

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Nika Filipović

Pavao Mioč

**Zagrebački pristup standardizirane manualne
segmentacije ishemijske ozljede mišjeg mozga
snimljenog magnetskom rezonancijom**

Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Marine Radmilović u sklopu znanstvenog projekta Hrvatske zaklade za znanost RepairStroke (IP-06-2016-1892) "Multimodalni prikaz molekularnih zbivanja tijekom oporavka mišjeg mozga nakon ishemijskog oštećenja", voditelja prof. dr. sc. Srećka Gajovića i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2018./2019.

POPIS I OBJAŠNJENJE KRATICA KORIŠTENIH U RADU

rtPA - *recombinant tissue plasminogen activator*, hrv. rekombinirani tkivni aktivator plazminogena

ATP - *adenosine triphosphate*, hrv. adenzin trifosfat

Na⁺/K⁺ ATP-aza – *sodium potassium ATP-ase*, hrv. izmjenjivač natrija i kalija ovisan o ATP-u

PRR - *pattern recognition receptors*, hrv. receptori koji prepoznaju uzorak

TLR - *Toll-like receptor*, hrv. receptor nalik na Toll

Tlr – *Toll like receptor gene*, hrv. gen receptora nalik na Toll

MCA - *middle cerebral artery*, hrv. srednja moždana arterija

DAMP - *danger/damage associated molecular patterns*, hrv. molekularni uzorci pridruženi opasnosti/ozljedi

HMGB1 - *high-mobility group protein B1*, hrv. protein B1 visoko mobilne grupe

HSP60 - *heat-shock protein 60*, hrv. protein toplinskog šoka 60

MR - *magnetic resonance imaging*, hrv. magnetska rezonancija

DTI - *diffusion tensor imaging*, hrv. difuzijska traktografska metoda

WT - *wild type*, hrv. divlji tip

MCAO - *middle cerebral artery occlusion*, hrv. okluzija srednje moždane arterije

PBS - *phosphate buffer saline*, hrv. fosfatni pufer

PFA - *paraformaldehyde*, hrv. paraformaldehid

SA - *stroke area*, hrv. područje ishemijskog oštećenja

BL - *baseline*, hrv. početna vrijednost

IL - *ipsilateral hemisphere*, hrv. ipsilateralna hemisfera

CL - *contralateral hemisphere*, hrv. kontralateralna hemisfera

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Moždani udar	1
1.1.1. Vrste moždanog udara	1
1.1.2. Posljedice ishemijskog oštećenja	1
1.1.3. Uloga upale u patofiziologiji ishemijskog oštećenja mozga.....	2
1.1.4. Uloga receptora nalik na Toll u ishemijskom oštećenju mozga.....	3
1.2. Animalni modeli ishemijskog moždanog udara	3
1.3. Oslikavanje ishemijskog oštećenja mišjeg mozga magnetskom rezonancijom	4
2. HIPOTEZA I OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	6
3. MATERIJALI I METODE	7
3.1. Izazivanje ishemijskog oštećenja.....	7
3.2. Snimanje magnetskom rezonancijom	9
3.3. Procjena veličine ishemijske lezije magnetskom rezonancijom	9
3.4. Priprema tkiva za histološke analize.....	10
3.5. Rezanje mišjeg mozga na kriostatu i histološko bojanje po Nisslu.....	11
3.6. Prikaz i analiza rezultata	12
4. REZULTATI.....	13
5. RASPRAVA.....	21
6. ZAKLJUČCI.....	23
7. ZAHVALE.....	24
8. POPIS LITERATURE	25
9. SAŽETAK.....	28
10. SUMMARY.....	29

1. UVOD

1.1. Moždani udar

Moždani udar je, prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije, rapidni gubitak žarišnih ili globalnih moždanih funkcija s neurološkim simptomima koji traju duže od 24 sata, a koji nastaje isključivo poremećajem moždanog krvnog protoka. U razvijenim zemljama, svake godine približno 800 000 ljudi doživi moždani udar, bilo da je riječ o prvom ili o rekurentnom moždanom udaru, čineći ga trećim uzrokom smrti te vodećim uzrokom invalidnosti (Benjamin *i sur.*, 2018). Smatra se da u Sjedinjenim Američkim Državama svakih 40 sekundi jedna osoba ima moždani udar, dok svake 4 minute jedna osoba umre zbog moždanog udara (Benjamin *i sur.*, 2018). Rastom udjela starije populacije, moždani udar postaje sve značajniji javnozdravstveni problem s izrazitim socijalnim i ekonomskim utjecajem (Dobrivojević, Špiranec i Sindić, 2014). Osim pozitivne obiteljske anamneze moždanog udara, čimbenici uključeni u razvoj moždanog udara su poremećaji rada srca, hipertenzija, šećerna bolest, hiperlipidemija, pušenje i pretilost.

1.1.1. Vrste moždanog udara

Moždani udar možemo podijeliti na dvije vrste: ishemijski i hemoragijski. Ishemijski moždani udar ima značajno veću prevalenciju s 87% slučajeva, za razliku od hemoragijskog koji se javlja u 13% slučajeva. Kod 10 - 40% osoba s ishemijskim moždanim udarom može se razviti hemoragijska transformacija, komplikacija koja se najčešće povezuje s primjenom rekombiniranog tkivnog aktivatora plazminogena (rtPA) i povećanom smrtnosti (Jickling *i sur.*, 2014). Prema mehanizmu nastanka ishemijski moždani udari dijele se na trombotske, embolijske te na one nastale kao posljedica sistemske hipoperfuzije. Trombotski i embolijski uzrokuju začepljenje krvne žile u čijem se području opskrbe javlja žarišno oštećenje. Kod sistemske hipoperfuzije dolazi do smanjenja perfuzije na granicama opskrbnih područja velikih moždanih arterija zbog čega se javlja oštećenje različitih moždanih regija (Caplan, 1991). Hemoragijski moždani udar nastaje uslijed degeneracije ili prsnuća moždanih krvnih žila, prilikom čega dolazi do izlivanja krvi u moždano tkivo (*Hemorrhagic stroke – National Stroke Association*, 2019).

