena hemisfera i ishemijske lezije za MCAO skupinu miševa

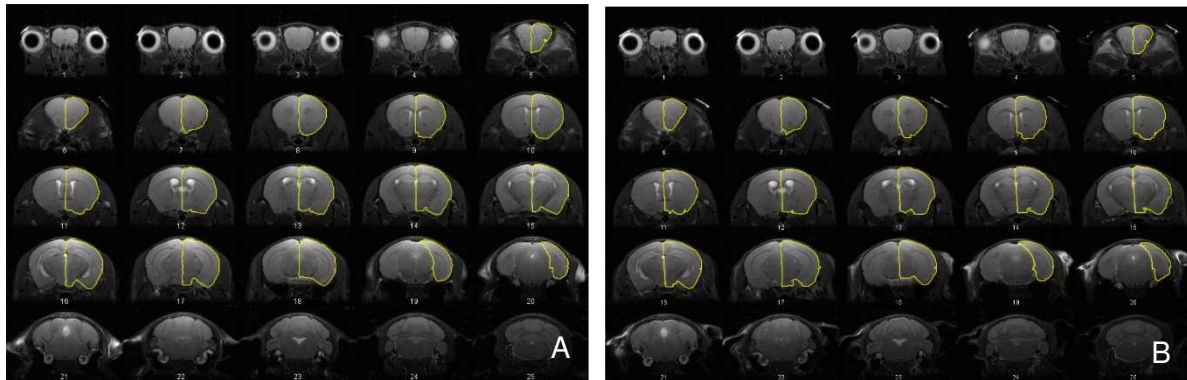
Na temelju kretanja krivulja vidljivo je da se veličina ishemijske lezije mijenjala u MCAO skupini tako što je 3. dan od operacije bila najveća, tj. imala je najveći volumen, dok se 7. dana njena veličina smanjila. Također je vidljivo da se volumen ipsilateralne moždane hemisfere povećavao do 3. dana da bi se prema 7. dana ponovno smanjio. Dakle, porast i smanjenje volumena polutke u kojoj se nalazi ishemijska lezija pratili su dinamiku promjene volumena same lezije.



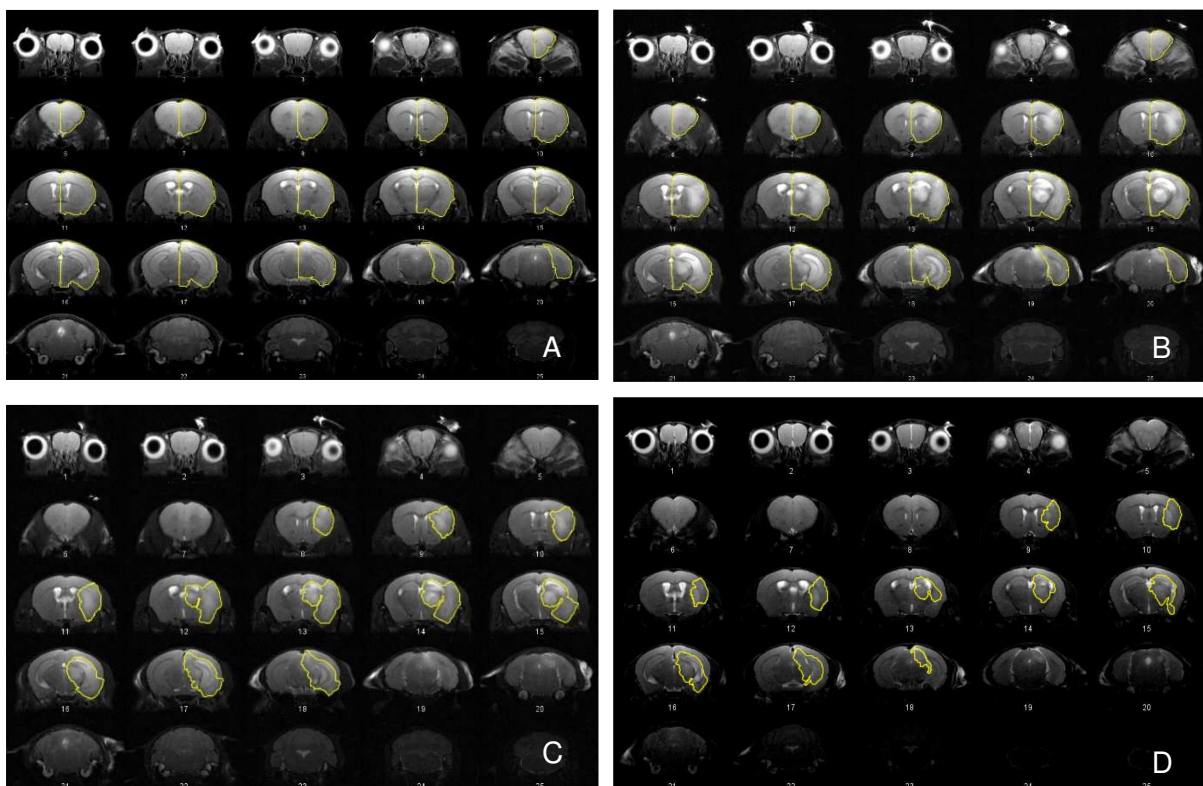
Slika 2. Promjene prosječnih vrijednosti volumena hemisfera za Sham skupinu miševa

Iz slike 2. je jasno vidljivo da su se prosječne vrijednosti volumena objiju moždanih polutki miševa koji pripadaju Sham skupini svega neznatno mijenjale tijekom vremena i da nije bilo pretjerane razlike između prosječnih volumena polutki. Stoga možemo zaključiti da u Sham miševa, dakle, bez ishemijske lezija, volumeni moždanih polutki nisu pratili dinamiku promjene volumena kakvu je pokazala MCAO skupina miševa.

Slijede prikazi montaža ocrtanih ciljnih moždanih regija u T2W sekvencijama MRI snimaka mozгова miševa iz MCAO skupine i Sham skupine. Za opis serija slika pogledati objašnjenje ispod slika.