1.1.2. Posljedice ishemijskog oštećenja

Ishemijsku ozljedu mozga karakterizira slijed patofizioloških procesa koji se postupno razvijaju u prostoru i vremenu, vodeći naposljetku do oštećenja i gubitka neurona, glija i endotelne stanice (Doyle, Simon i Stenzel-Poore, 2008). U akutnoj fazi (unutar nekoliko sati od privremenog ili trajnog smanjenja protoka krvi u mozgu) dolazi do pojave ekscitotoksičnosti,

periinfarktne depolarizacija, nekroze te upalnog odgovora, koji se nastavlja u kroničnoj fazi uz pojavu programirane smrti stanica (Dirnagl, Iadecola i Moskowitz, 1999). Smanjenjem protoka krvi kroz mozak na manje od 10 ml/100 g nastaju ireverzibilna oštećenja (Dobrivojević, Špiranec i Sindić, 2014). Nakon okluzije moždane arterije, u njezinom se irigacijskom području razvija ishemija, posljedično dolazi do smanjenja ATP-a što dovodi do poremećaja ionske homeostaze, prvenstveno Na^+/K^+ ATP-aze, te unutar nekoliko minuta od samog začepjenja dolazi do nekroze stanica. Depolarizacija dovodi do aktivacije kalcijevih kanala što povećava unutarstaničnu koncentraciju kalcija, inhibicije presinaptičkog unosa glutamata te posljedično njegovog nakupljanja dovodeći do aktivacije enzima koji potiču staničnu smrt (*Moždani udar – Wikipedija*, 2018; Garcia *i sur.*, 1994). U perifernoj zoni neuroni mogu preživjeti i danima nakon okluzije, ovisno o protoku krvi kroz kolaterale, kao i o vremenu koje je potrebno da se ponovno uspostavi normalan protok (González, 2006). Ishemijska kaskada pritom ne zahvaća samo neurone, već uključuje endotelne stanice, pericite, astrocite, rezidentne upalne stanice (mikrogliju, perivaskularne makrofage, dendritičke stanice i mastocite) te upalne stanice koje uslijed patoloških zbivanja iz cirkulacije ulaze u tkivo (neutrofili, monociti, makrofazi), i one koje sintezom i otpuštanjem brojnih medijatora upale (prvenstveno citokina i kemokina) uzrokuju izraženu upalnu reakciju (Jin, Yang i Li, 2010; Dobrivojević, Špiranec i Sindić, 2014).

1.1.3. Uloga upale u patofiziologiji ishemijskog oštećenja mozga

Imunološki sustav sudjeluje u čitavom vremenskom slijedu ishemijske kaskade, od samog začepjenja krvne žile, tijekom štetnih procesa, koji dovode do oštećenja tkiva u akutnoj fazi oštećenja, pa sve do procesa popravka i reorganizacije moždanog tkiva u kroničnoj fazi (Kamel i Iadecola, 2012; Amantea *i sur.*, 2014). Upalni odgovor na ishemijsko oštećenje započinje brзом aktivacijom stanica mikroglije. Nakon prekida čvrstih spojeva među endotelnim stanicama kreće infiltracija neutrofila, makrofaga i leukocita (Jin, Yang i Li, 2010). Stanice mikroglije najznačajnije su stanice u upalnom odgovoru mozga na ishemijsku leziju. Mikroglija ima višestruk način aktivacije ili prijelaza u izvršni oblik stanica, primjerice vezanjem bakterijskih, virusnih, gljivičnih, ali i endogenih liganada, koji se vežu na receptore koji prepoznaju uzorak (engl. *pattern recognition receptors*, PRR), ili u drugom slučaju signalima iz okolnih stanica koje ulaze u proces nekroze pri čemu mikroglija gubi stimulaciju iz svoje okoline. Kod mehanizma aktivacije specifičnim ligandom glavnu ulogu imaju receptori nalik na Toll (engl. *Toll-like receptors*, TLR), koji pripadaju skupini receptora koji prepoznaju uzorak (Wang, Ge i Zhu, 2013).

1.1.4. Uloga receptora nalik na Toll u ishemijskom oštećenju mozga

Stanice mikroglije započinju upalnu kaskadu u trenutku kada prepoznaju molekule oslobođene zbog oštećenja okolnih stanica čija je uloga signalizacija patoloških zbivanja. Mikroglija prepoznaje endogene molekule koje se objedinjuju pod nazivom molekularni uzorci pridruženi opasnosti/ozljedi (engl. *danger/damage associated molecular patterns*, DAMP). DAMP molekule poput HSP60 (prema engl. *heat-shock protein 60*), HSP70 (prema engl. *heat-shock protein 70*), HMGB1 (prema engl. *high-mobility group protein B1*) i fibronektina oslobađaju se kao posljedica oštećenja stanica i pritom imaju ulogu signala koji upozoravaju na patološko zbivanje. DAMP molekule vežu se specifično na TLR aktivirajući signalizaciju o narušenom integritetu središnjeg živčanog sustava (Kono i Rock, 2008). Od niza TLR, značajna je uloga TLR2 u modulaciji upalnog odgovora nakon ishemijskog moždanog udara. Dokazan je povećan izražaj TLR2 u kori mozga miša nakon moždanog udara, ali isto tako i manji volumen ishemijske lezije kod miševa s onemogućenim *Tlr2* genom u odnosu na miševe divljeg tipa, što ukazuje na štetnu ulogu aktivacije TLR2 u mozgu nakon ishemije (Lehnardt *i sur.*, 2007; Ziegler *i sur.*, 2007). Međutim, istraživanje Hua *i sur.* pokazuje da miševi s onemogućenim *Tlr2* genom imaju povećan volumen lezije i smrtnost u usporedbi s divljim tipom životinja, upućujući tako na moguću zaštitnu ulogu TLR2 u ishemijskoj ozljedi (Hua *i sur.*, 2009). Oprečna stajališta ovih istraživanja mogu se objasniti razlikama u vremenskim točkama koje su korištene u ovim istraživanjima. Rad Bohaceka *i sur.* ukazuje na vremenski dvojak ulogu TLR2 u evoluciji ishemijske lezije, zaštitnu u akutnoj fazi i štetnu u kroničnoj fazi (Bohacek *i sur.*, 2012).

1.2. Animalni modeli ishemijskog moždanog udara

Životinjski modeli su naširoko korišteni kako bi pomogli razumijevanju patofiziologije moždanog udara i kako bi se ispitala potencijalna učinkovitost novih terapija. Međutim, korisnost životinjskih modela se dovodi u pitanje zbog neuspjeha translacije obećavajućih rezultata u kliničku praksu. Procjena invaliditeta i neurološkog deficita pacijenata, mjesecima nakon moždanog udara, u oštrom je kontrastu s mnogim istraživanjima rađenim na životinjskim modelima gdje se primarno procjenjuje volumen ishemijske ozljede u pojedinačnim vremenskim točkama, i to najčešće samo u akutnoj fazi (Schellinger *i sur.*, 2012; Rewell *i sur.*, 2017). Razlike između onoga što i kada mjerimo u kliničkim i bazičnim istraživanjima potaknuli su na reviziju STAIR preporuka koje predlažu da se u pretkliničkim ispitivanjima proširi praćenje životinja na najmanje 30 dana, pritom uključujući višestruka mjerenja na pojedinačnim životinjama ('Recommendations for Standards Regarding Preclinical Neuroprotective and Restorative Drug Development', 1999; Marc *i sur.*, 2009). Međutim, unatoč uvođenju ovih preporuka prije više od 20 godina, još uvijek više od 85% bazičnih istraživanja ne koristi se njima (CAMARADES (Collaborative Approach to Meta-Analysis and Review of Animal Data from Experimental Studies), 2014).

U svrhu poboljšanja životinjskog modela moždanog udara, sve se više težilo ujednačenju veličina ishemijske lezije i poboljšanju preživljenja, npr. promjenama u svojstvima niti koja se koristi za začepljenje same krvne žile, zatim promjenom trajanja i mjesta same okluzije, korištenjem različitih duljina osvjetljavanja ili postavki lasera u fototrombotskom modelu, pri čemu se sve više približavamo lezijama iste veličine čije mjesto može biti inducirano s relativnom konzistencijom (Spratt *i sur.*, 2006; Nishimura *i sur.*, 2011; Alaverdashvili, Paterson i Bradley, 2015; Phelan *i sur.*, 2017). Međutim, samo smanjenje varijabilnosti čini životinjski model dostupnijim, pritom generalizirajući ishod i dovodeći u pitanje samu translacijsku vrijednost s obzirom na to da je moždani udar kod ljudi također varijabilan. Za rješavanje ovih izazova i olakšavanje rigorozne evaluacije potencijalnih terapija, potrebno je jasno razumijevanje varijabilnosti samog moždanog udara, metodološke varijabilnosti te pouzdana kvantifikacija samog ishoda.

1.3. Oslikavanje ishemijskog oštećenja mišjeg mozga magnetskom rezonancijom

U pretkliničkim istraživanjima, uz sve suvremene modalitete oslikavanja, histologija se i dalje koristi kao zlatni standard u određivanju veličine ishemijske lezije. Najčešća histološka volumetrijska metoda izvodi se manualnim mjerenjem područja oštećenja koje je na histološkim preparatima bojanima po Nisslu vidljivo kao svjetlije edematozno tkivo. Bojanje histoloških rezova po Nisslu omogućava potrebnu preciznost za analizu ishemijskih lezija, prikazujući stanične elemente koji su metabolički narušeni kao slabije obojane (Osborne *i sur.*, 1987; Durukan i Tatlisumak, 2007). Međutim, iako se histološke metode koriste kao metoda izbora za volumetriju ishemijskih lezija, histološke metode su po prirodi dvodimenzionalne, zahtijevaju dugotrajnu pripremu tkiva, pri čemu često dolazi do sažimanja ili širenja tkiva te geometrijske distorzije, dugotrajni rad pri rezanju tkiva te kompliciranu trodimenzionalnu rekonstrukciju iz pojedinih histoloških rezova (Metscher, 2009). Nadalje, žrtvovanje životinja u pojedinim vremenskim točkama, radi histološke analize, čini longitudinalna istraživanja i određivanje promjena u mozgu miša nakon ishemijske ozljede u višestrukim vremenskim točkama nemogućim. Zbog toga se koristi paralelno više skupina životinja, čime se drastično povećava broj životinja koji je potreban za pojedino istraživanje. Iz tog razloga je eksperimentalna magnetska rezonancija (MR) malih životinja postala neophodan alat u translacijskim istraživanjima, prvenstveno moždanog udara, dajući uvid u promjene na makrostrukturnoj i mikrostrukturnoj razini u netaknutom tkivu. Neinvazivnost MR omogućuje longitudinalno proučavanje subjekta, dajući joj tako prednost u odnosu na druge tomografske ili spektroskopske modalitete. Uz pomoć MR, ishemijski moždani udar može se vizualizirati i analizirati, počevši od nekoliko sati nakon izazivanja ishemijskog oštećenja, do tjedan dana nakon, koristeći spin spin relaksacijsko vrijeme T2 kontrasta koji je osjetljiv na povećanje intersticijske tekućine uzrokovane razvojem moždanog edema (Jacobs *i sur.*, 2001;

Dijkhuizen i Nicolay, 2003). Rezolucijom edema nakon prvog tjedna od ishemije dolazi do značajnog gubitka tkiva, koji se može mjeriti koristeći anatomske T2 snimke, te do kompleksne tkivne reorganizacije koja se može mjeriti različitim modalitetima snimanja, poput difuzijskih traktografskih metoda (eng. *diffusion tensor imaging*, DTI) ili funkcijske magnetske rezonancije (fMRI). Osim samog snimanja, sama metoda analize i segmentacije slike je od visokog značaja. Danas se u kliničkim istraživanjima koristi nekoliko algoritama za detekciju, segmentaciju i klasifikaciju ishemije uz pomoć MR, međutim to nije slučaj za segmentaciju lezije na eksperimentalnoj MR, gdje se još uvijek koriste manualne ili polu-automatske metode za segmentaciju čineći samu analizu dugotrajnom, s većim ili manjim razlikama u reproducibilnosti same metode. Postoji nekoliko algoritama koji se koriste za štakore, a koji su ostvarili obećavajuće rezultate (Ghosh *i sur.*, 2012, 2014). Također, postoji i automatski algoritam za analizu ishemijske lezije, koji međutim prvenstveno koristi T2 kontrast omogućavajući pritom analizu samo do tjedan dana nakon indukcije ishemije, nakon čega se i dalje koristi manualna analiza.