Slika 3. Montaža MRI snimaka Sham miševa tijekom vremena. Redom, to su: A) ipsilateralna polutka prije Sham operacija, B) ipsilateralna polutka 3. dan nakon Sham operacije



Slika 4. Montaža MRI snimaka MCAO miševa tijekom vremena. Redom, to su: A) ipsilateralna polutka prije operacije, B) ipsilateralna polutka 3. dan poslije operacije; C) moždani udar 3. dan poslije operacije; D) moždani udar 7. dan poslije operacije

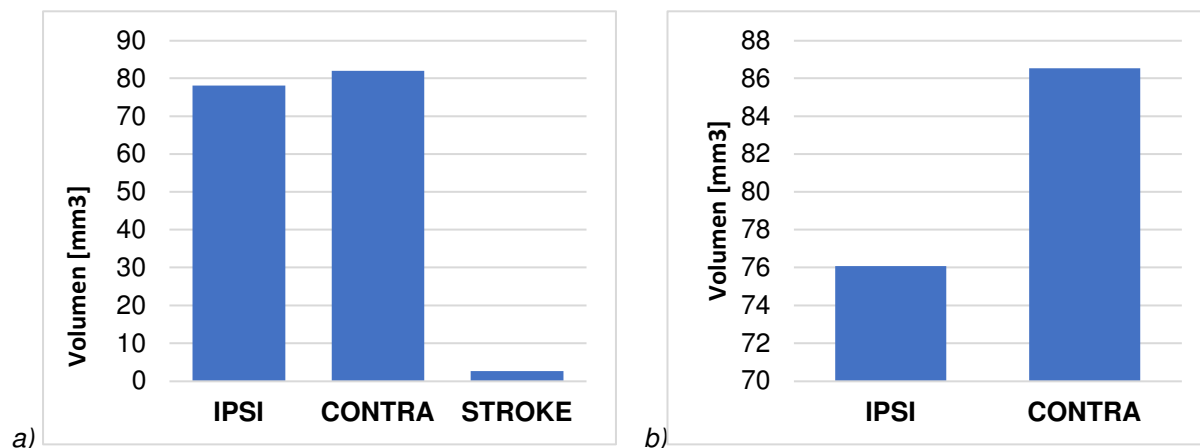
#### 4.1.2. Rezultati obrade preparata bojanih po Nisslu

Kod MCAO skupine miševa na preparatima bojanima po Nisslu prosječni volumen ipsilateralne možda polutke iznosio je  $78,05 \text{ mm}^3$  (SD = 8,62), volumen kontralateralne moždane polutke iznosio je  $81,97 \text{ mm}^3$  (SD = 6,65), a volumen ishemijske lezije iznosio je  $2,67 \text{ mm}^3$ . (Ishemijska lezija bila je vidljiva samo na mozgu jednog miša kojeg smo promatrali na preparatima bojanima po Nisslu.)

Iz priloženih se rezultata vidljivo je da su promatrani volumeni preparata mozgovog bojanja prema Nisslu bili manji u odnosu na volumene mozgovog dobivene snimanje pomoću MRI. Za iste



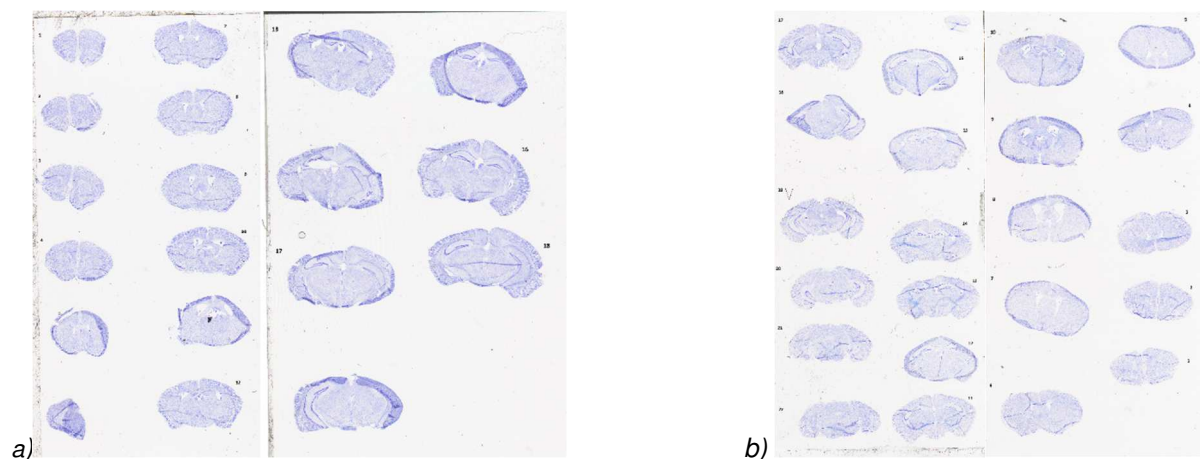
miševe iz MCAO skupinu čiji su se mozgovi služili za izradu preparata prema Nisslu prosječni volumen 7. dana poslije infarkta dobiven obradom podataka s MRI snimaka iznosio je za ipsilateralnu moždanu polutku 155,15 mm<sup>3</sup> (SD = 11,91) za kontralateralnu moždanu polutku 159,65 (SD = 8,41) mm<sup>3</sup>, a za ishemijsku leziju 20.59 mm<sup>3</sup> (SD = 23,87). Razlog tomu je to što prilikom pripreme preparata za bojanje prema Nisslu dolazi do skraćivanja mozgovia i samim time se volumen smanjuje.



Slika 5. Grafički prikaz usporedbe volumena mozgovia miševa dobivenih metodom bojanja prema Nisslu iz MCAO skupine (a) i Sham skupine (b) 7. dan poslije zahvata

Za Sham skupinu miševa volumen ipsilateralne polutke mozga 7. dan poslije infarkta iznosio je 76,07 mm<sup>3</sup>, a volumen kontralateralne polutke mozga iznosio je 86,52 mm<sup>3</sup>. Za usporedbu, za istog miša čiji se mozak koristio za pripremu preparata bojenih prema Nisslu na temelju MRI snimaka dobiveni volumen za ipsilateralnu moždanu hemsiferu iznosio je 156.93 mm<sup>3</sup>, a za kontralateralnu 154,604 mm<sup>3</sup>.

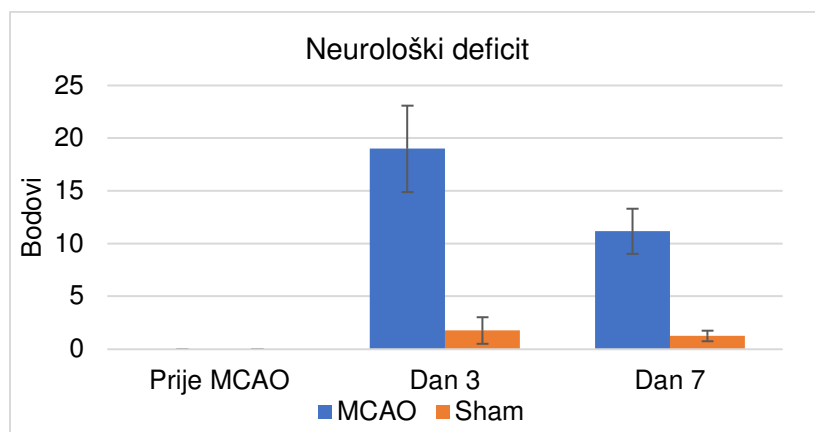
Sljedeća dva para slika prikazuju rezove mišjih mozgovia iz MCAO i Sham skupine bojenih prema Nisslu koji su korišteni u ovom istraživanju.



Slika 6. Prikaz preparata mišjih mozgovia iz MCAO skupine (a) i iz Sham skupine (b) bojenih Nisslovom metodom

### 4.1.3. Neurološki deficit

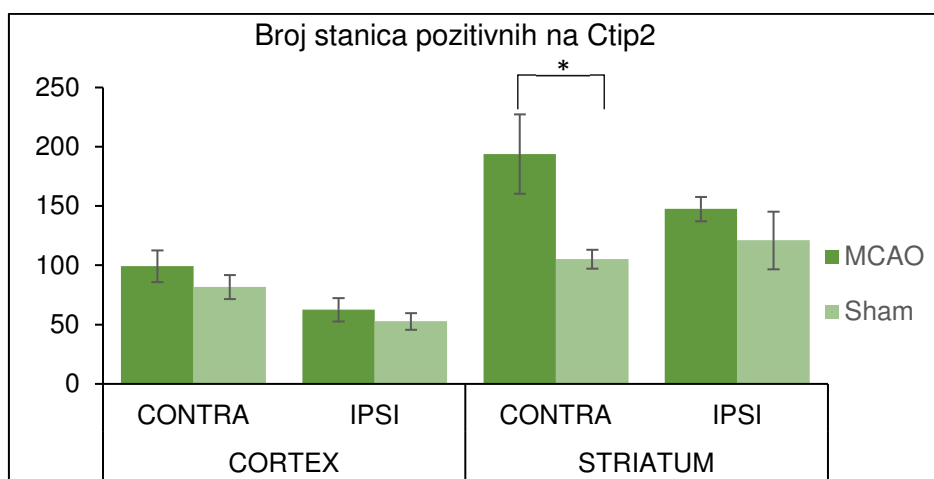
Pri bodovanju neurološkog deficita miševi MCAO skupine ostvarili su 3 dana poslije infarkta prosječan rezultat od 19 (SD = 3,74) bodova, dok je prosječan rezultat 7 dana poslije infarkta bio 11.17 (SD = 1,95). Miševi *Sham* skupine nakon 3. dana ostvarili su svega 1.75 (SD = 1,09) bodova, dok su 7. dan ostvarili 1.33 (SD = 0,43) bodova. (Tablica 4.) Iz ovakvog rezultata proizlazi da je neurološki deficit bio značajno veći u MCAO skupini miševa nego u *Sham* skupini u objema mjerenim vremenskim točkama.



Slika 7. Bodovanje neurološkog deficita u pojedinim vremenskim točkama za MCAO i Sham skupine miševa

### 4.2. Izražaj markera kortikogeneze nakon ishemijskog oštećenja mišjeg mozga

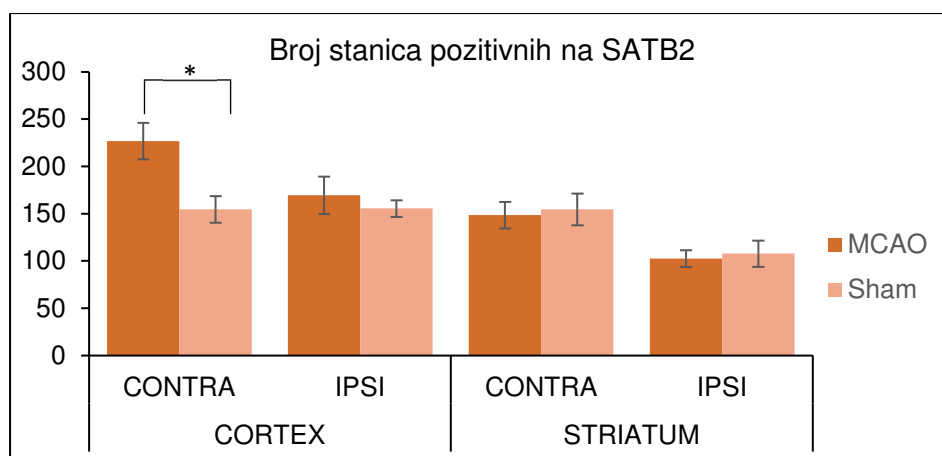
U priloženim tablicama i grafovima prikazan je izražaj markera kortikogeneze Ctip2 i Satb2 zasebno za *Sham* i MCAO skupine miševa za pojedine regije (korteks i striatum) i za hemisfere mozga.



Slika 8. Broj signala za markere Ctip2 za MCAO i Sham skupine miševa podijeljeni prema regijama mozga (cortex, striatum). Zvezdica (\*) predstavlja P-vrijednost i ona je manja od 0,05 ( $P < 0.05$ ). P vrijednosti za ovu sliku prikazane su u tablici 4.

Tablica 4. Rezultati statističke obrade podataka prikazanih na slici 8.

	CORTEX		STRIATUM	
	CONTRA	IPSI	CONTRA	IPSI
<b>P vrijednost</b>	0.4254	0.4705	0.0419	0.2815



Slika 9. Broj signala za markere *Satb2* za MCAO i Sham skupine miševa podijeljeni prema regijama mozga (cortex, striatum) u pojedinim hemisferama. Zvezdica (\*) predstavlja P-vrijednost i ona je manja od 0,05 ( $P < 0.05$ ). P vrijednosti za ovu sliku prikazane su u tablici 5.

Tablica 5. Rezultati statističke obrade podataka prikazanih na slici 9.

	CORTEX		STRIATUM	
	CONTRA	IPSI	CONTRA	IPSI
<b>P vrijednost</b>	0.0327	0.6182	0.4753	0.2432

Prosječan izražaj markera kortikogeneze *Ctip2* bio je veći i za MCAO i *Sham* skupine miševa u području striatuma nego u području korteksa. Što se tiče usporedbe izražaja *Ctip2* u korteksu, on je bio prosječno veći u MCAO skupini miševa za obje hemisfere. U objema skupinama miševa izražaj *Ctip2* prosječno je bio viši u korteksu kontralateralne moždane hemisfere nego u korteksu ipsilateralne hemisfere. Izražaj markera *Ctip2* u striatumu prosječno je bio viši za MCAO skupinu miševa. Pri tom je izražaj ovog markera u MCAO skupini miševa prosječno bio viši u striatumu kontralateralne hemisfere nego u striatumu ipsilateralne hemisfere, dok je u *Sham* skupini miševa izražaj bio prosječno viši u striatumu ipsilateralne nego kontralateralne hemisfere. (Slika 8.)