Budući da ne postoji jedinstvena metoda analize evolucije ishemije u mišjem modelu moždanog udara snimljene magnetskom rezonancijom, kojom bismo longitudinalno pratili evoluciju, progresiju i rezoluciju ishemijskog oštećenja, ovim smo radom uspostavili Zagrebački pristup standardizirane manualne segmentacije i pritom vrednovali naš pristup usporedbom miševa s onemogućenim *Tlr2* genom i miševa divljeg tipa.

2. HIPOTEZA I OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

HIPOTEZA:

Hipoteza ovog istraživanja je da se Zagrebački pristup standardizirane manualne segmentacije evolucije ishemijskog oštećenja mišjeg mozga snimljenog magnetskom rezonancijom može upotrijebiti za razlikovanje testne od kontrolne skupine.

OPĆI CILJ:

Opći cilj ovog rada je uspostaviti standardiziranu metodu segmentacije događaja, koji slijede nakon ishemijske ozljede mozga miševa snimljenih magnetskom rezonancijom, kojom bi se razlikovala testna skupina miševa s onemogućenim *Tlr2* genom od kontrolne skupine miševa divljeg tipa.

SPECIFIČNI CILJEVI:

U svrhu potvrđivanja hipoteze, određen je niz specifičnih ciljeva:

1. Odrediti postotak moždanog edema putem segmentacije moždanih polutki.
2. Odrediti volumen ishemijske lezije u akutnoj fazi moždanog udara korištenjem T2 mapa.
3. Odrediti postotak gubitka tkiva ipsilateralne hemisfere u kroničnoj fazi moždanog udara korištenjem T2 snimki.
4. Vrednovati segmentaciju kronične faze moždanog udara na magnetskoj rezonanciji usporedbom s histološkim rezovima bojenim Nisslom.

3. MATERIJALI I METODE

Sve postupke na životinjama odobrilo je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, i u skladu su s naputcima Etičkog kodeksa Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama i Direktivom EU 2010/63 / EU o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe. Pokusi su provedeni na 12–16 tjedana starim mužjacima miševa uzgojenih u nastambi Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Životinje su bile smještene na temperaturi (22 ± 2 °C) u okolini s kontroliranom vlagom, u ciklusima svjetla/tame od 12/12 sati. Voda, peletirana hrana te, nakon zahvata, vodom omekšana hrana dani su *ad libitum*. Korišteni su miševi soja B6N-Tyrc-Brd/rdCrCrI (prikazani kao WT, engl. *Wild Type*) koji predstavlja albino varijantu soja C57Bl/6N, te soj miševa s onemogućenim *Tlr2* genom B6.129-Tlr2tm1Kir/J (prikazani kao *Tlr2*^{-/-}).

3.1. Izazivanje ishemijskog oštećenja

U istraživanju je za izazivanje ishemijskog oštećenja mozga miša korištena metoda unilateralne intraluminalne okluzije srednje moždane arterije, tj. MCAO (engl. *middle cerebral artery occlusion method*), prilagođena prema prethodno opisanoj u radovima (Bahmani *i sur.*, 2011; Adamczak *i sur.*, 2014). Operativne zahvate na svim životinjama izvela je jedna osoba kako bi se smanjila varijabilnost veličine lezije.

Sat vremena prije zahvata mišu je intraperitonealno dana fiziološka otopina u volumenu od 0,2 ml, te je 20 min prije zahvata dana supkutana analgezija buprenorfinom (0.03 mg/kg Buprenovet, Bayer, Germany). Pred početak zahvata miš je anestetiziran postavljanjem u indukcijsku komoru ispunjenu 4%-tnom mješavinom izoflurana (Isoflurane Baxter U.S., SAD) i kisika do trenutka prestanka spontanijih kretnji tijela i brkova, nakon čega je prebačen na grijanu podlogu gdje je održavan pod anestezijom 1,5 - 2%-tnom mješavinom izoflurana (Isoflurane Baxter U.S., SAD) i kisika. Miš je tijekom cijelog zahvata položen na grijanu podlogu koja održava tjelesnu temperaturu na 37,0 – 37,5°C, pri čemu se izbjegava moguća hipotermija miša. Hipotermija miša nakon izazivanja ishemijskog oštećenja mozga pruža znatan neuroprotektivni učinak, stoga je regulacija tjelesne temperature od izrazite važnosti (Miyazawa *i sur.*, 2003).

Kako bi se tijekom operativnog zahvata osiguralo pravilno postavljanje intraluminalnog silikonskog konca praćen je relativni protok krvi u mozgu miševa za vrijeme čitavog MCAO zahvata koristeći laserski dopler moorVMS-LDF (Moore Instruments Inc., Wilmington (DE), SAD). Postavljanje laserske sonde izvedeno je pod operacijskim mikroskopom radi pravilnog postavljanja same sonde te izbjegavanja mogućih dodatnih oštećenja okolnih struktura. Mišu su prvo oči premazane Recugel (Bausch & Lomb Place, Rochester, New York, SAD) gelom