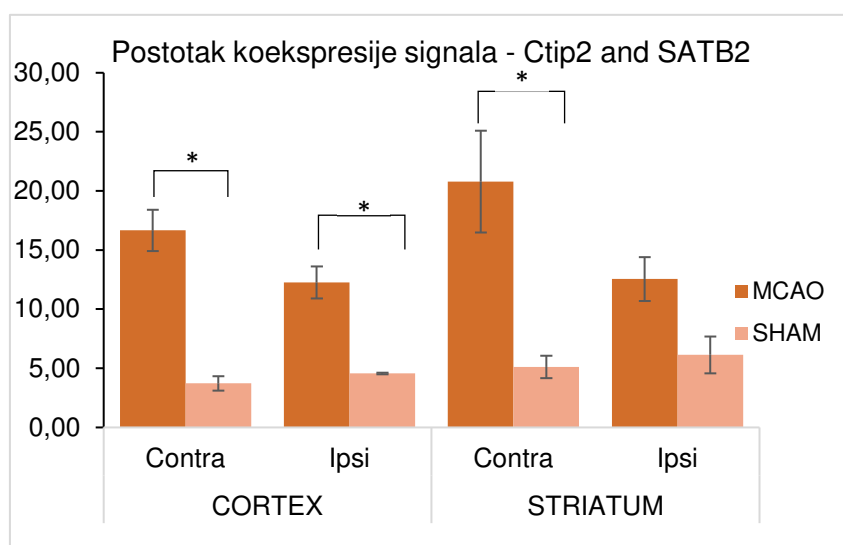
Prosječan izražaj markera kortikogeneze *Satb2* bio je veći i za MCAO i *Sham* skupine miševa u području korteksa nego u području striatuma. Što se tiče usporedbe izražaja *Satb2* u korteksu, on je prosječno bio veći u MCAO skupini miševa nego u *Sham* skupini za obje hemisfere. Pritom je prosječan izražaj *Satb2* u MCAO skupini bio puno viši u korteksu kontralateralne nego ipsilateralne hemisfere, dok

je za *Sham* skupini prosječan izražaj ovog signala bio otprilike jednak za kortekse objiju hemisfera. Također, izražaj *Satb2* u kontralateralnom korteksu miševa MCAO skupine bio je puno viši nego u istoj regiji kod miševa *Sham* skupine, dok je izražaj *Satb2* u korteksu ipsilateralne hemisfere bio tek nešto viši u MCAO skupini miševa. Izražaj markera *Satb2* u striatumu za obje skupine miševa bio je veći u kontralateralnoj hemisferi nego u ipsilateralnoj. Također, izražaj *Satb2* u striatumu bio je nešto viši u *Sham* skupini u objema hemisferama nego u MCAO skupini. (Slika 9.)

Rezultati koekspresije obaju markera (eng. *merged signals*) *Ctip2* i *Satb2* u pojedinim regijama i hemisferama objiju ispitivanih skupina miševa su sljedeći:

Tablica 6. Rezultati koekspresije *Ctip 2* i *Satb2* u pojedinim regijama mozga (korteks, striatum) zasebno u svakoj moždanoj hemisferi između miševa MCAO skupine i *Sham* skupine

		Prosječna vrijednost		Stand. dev.		SEM		P vrijednost
		MCAO	<i>Sham</i>	MCAO	<i>Sham</i>	MCAO	<i>Sham</i>	MCAO vs <i>Sham</i>
<b>Cortex</b>	<b>contra</b>	16.67	3.72	3.50	1.07	1.75	0.62	0.0005
	<b>ipsi</b>	12.28	4.56	3.30	0.11	1.35	0.06	0.0057
<b>Striatum</b>	<b>contra</b>	21.37	5.11	9.48	1.89	4.24	0.94	0.0156
	<b>ipsi</b>	12.52	6.13	3.77	2.70	1.88	1.56	0.0533



Slika 10. Usporedba postotaka koekspresije *Ctip 2* i *Satb2* u pojedinim regijama mozga (korteks, striatum) zasebno u svakoj moždanoj hemisferi između miševa MCAO skupine i *Sham* skupine. Zvezdica (\*) predstavlja *P*-vrijednost i ona je manja od 0,05 ( $P < 0.05$ ). *P* vrijednosti za ovu sliku prikazane su u tablici 6.

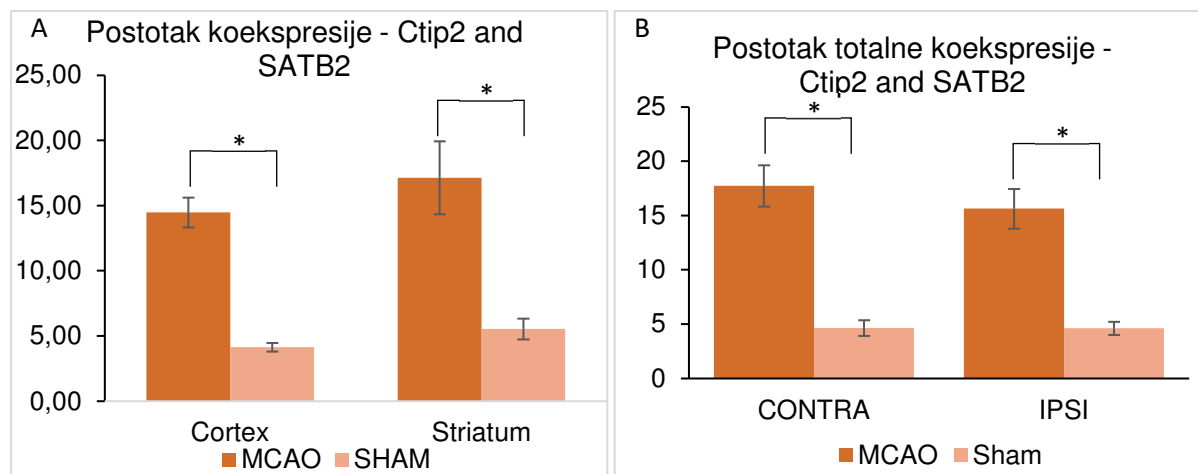
Kao što je vidljivo iz priloženog tabličnog i grafičkog prikaza, postotak integriranog (*merged*) signala bio je izrazito veći u MCAO skupini miševa nego u *Sham* skupini miševa i za korteks i za striatum objiju hemisfera. I u korteksu i u striatumu postotak ekspresije bio je veći za kontralateralnu nego za ipsilateralnu hemisferu kod miševa MCAO skupine. U MCAO skupini postotak ekspresije integriranih

signala u kontralateralnom striatumu bio je viši nego u kontralateralnom korteksu, dok se postotak ekspresije u korteksima ipsilateralne i kontralateralne hemisfere nije pretjerano razlikovao.

Postotak ekspresije integriranih signala također se mogu prikazati i općenito za korteks i striatum obje hemisfere za obje skupine miševa. Dobiveni su sljedeći rezultati:

Tablica 7. Rezultati koekspresije *Ctip2* i *Satb2* u pojedinim regijama mozga (korteks, striatum) između miševa MCAO skupine i Sham skupine

	Prosječna vrijednost		Stand. dev.		SEM		P vrijednost
	MCAO	Sham	MCAO	Sham	MCAO	Sham	MCAO vs Sham
<b>CORTEX</b>	14.48	4.14	3.97	0.82	1.15	0.33	0.0001
<b>STRIATUM</b>	17.43	5.55	8.48	2.12	2.83	0.80	0.0032



Slika 11. Usporedba postotaka koekspresije *Ctip2* i *Satb2* u pojedinim regijama mozga (A) i u pojedinim hemisferama mozga (B) između miševa MCAO skupine i Sham skupine. Zvezdica (\*) predstavlja P-vrijednost i ona je manja od 0,05 ( $P < 0.05$ ). P vrijednosti za ovu sliku prikazane su u tablici 7. za A) i u tablici 9. za B).

Iz ovih rezultata može se iščitati da je u ispitivanih miševa postotak ekspresije integriranih signala za obje ispitivane moždane regije bio puno viši u MCAO skupini nego u Sham skupini. Postotak ekspresije integriranih signala u MCAO skupini miševa bio je viši u striatumu nego u korteksu.

Rezultati postotka ekspresije mogu se prikazati za svaku moždanu polutku zasebno.

Tablica 8. Rezultati koekspresije *Ctip2* i *Satb2* između moždanih polutki MCAO i Sham skupine miševa

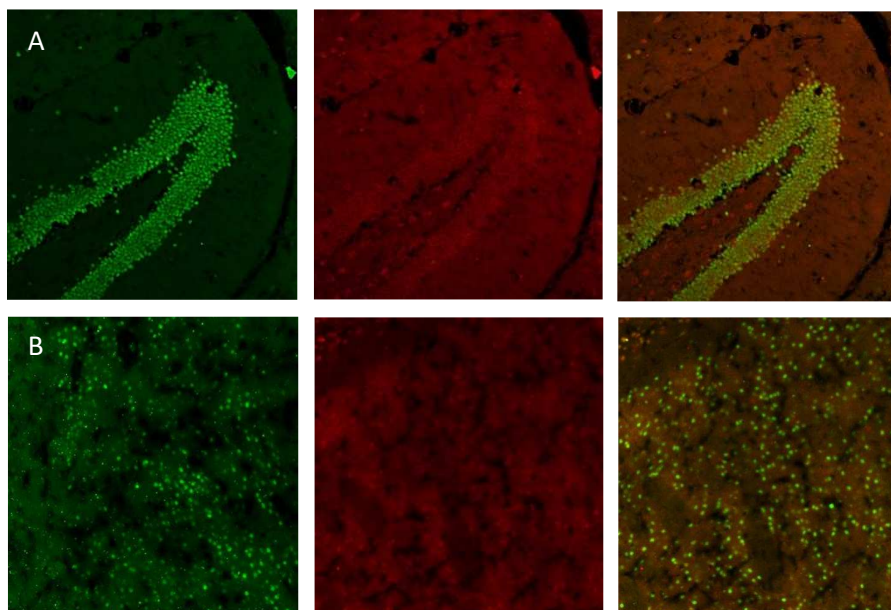
	AVERAGE		SEM	
	CONTRA	IPSI	CONTRA	IPSI
<b>MCAO</b>	17.74	15.63	1.90	1.84
<b>SHAM</b>	11.73	12.41	8.20	11.96

Tablica 9. Rezultati statističke obrade podataka tablice 8.

	CONTRA	IPSI
P vrijednost	0.0023	0.0168

U MCAO skupini postotak ekspresije integriranih signala bio je viši nego u *Sham* skupini miševa. Postotak ekspresije integriranih signala bio nešto viši u kontralateralnoj hemisferi kod MCAO skupine miševa. U *Sham* skupini postotci bili su otprilike jednaki, tek nešto viši u ipsilateralnoj hemisferi.

Na sljedećim su snimkama prikazani reprezentativni primjeri ispitivanih markera *Ctip2* i *Satb2* te njihova koekspresija u pojedinim regijama mozga.



Slika 12. *Ctip2* i *Satb2* markeri na spojenom, "merged" prikazu u a) hipokampusu i u b) striatumu

## 5. RASPRAVA

Tijekom obrade frontalnih presjeka mozгова na MRI snimkama susretali smo s određenim problemima. Zbog sive palete boja kao i ne uvijek najbolje rezolucije ocrtavanje vanjske površine polutki znao je biti izazov. Granice ishemijske lezije nisu uvijek bile potpuno jasno vidljive. Nismo uvijek bili sigurni koje dijelove moždanog tkiva u kaudalnim dijelovima presjeka treba uključiti u analizu. S većim smo se problemima susreli prilikom obrade preparata bojanih prema Nisslu zbog prisustva artefakata, nejasnih granica ishemijske lezije, kao i ponekad oštećenih rubova preparata. Nadalje, kod obrade snimaka imunohistokemije ponekad je bilo teško prepoznati signal, razlučiti je li riječ o dvama manjim signalima ili jednom velikom. Zbog toga su se naši pojedinačni rezultati za pojedine snimke imunohistokemije znali značajno razlikovati. Također, važno je napomenuti da je sam proces obrade rezultata dugotrajan, napose zbog nedostatka automatizirane metode analize što automatski dovodi do pristranosti. Pristranost smo nastojali smanjiti tako što su analizu vršila dva neovisna istraživača.