za oči, kako bi se spriječilo isušivanje te je potom postavljen u lateralnu poziciju kako bi se izložilo operativno područje desnog sljepoočnog režnja. Nakon brijanja dlake, područje između oka i uha detaljno je dezinficirano te je napravljan zasjek u temporalnom mišiću koji je proširen škarama kako bi se u njega mogla utisnuti sonda. Miš je zatim postavljen u ležeći položaj, te je kalibrirana laserska sonda promjera 1 mm (Moor Instruments, Inc., Wilmington (DE), SAD) postavljena sve do lubanje kako bi se pratile promjene u protoku krvi srednje moždane arterije na monitoru laserskog doplera moorVMS-LDF. Zatim je obrijano i dezinficirano područje vrata, izveden je zasjek u području vrata, odmaknuto meko tkivo i žlijezde slinovnice pomoću štapića omotanih vatom, izložene su desna zajednička karotidna arterija, vanjska i unutrašnja karotidna arterija rasijecanjem od okolnog tkiva i živaca. Kirurškim koncem 6-0 napravljeno je 2 čvora na zajedničkoj karotidnoj arteriji: prvi, proksimalniji, je čvrsto postavljen, dok je drugi, pod samom bifurkacijom karotidne arterije, postavljen labavo. Na zajedničku karotidnu arteriju u području bifurkacije su postavljene samozatvarajuće pincete Dumont br. 7 te je između prvog i drugog čvora napravljen mali nepotpuni zasjek. Kroz zasjek je uvedena silikonska nit debljine 6-0 (Docol Corporation, Redlands, CA 92374-4707, USA), odstranjene su Dumont pincete br 7, a monofilament uveden dalje u unutrašnju karotidnu arteriju, daljnjim anatomskim slijedom i u Willisov krug sve do račvišta srednje moždane arterije, odnosno do pružanja otpora niti. Naknadno je pritegnut drugi čvor kako bi se spriječilo pomicanje silikoniziranog konca uslijed pokreta miša u budnom stanju. Rana je zatvorena privremenim šavovima koristeći 4-0 silikonizirani konac. Miš je potom probuđen iz anestezije i stavljen u grijani kavez. Nakon 60 minuta okluzije srednje moždane arterije miš je ponovno uspavan te prebačen na grijanu podlogu gdje je održavan pod anestezijom 1,5 - 2%-tnom mješavinom izoflurana (Isoflurane Baxter U.S., SAD) i kisika. Uklonjeni su privremeno postavljeni šavovi, a silikonizirani konac je izvučen sve do drugog čvora pod račvištem koji je pritegnut u potpunosti kako bi se spriječilo krvarenje. Vađenjem silikoniziranog konca uvedenog do račvišta srednje moždane arterije omogućena je reperfuzija. Rana je zašivena 4-0 silikoniziranim koncem, te premazana otopinom joda. Moguća dehidracija spriječena je intraperitonealnim davanjem 0,5 ml fiziološke otopine. Miš je potom premješten na 24 sata u kavez, na grijanu podlogu (37 °C). Cijeli zahvat izveden je pod operacijskim mikroskopom s izvorom hladnog svjetla. Tijekom zahvata korišten je retraktor kako bi rubovi rane ostali razmaknuti, a eventualni tragovi krvi bili su uklonjeni uz pomoć sterilnih štapića sa namotanom vatom na vrhu. Postoperativno je svakom mišu injicirano 0,2 ml 20%-tne glukoze u fiziološkoj otopini te je osigurana analgezija buprenorfinom (0,03 mg/kg Buprenoret, Bayer, Njemačka) jednom dnevno kroz tri dana. U prethodno navedenim postupcima, radi postizanja maksimalno aseptičnih uvjeta, korišten je zasebni set instrumenata koji je prije svake operacije dezinficiran i steriliziran u suhom sterilizatoru.

3.2. Snimanje magnetskom rezonancijom

Snimanje magnetskom rezonancijom provedeno je na 7T sustavu (BioSpec 70/20 USR s računalnim programom Paravision 6.0.1., Bruker Biospin, Njemačka) u Tx/Rx konfiguraciji, koristeći volumnu zavojnicu od 86 mm (MT0381, Bruker Biospin Njemačka) za odašiljanje (Tx) i dvoelementnu površinsku zavojnicu za mišji mozak (MT0042, Bruker Biospin, Njemačka) za primanje (Rx). Životinje su smještene u ležećem položaju unutar vodenim sustavom grijanog Bruker nosača (Bruker, Njemačka) u kojemu je položaj glave osiguran pomoću zubne šipke i ušnih šipki. Prije snimanja, miš je anestetiziran postavljanjem u indukcijsku komoru ispunjenu 4%-tnom mješavinom izoflurana (Isoflurane Baxter U.S., SAD), a tijekom snimanja održavan mješavinom 1-1,5%-tnog izoflurana (Isoflurane Baxter U.S., SAD) i kisika. Disanje životinja praćeno je pomoću optičke sonde (Medres, Köln, Njemačka). Stopa respiracije je održavana u rasponu od 80-100 udisaja/min. Tjelesna temperatura životinje praćena je MR-kompatibilnom rektalnom temperaturnom sondom (Medres, Köln, Njemačka) i održavana na $37 \pm 0,5$ ° C kontroliranjem temperature vode nosača i dodatnog pokrova za tijelo. Životinje su snimljene 7 dana prije MCAO-a te na dan 1, 2, 3, 7, 14 i 28 nakon MCAO-a.

Protokol za snimanje sastojao se od pripremnih i glavnih snimaka. Pripremna snimanja uključivala su GE pilot snimku niske razlučivosti (Multi-Slice Localizer), TurboRARE snimku u sagitalnoj ravnini, kako bi se omogućilo precizno uzdužno poravnanje rezova, te dodatni MAPSHIM snimak u području od interesa. Glavna snimanja uključivala su anatomsku Turbo Spin-Echo sekvencu s visokom razlučivošću (TurboRARE, RARE = 8, TR/TE = 3000/30 ms, Nex = 6, rezolucija u ravnini = 90×90 μ m, ukupno vrijeme = 4 min) i T2-map snimku Multi-echo Spin-Echo sekvencijskog protokola (MSME, Necho = 15, TR / TE = 2500 / (8, 16, ..., 120 ms), Nex = 5, In-plane $\Delta t = 111 \times 111$ μ m, ukupno vrijeme = 19 min). T2 mape izračunate su iz izmjerenih podataka nakon obrade korištenjem ugrađenih makronaredbi Paravision 6.0.1. računalnog programa (Bruker Biospin, Njemačka). Vidno polje je postavljeno na 16×10 mm, debljina rezova 0,5 mm s razmakom od 0,1 mm između rezova. Ukupno trajanje protokola snimanja iznosilo je oko 50 min. Kriteriji za isključivanje životinja iz daljnjeg postupka snimanja na MR primijenjeni su nakon prvog snimanja 24 sata nakon MCAO-a i sastojali su se od nevidljive lezije, veličine lezije ispod 20 piksela, hemoragijskog krvarenja ili hemoragijske konverzije ishemijske lezije.

3.3. Procjena veličine ishemijske lezije magnetskom rezonancijom

Volumetrijska analiza izvedena je u programu ImageJ 1.51n (Wayne Rasband National Institute of Health USA). Budući da zapisi iz programa Paravision (upravljačko sučelje za MRI sustave Bruker BioSpec) nisu izravno kompatibilni s programom ImageJ, podaci su prvo pretvoreni u univerzalni format za neurološke snimke „NIfTi“ pomoću besplatnog pomoćnog alata Bru2Nii (<https://github.com/neurolabusc/Bru2Nii>) te su učitani u ImageJ pomoću

konverzijskog modula „NIfTi Input/Output“ (<https://imagej.nih.gov/ij/plugins/nifti.html>). Segmentacija mozga provedena je od strane dva nezavisna istraživača koja nisu prethodno sudjelovala u pokusu, tehnikom ručnog ocrtavanja ipsilateralne i kontralateralne hemisfere te ishemijske lezije. Ocrtavanje je izvedeno prema standardnom protokolu Laboratorija za regenerativnu neuroznanost Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Pri segmentaciji je uključeno samo područje koje odgovara području velikog mozga u anatomskom atlasu mišjeg mozga. Za ocrtavanje hemisfera korištene su T2 snimke visoke rezolucije, a za ocrtavanje edematoznih područja korištene su T2 mape. Rubovi hemisfera ocrtani su na T2 snimkama jer omogućuju lako prepoznavanje medijane linije koja odvaja kontralateralnu i ipsilateralnu hemisferu. Da bi se točnije izmjerio volumen, sekundarni učinak T1-relaksacije na vanjskom rubu mozga smanjen je dodatnim pojačavanjem kontrasta u analiziranim slikama. T2 mape daju prikaz kvantitativnog mjerenja vremena T2-relaksacije (spin-spin relaksacija) u svakom vokselu. Optimalne su za analiziranje područja zahvaćenog edemom, u kojem zbog povećane koncentracije tekućine raste vrijeme T2-relaksacije u odnosu na zdravo tkivo. Međutim, zbog tehničkih ograničenja, dobivene su slike manje rezolucije u odnosu na T2 snimke, a zbog zanemarivog učinka T1-relaksacije je i kontrast u medijanoj liniji mozga slabiji. Područje ishemijske lezije nakon indukcije moždanog udara prolazi kroz kontinuirane morfološke promjene te je način procjene lezije različit za akutnu i kroničnu fazu. U akutnoj fazi, tijekom prvih 7 dana nakon MCAO-a, mjereno je hiperintenzivno područje koje obilježava moždano tkivo zahvaćeno vazogenim edemom. Hiperintenzivna područja bila su ručno ocrtana na T2 mapama mozga. U kroničnoj fazi, mjereno je volumen tkiva izgubljenog uslijed nekroze, koji je izračunat oduzimanjem volumena ipsilateralne hemisfere u promatranoj vremenskoj točki nakon MCAO-a od volumena iste te hemisfere prije MCAO-a. Zbog potrebe preciznog određivanja medijane linije mozga, ova su mjerenja izvedena na T2 snimkama. Mjerenja volumena hemisfera u svim vremenskim točkama nakon MCAO-a izvedena su na T2 snimkama. Moždani edem u akutnoj fazi (do D7) mjereno je kao postotak povećanja volumena ozlijeđene hemisfere u odnosu na zdravu hemisferu. U kroničnoj fazi spomenuti edem više nije bilo moguće mjeriti zbog gubitka tkiva u području zahvaćenom moždanim udarom.

3.4. Priprema tkiva za histološke analize

Nakon posljednjeg skeniranja na magnetskoj rezonanciji, 28 dana nakon MCAO-a, korištena je metoda perfuzijske fiksacije sa 4%-tnim paraformaldehidom (4% PFA) u fosfatnom puferu - PBS (engl. *phosphate buffer saline*) kao fiksativom. Postupak perfuzijske fiksacije započet je uspavlivanjem miša letalnom intraperitonealnom dozom anestetika, 2,5%-tnog Avertina (oko 0,7 ml; Sigma Aldrich Chemie GmbH). Nakon toga je napravljen zasjek u području abdomena tako da su prerezani koža i mišići. Pincetom se zatim pridrži sternum te škarcama prerežu dijafragma i rebra kako bi se otvorio prilaz srcu. U lijevu klijetku se uvede igla promjera 27 G

te se pažljivo prereže desna pretkljetka. Perfuzija (oko 10 ml/min) započinje uštrcavanjem 50 ml otopine fosfatnog pufera (13,7 mM NaCl, 0,27 mM KCl, 0,65 mM Na₂HPO₄, 0,14 mM KH₂PO₄) kako bi se isprala sva krv iz krvotoka. Blijeda jetra su znak uspješne perfuzije, nakon čega je otopina PBS-a zamijenjena s 30 ml 4%-tne otopine paraformaldehida (engl. *paraformaldehyde* - PFA; Sigma Aldrich Chemie GmbH) u PBS-u.