Rezultati obrade MRI snimaka očekivani su s obzirom na već prethodna znanja o patofiziološkim procesima i patološkim promjenama koje se zbivaju nakon ishemije mozga kod sisavaca. Porast i naknadno smanjenje volumena hemisfere ipsilateralne infarktu kod MCAO skupine očekivana je promjena uzevši u obzir nastanak edema uslijed ishemije te procese cijeljenja koji se zbivaju, a u koji su uključene upalne i glija stanice. (*Slika 1.*)

Ostalo je malo nejasno zašto je trebalo napraviti MCAO i bodovanje neurološkog deficita, a ne samo izmjeriti imunohistokemiju. Razlog tome je taj da bez tih parametra ne bismo mogli znati je li postojalo kako morfološko (MRI) tako i funkcionalno (bodovanje neurološkog deficita) oštećenje mozga, koje je postignuto specifično s MCAO, a kojeg nema u *Sham*. Nadalje, veći neurološki deficit u MCAO skupini odnosu na *Sham* skupinu miševa bio je za očekivati s obzirom da je u MCAO skupini izazvana ishemijska lezija. Rezultat da je neurološki deficit u MCAO skupini miševa veći 3. dan u odnosu na 7. dan (*Slika 7.*) također je očekivan, a može se prvenstveno objasniti smanjenjem edema mozga, ali moguće je i da tome doprinose mehanizmi kortikogeneze koji se zbivaju u području ishemije.

Nismo očekivali da će ekspresija svakog pojedinog ispitivanog markera biti viša u kontralateralnoj hemisferi nego u ipsilateralnoj hemisferi gdje se u stvari dogodila ishemijska lezija. (*Slika 11.b*) Iako smo smatrali da će ekspresija biti povećana u objema hemisferama, mislili smo da će ekspresija signala biti viša u onoj hemisferi u kojoj se dogodio infarkt jer je naša pretpostavka bila da će procesi kakve vidamo u neurogenezi biti izraženiji upravo u ipsilateralnoj hemisferi. Ipak, kao što se vidi iz rezultata na *Slici 11.a*), ekspresija ispitivanih markera bila je viša u striatumu što je za očekivati jer je ishemijska lezija bila najviše izražena upravo u ovoj regiji mozga. Također, s obzirom da miševi nokautirani za *Satb2* imaju povišenu ekspresiju *Ctip2* i da kod ektopične ekspresije *Satb2* dolazi do supresije ekspresije *Ctip2*, rezultat pri kojem je ekspresija pojedinog markera povišena u različitim hemisferama očekivan je ishod. No, takav rezultat ovdje izostaje. Moguće je da je oštećenje mozga bilo toliko opsežno da procesi regeneracije nisu mogli doći do izražaja, a što dodatno opravdava dobivene rezultate MRI volumetrije i neurološki deficit. Također, ljudi koji imaju opsežne moždane udare nerijetko umiru od posljedica ovog stanja pa se procesi regeneracije koji uključuju aktivaciju kortikogeneze niti ne pokrenu. S obzirom da osobe s manjim moždanim udarima imaju bolju prognozu po pitanju oporavka, bilo bi dobro provesti istraživanje u kojem bi se nad eksperimentalnim životinjama izveo pošteniji zahvat, poput distalnog MCAO, čime bi ishemijska lezija bila manja i samim time omogućila bolji oporavak ovih životinja. Ukoliko bi u takvim lezijama ekspresija biljega kortikogeneze bila veća, moguće je da bi oni predstavljali biomarker oporavka koji bi dijelio manje moždane udare s boljom prognozom za oporavak pacijenata od većih moždanih udara s lošijom prognozom za oporavak.

Pri analizi slika koje istodobno pokazuju *Ctip2* i *Satb2* signal, uočeno je da puno veći postotak stanica ima oba signala. Takav nalaz se uočava tijekom embriogeneze kada stanice prolaze kroz proces diferencijacije, a ne kod mozga odraslog miša u normalnim uvjetima. Smatramo da nakon ishemijske lezije dolazi do dediferencijacije određenih stanica koje zatim počinju ekspimirati *Ctip2* i *Satb2*. Moguće je da ovakvo zbivanje ima ulogu u oporavku mozga nakon ishemijske lezije.

Osnovna prednost ove studije doprinos je što boljem razumijevanju kako u procesima koji se odvijaju nakon ishemije moždanog tkiva također sudjeluju mehanizmi regeneracije putem procesa kortikogeneze koji se inače zbivaju tijekom razvoja mozga. Naime, dosadašnji radovi vezani uz proteine

koji sudjeluju u procesu kortikogeneze Ctip2 i Satb2, a koji su ujedno i markeri ispitivani u ovoj studiji, bavili su se prvenstveno njihovom ulogom u embrionalnom razvoju mozgu. Osim njihove uloge u neurogenezi, ispitivana je i opisivana njihova uloga u koži, imunološkom sustavu, malignim bolestima, razvoju i poremećajima kosti i kraniofacijalnih struktura, metabolizmu lipida (7,9,19-23). No, radova na temu njihove uloge u postishemijskim procesima nedostaje. Stoga rezultati ove studije bacaju novo svjetlo na ulogu Ctip2 i Satb2 u mozgu i na procese koji se zbivaju u mozgu poslije infarkta te kao takvi otvaraju nove mogućnosti za daljnja istraživanja točne uloge ovih proteina i uloge procesa neurogeneze nakon nastanka ishemijske lezije. Znanja koja bi se dobila ovakvim istraživanjima mogla biti korisna u budućnosti i služiti kao podloga razvoju novih terapijskih pristupa u liječenju moždanog udara kod ljudi.

Ograničenja studije uključuju malen uzorak miševa na kojem je rađeno istraživanje (n=13), varijabilnosti u veličinama ishemijskih lezija među pojedinim miševima MCAO skupine, proizvoljnost vremenskih točaka u kojima su snimali mozgovi miševa putem MRI pomoću kojih se mjerio volumen mozga, mjerenje i obrada podataka na snimkama magnetne rezonancije, preparata bojanih prema Nisslu i IHC (razlike između autora u izbrojenim signalima na IHC i ocrtavanju mozga na MRI snimkama, nedovoljno dobra kvaliteta preparata bojanih prema Nisslu). Sama prednost ovog rada ujedno predstavlja njegov nedostatak jer nedostatak podataka o ulozi ovih proteina kod moždane ishemije ograničavaju našu mogućnost donošenja određenih zaključaka interpretacijom dobivenih rezultata.

Uzevši u obzir sve navedeno, vidljivo je da u postishemijskim promjenama u mozgu sudjeluju procesi regeneracije koji sličje procesima kortikogeneze koja se zbiva tijekom embrionalnog razvoja mozga, a u koje su uključeni proteini Ctip2 i Satb2 koji su opisani i ispitivani u ovoj studiji. S obzirom na postavljenu hipotezu, mogli bismo je smatrati djelomično potvrđenom jer je pokazana djelomična reaktivacija biljega kortikogeneze. Ovaj rad upućuje na moguću novu hipotezu da je reaktivacija biljega kortikogeneze uvjetovana opsegom ishemijske lezije te bi mogla biti značajna u oporavku kod manjih moždanih udara. Tim načinom bi se bacilo novo svjetlo na patofiziološka zbivanja kod ishemije moždanog tkiva, ali isto smatramo da bi otvorilo mogućnosti potencijalno novih terapijskih ciljeva. Pored uzimanja podataka za obradu 3. i 7. dana, kako bi podatci bili što nijansirani i potpuniji možda bi trebalo uzimati podatke i u drugim vremenskim točkama, ako je moguće i tijekom duljeg vremenskog perioda, npr. 14 dana.