Miševi su nakon fiksacije dekapitirani škarama te im je pincetama pažljivo sa glave odstranjena koža. Uslijedi uzdužni rez od *foramen magnum* prema rostralno, duž *suturæ sagitalis*, nakon čega su odstranjene okcipitalna kost i obje parijetalne kosti. Iznad bulbosa je također odstranjeno koštano tkivo te je uz pomoć metalne špatule nježno izoliran mozak odvajanjem od baze lubanje, pritom pazeći da ga ne ošteti *dura mater*. Mozak miša je uronjen u otopinu 4%-tnog PFA u svrhu postfiksacije imerzijom, dok je ostatak tijela odložen privremeno u za to predviđen zamrzivač, nakon čega je odvezen na spaljivanje.

3.5. Rezanje mišjeg mozga na kriostatu i histološko bojanje po Nisslu

Nakon 24-satne postfiksacije mozak je prebačen u PBS preko noći te progresivno dehidriran imerzijom u uzlazni niz alkohola (25%, 50%, 70%, 96%, 100%-tni etanol, 12 sati svaki), zatim prenesen u Bioclear ksilen (Biognost, Zagreb), zatim u otopinu 1:1 ksilena i parafina, nakon čega u čisti parafin (Biowaxlus 56/58, Biognost, Zagreb) preko noći. Nakon prožimanja tkiva parafinom tijekom noći, tkivo je uklopljeno u kockicu parafina i pripremljeno za rezanje postavljanjem na drveni nosač.

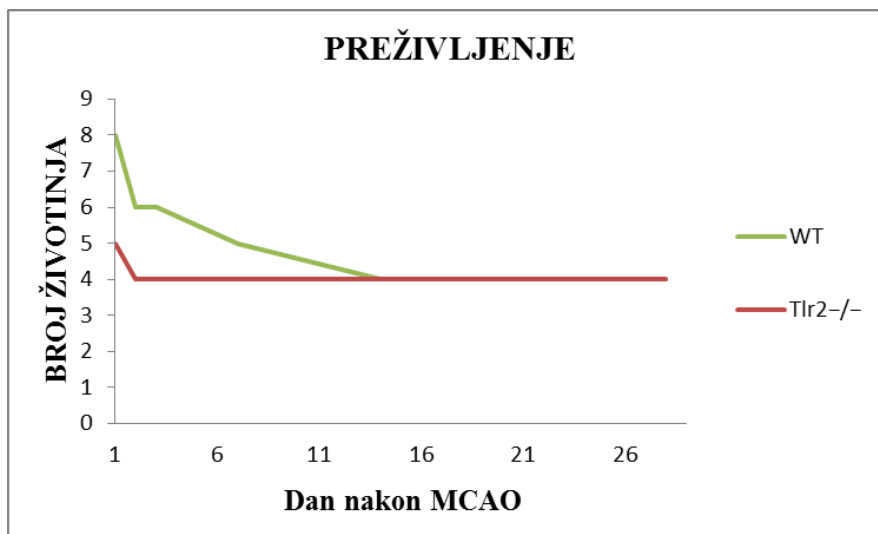
Moždano tkivo je zatim uz pomoć rotacijskog mikrotoma izrezano na frontalne rezove debljine 10 µm. Svaki deseti rez postavljen je na predmetno stakalce. Bojenje prema Nisslu započelo je uranjanjem moždanih rezova u otopinu Bioclear ksilena tijekom 5 min, zatim u 100%-tni metanol dva puta tijekom 5 min te dalje u silazni niz alkohola (96%-tni etanol 5 min, 70%-tni etanol 5 min), dvaput u destiliranu vodu tijekom 2 min, nakon čega su obojeni 0,1%-tnim krezil violetom (C-5042, Sigma) uranjanjem tijekom 20 min. Nakon bojenja, rezovi su isprani dva puta u vodi po 2 min te dehidrirani uzlaznim nizom alkohola (dva puta u 70%-tnom etanolu 2 min, dva puta u 96%-tnom etanolu 2 min i dva puta u 100%-tnom etanolu 2 min). Da bi se tkivo prosvijetlilo, Bioclear ksilen (Biognost, Zagreb) je primijenjen 2 puta tijekom 1 min, nakon čega su preparati pokriveni sredstvom za uklapanje Biomount (Biognost, Zagreb). Obojeno moždano tkivo sušeno je preko noći te digitalizirano pomoću Flatbed Epson perfection 4870 foto skenera (Epson America, Inc., Long Beach, CA, SAD), rezolucijom od 2400 dpi. Skenirane slike analizirane su koristeći softver ImageJ 1,45 (NIH, Bethesda, Maryland, SAD). Volumeni hemisfera i lezija su ručno određeni na pojedinačnim rezovima kroz čitav mozak jednakom metodom segmentacije kao i za magnetsku rezonanciju. Volumeni su izračunati množenjem površina svih ocrtanih područja sa zbrojem debljine rezova i udaljenosti među rezovima.

3.6. Prikaz i analiza rezultata

Za statističku obradu podataka korišten je studentov t test. Statistička značajnost definirana je na razini p vrijednosti manjoj od 0,05. Analiza je provedena koristeći računalni program GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, SAD).

4. REZULTATI

Ukupno 24 životinja podvrgnute su operaciji okluzije srednje moždane arterije, od čega je nakon prvog dana snimanja 10 životinja isključeno iz daljnjeg istraživanja zbog lezija koje su bile manje od 20 piksela ili neuspjele operacije. Jedna je životinja uginula prije prvog snimanja. Od ostalih 13 životinja koje su imale kortikostrijatalno oštećenje 5 životinja uginulo je do 7 dana nakon izazivanja ishemijskog oštećenja. Testne životinje soja *Tlr2*^{-/-} pokazale su značajno manju smrtnost od kontrolnog soja WT (Slika 1.).