## 6. ZAKLJUČCI

Miševi MCAO skupine pokazali su povećanje moždane hemisfere u kojoj se dogodio infarkt uslijed porasta volumena ishemijske lezije, a taj se efekt izgubio do 7. dana. Ekspresija ispitivanih markera kortikogeneze Ctip2 i Satb2 bila je 7. dan poslije infarkta povećana u MCAO skupini miševa te je bila statistički značajno viša nego kod miševa *Sham* skupine za obje hemisfere i za obje ispitivane regije (korteks i striatum). Iz toga se zaključuje da se uslijed nastanka ishemijske lezije u mozgu zbivaju procesi regeneracije koji uključuju proces kortikogeneze, ali koja je točno njegova uloga i kako doprinosi regeneraciji ostaje nejasno.



## **7. ZAHVALE**

Iznimno zahvaljujemo našem mentoru prof. dr. sc. Srećku Gajoviću što nam je dao priliku sudjelovati u ovom projektu, usmjeravanju i pomoći tijekom izrade ovog rada, kao i na tome što nam je mnogo puta izašao u susret.

Veliko hvala našoj komentorici Sanji Srakočić, mag. biol. mol., na svim uputama, savjetima, materijalima, učinjenoj statistici i svim drugim načinima kojima nam je pomogla tijekom izrade i pisanja našeg rada, ali i naučila nas mnogočemu novome.

Zahvaljujemo doc.dr.sc. Dunji Gorup na pomoći prilikom izrade ovog rada.

Također hvala i svim zaposlenicima Zavoda za histologiju i embriologiju te zaposlenicima Hrvatskog instituta za istraživanje mozga koji su nam svojim radom pomogli u ostvarenju ovog znanstvenog rada.

## 8. LITERATURA

1. Campbell BCV, Khatri P. Stroke. *Lancet*. 2020;396(10244):129-142. doi:10.1016/S0140-6736(20)31179-X
2. Malojčić, B., Brinar V. Cerebrovaskularne bolesti. U: Brinar, V., ur., *Neurologija za medicinare*. prvo izdanje. Zagreb: Medicinska naklada, 2009. str. 167 – 175.
3. Žarković, K., Dmitrović, B., Kolenc, D., Damjanov, I. Bolesti živčanog sustava. U: Damjanov, I., Seiwert, S., Jukić, S., Nola, M., ur., *Patologija*. peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada, 2018, str. 808 – 810.
4. Ling KH, Hewitt CA, Beissbarth T, et al. Molecular networks involved in mouse cerebral corticogenesis and spatio-temporal regulation of Sox4 and Sox11 novel antisense transcripts revealed by transcriptome profiling. *Genome Biol*. 2009;10(10):R104. doi:10.1186/gb-2009-10-10-r104
5. Dehay C, Kennedy H. Cell-cycle control and cortical development [published correction appears in *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(7):568]. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(6):438-450. doi:10.1038/nrn2097
6. Dwyer ND, Chen B, Chou SJ, Hippenmeyer S, Nguyen L, Ghashghaei HT. Neural Stem Cells to Cerebral Cortex: Emerging Mechanisms Regulating Progenitor Behavior and Productivity. *J Neurosci*. 2016;36(45):11394-11401. doi:10.1523/JNEUROSCI.2359-16.2016
7. Alcamo, E. A., Chirivella, L., Dautzenberg, M., Dobрева, G., Fariñas, I., Grosschedl, R., & McConnell, S. K. (2008). *Satb2* Regulates Callosal Projection Neuron Identity in the Developing Cerebral Cortex. *Neuron*, 57(3), 364–377. doi:10.1016/j.neuron.2007.12.012
8. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9UPW6#function>
9. Berg KB, Schaeffer DF. SATB2 as an Immunohistochemical Marker for Colorectal Adenocarcinoma: A Concise Review of Benefits and Pitfalls. *Arch Pathol Lab Med*. 2017;141(10):1428-1433. doi:10.5858/arpa.2016-0243-RS
10. Huang, Y., Song, N.-N., Lan, W., Hu, L., Su, C.-J., Ding, Y.-Q. and Zhang, L. (2013), Expression of Transcription Factor *Satb2* in Adult Mouse Brain. *Anat. Rec.*, 296: 452-461. <https://doi.org/10.1002/ar.22656>
11. Leone DP, Heavner WE, Ferenczi EA, et al. *Satb2* Regulates the Differentiation of Both Callosal and Subcerebral Projection Neurons in the Developing Cerebral Cortex. *Cereb Cortex*. 2015;25(10):3406-3419. doi:10.1093/cercor/bhu156
12. Harb K, Magrinelli E, Nicolas CS, et al. Area-specific development of distinct projection neuron subclasses is regulated by postnatal epigenetic modifications. *Elife*. 2016;5:e09531. Published 2016 Jan 27. doi:10.7554/eLife.09531
13. Ling-juan Zhang, Shreya Bhattacharya, Mark Leid, Gitali Ganguli-Indra, Arup K. Indra; *Ctip2* is a dynamic regulator of epidermal proliferation and differentiation by integrating EGFR and Notch signaling. *J Cell Sci* 1 December 2012; 125 (23): 5733–5744. doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.108969>
14. Topark-Ngarm, A., Golonzhka, O., Peterson, V. J., Barrett, B., Martinez, B., Crofoot, K., ... Leid, M. (2006). CTIP2 Associates with the NuRD Complex on the Promoter of *p57KIP2*, a Newly

- Identified CTIP2 Target Gene. *Journal of Biological Chemistry*, 281(43), 32272–32283. doi:10.1074/jbc.m602776200
15. Kádár A, Wittmann G, Liposits Z, Fekete C. Improved method for combination of immunocytochemistry and Nissl staining. *J Neurosci Methods*. 2009;184(1):115-118. doi:10.1016/j.jneumeth.2009.07.010
  16. Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol*. 2019;1897:289-298. doi:10.1007/978-1-4939-8935-5\_25
  17. Yousaf T, Dervenoulas G, Politis M. Advances in MRI Methodology. *Int Rev Neurobiol*. 2018;141:31-76. doi:10.1016/bs.irn.2018.08.008
  18. Smith-Bindman R, Miglioretti DL, Johnson E, et al. Use of diagnostic imaging studies and associated radiation exposure for patients enrolled in large integrated health care systems, 1996-2010. *JAMA*. 2012;307(22):2400-2409. doi:10.1001/jama.2012.5960
  19. Bhattacharya N, Ganguli-Indra G, Indra AK. CTIP2 and lipid metabolism: regulation in skin development and associated diseases. *Expert Rev Proteomics*. 2021;18(11):1009-1017. doi:10.1080/14789450.2021.2003707
  20. Daher MT, Bausero P, Agbulut O, Li Z, Parlakian A. Bcl11b/Ctip2 in Skin, Tooth, and Craniofacial System. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:581674. Published 2020 Dec 10. doi:10.3389/fcell.2020.581674
  21. Roy SK, Shrivastava A, Srivastav S, Shankar S, Srivastava RK. SATB2 is a novel biomarker and therapeutic target for cancer. *J Cell Mol Med*. 2020;24(19):11064-11069. doi:10.1111/jcmm.15755
  22. Chen QY, Des Marais T, Costa M. Deregulation of SATB2 in carcinogenesis with emphasis on miRNA-mediated control. *Carcinogenesis*. 2019;40(3):393-402. doi:10.1093/carcin/bgz020
  23. Huang X, Chen Q, Luo W, et al. SATB2: A versatile transcriptional regulator of craniofacial and skeleton development, neurogenesis and tumorigenesis, and its applications in regenerative medicine. *Genes Dis*. 2020;9(1):95-107. Published 2020 Oct 17. doi:10.1016/j.gendis.2020.10.003

## 9. SAŽETAK

Ante Petrović, Dominik Kutlić

### **Analiza slikovnih podataka procesa kortikogeneze nakon ishemijske lezije odraslog mišjeg mozga**

Moždani udar je naglo nastali žarišni neurološki deficit uzrokovan akutnom ishemijskom lezijom središnjeg živčanog sustava.

Cilj istraživanja je bila analiza biljega kortikogeneze (Ctip2 i Satb2) u mozgu nakon ishemijske lezije mozga miša radi testiranja hipoteze da u cijeljenju moždanog tkiva nakon ishemijskog moždanog udara uključena reaktivacija ovog procesa u sklopu oporavka.

U istraživanju je bilo uključeno 13 miševa podijeljenih u dvije skupine: *MCAO* s napravljenom okluzijom srednje moždane arterije i *Sham* bez okluzije. Analiza je provedena volumetrijom pomoću snimaka magnetne rezonancije i preparata bojanih metodom prema Nisslu, funkcionalnom procjenom neurološkog stanja, te kvantifikacijom signala biljega kortikogeneze na snimkama imunohistokemije histoloških preparata.

Snimke MRI u skupini *MCAO* pokazale su 3. dan nakon okluzije porast volumena hemisfere zahvaćene infarktom i smanjenje tog volumena 7. dan. Rezultati imunohistokemije pokazali su povećanu ekspresiju markera kortikogeneze u *MCAO* skupini koja je bila viša u odnosu na *Sham* skupina za obje hemisfere i ispitivane regije.

Nakon nastanka ishemijske lezije mozga zbiva se oporavak te je moguće da je reaktivacija biljega kortikogeneze sudjeluje u ovom zbivanju, što bi mogla razjasniti buduća istraživanja točne uloge i doprinosa promatranih biljega u plastičnosti i regeneraciji mozga.

**Ključne riječi:** moždani udar, kortikogeneza, magnetna rezonancija, preparati bojeni metodom prema Nisslu, imunohistokemija

## 10. SUMMARY

Ante Petrović, Dominik Kutlić

### **The analysis of graphic data of corticogenesis after an ischemic lesion in adult mouse brain**

Stroke is a sudden, focal neurological deficit caused by an acute focal ischemia of the CNS.

This study analyzed changes in mouse brain after infarction and markers of corticogenesis (Ctip2 and Satb2) to test a hypothesis that reactivation of these markers is involved in repair of brain tissue after infarction.

The study included 13 mice divided into two groups depending on the presence of MCAO. Volumetry by using MR images and Nissl staining specimen as well as quantification of the markers of corticogenesis on immunohistochemistry images were analyzed.

The MR images showed 3 days after the occlusion in the MCAO group an increase of volume of a hemisphere in which infarction occurred and its decrease on the day 7. The results of immunohistochemistry showed increased expression of the markers of corticogenesis in the MCAO group, and it was higher for both hemispheres and regions of interests compared to the *Sham* group.

Regeneration that includes the process of corticogenesis occurs after infarction, so the reactivation of the markers of corticogenesis may have a significant role in recovery from a stroke depending on the size of the lesion but their exact role and contribution to the regeneration remain unclear.

**Key words:** stroke, corticogenesis, MRI, Nissl staining specimen, immunohistochemistry

## 11. ŽIVOTOPISI AUTORA

**Ante Petrović** rođen je 22. siječnja 1998. godine u Zagrebu. Od 2004. do 2012. godine pohađao je Osnovnu školu „Stjepan Radić“ u Imotskom, od 2012. do 2016. pohađao je I. gimnaziju u Zagrebu. 2016. godine upisao je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Student je šeste godine. Za akademsku godinu 2017./2018. dobio je Dekanovu nagradu za uspjeh. Na drugoj godini studija primio je državnu STEM-stipendiju za biomedicinsko područje znanosti od strane Ministarstva znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske, a na trećoj je godini primio Stipendiju Grada Zagreba za izvrsnost studentima koju do danas kontinuirano prima. 2020. godine sudjelovao je na studentskom kongresu CROSS16 kao koautor sažetka studije. Govori engleski, njemački, španjolski i francuski jezik (DELFB1).

**Dominik Kutlić** rođen je 9. studenog 1997. godine u Zagrebu. Od 2004. do 2012. godine pohađao je Osnovnu školu Trnsko u Zagrebu, od 2012. do 2016. pohađao je I. gimnaziju u Zagrebu. 2016. godine upisao je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Student je šeste godine. Na trećoj godini studija primio je državnu STEM-stipendiju za biomedicinsko područje znanosti Ministarstva znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske. Od 2017. do 2019. godine demonstrator na Zavodu za anatomiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Od 2017. do 2022. godine bio je volonter u studentskoj organizaciji CroMSIC. 2020. godine sudjelovao je na 3. međunarodnoj studentskoj konferenciji RECOOP. Proveo je dva tjedna 2021. godine na *observership* u domu zdravlju u Fristadu u Švedskoj. Za akademsku godinu 2020./2021. dobio je Dekanovu nagradu za uspjeh. Govori engleski i njemački jezik.