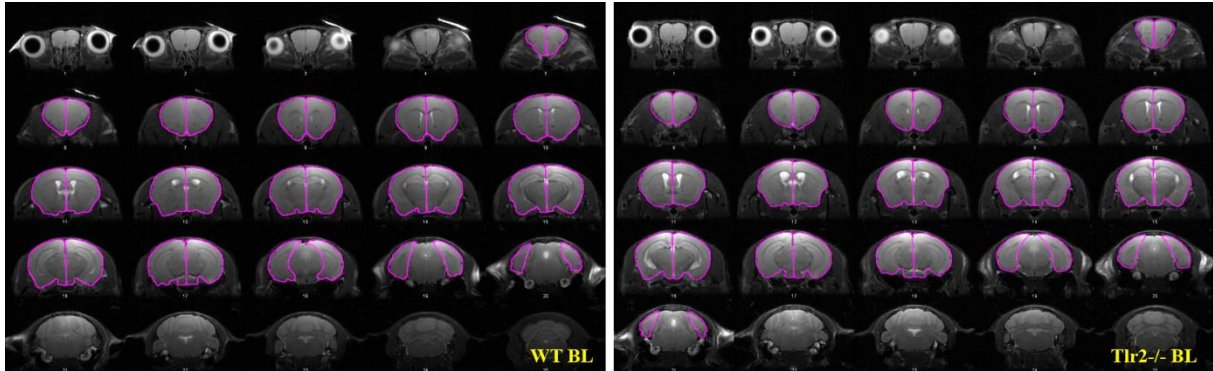


Slika 1 Preživljenje kontrolnih miševa divljeg tipa (WT) i testnih miševa sa onemogućenim *Tlr2* genom (*Tlr2*^{-/-}) u periodu od 24 sata nakon izazivanja ishemijskog oštećenja do 28 dana praćenja.

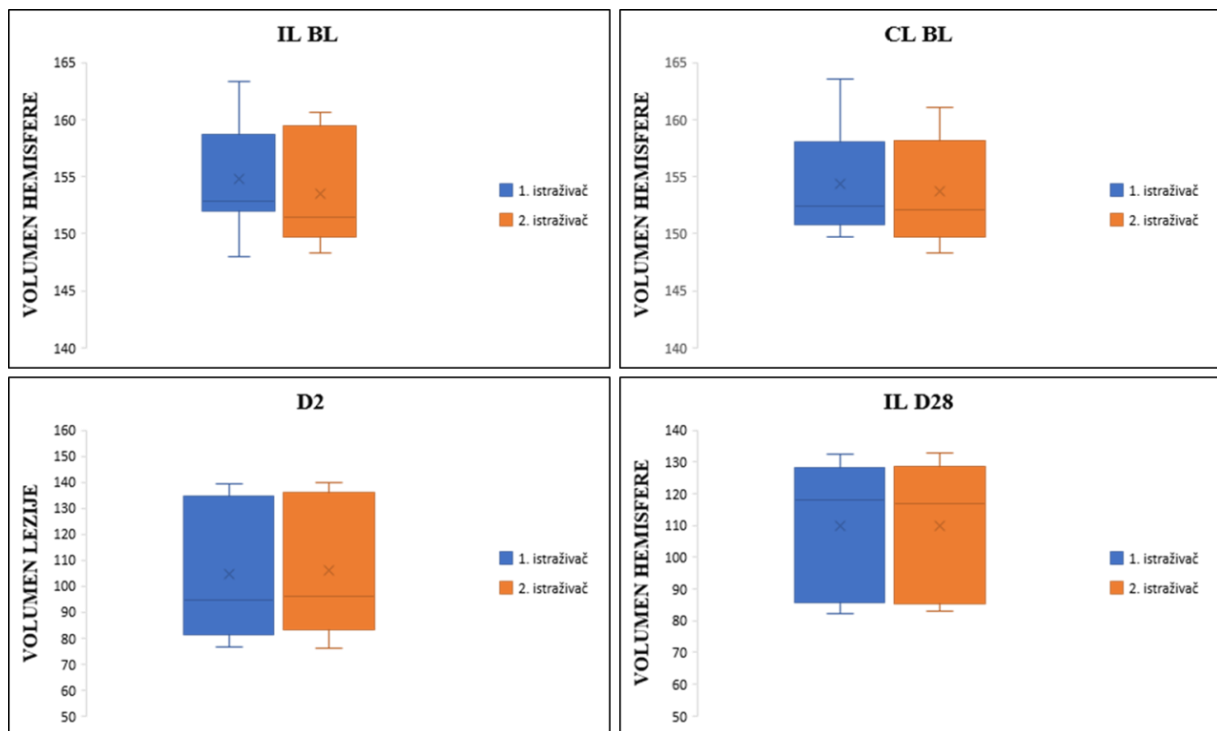
Za segmentaciju hemisfera u svim vremenskim točkama korištene su T2 snimke koje daju slike visoke rezolucije omogućujući dobru vidljivost morfologije mozga i lako prepoznavanje medijane linije koja odvaja kontralateralnu i ipsilateralnu hemisferu. Kako sekundarni učinak T1-relaksacije na vanjskom rubu mozga ne bi smanjio ocrtni volumen, pojačan je kontrast same slike. Pri segmentaciji mozga uključeno je samo područje velikog mozga koje odgovara području u anatomskom atlasu mišjeg mozga. Slika 2. prikazuje primjere ručne segmentacije lijeve kontralateralne i desne ipsilateralne hemisfere snimljene magnetskom rezonancijom T2 snimkom za kontrolne WT miševe i testne *Tlr2*^{-/-} miševe.

U svrhu vrednovanja pouzdanosti metode segmentacije hemisfera prije izazivanja ishemijske ozljede, uspoređene su vrijednosti volumena za oba korištena soja životinja očitanih od dvoje nezavisnih istraživača. Analiza vrijednosti segmentacije ipsilateralne hemisfere za oba soja pokazuje da nema značajne razlike između izmjerenih vrijednosti oba istraživača ($p=0.628$) te pokazuje značajnu podudarnost ($R^2= 0.905$) u izmjerenim vrijednostima (Slika 3.). Analiza vrijednosti segmentacije kontralateralne hemisfere za oba soja pokazuje također da nema

značajne razlike između izmjerenih vrijednosti ($p=0.764$) uz pokazanu značajnu podudarnost ($R^2= 0.939$; Slika 3.). Razlika u izmjerenim vrijednostima za sve mjerene vrijednosti oba istraživača iznosila je oko 1%.



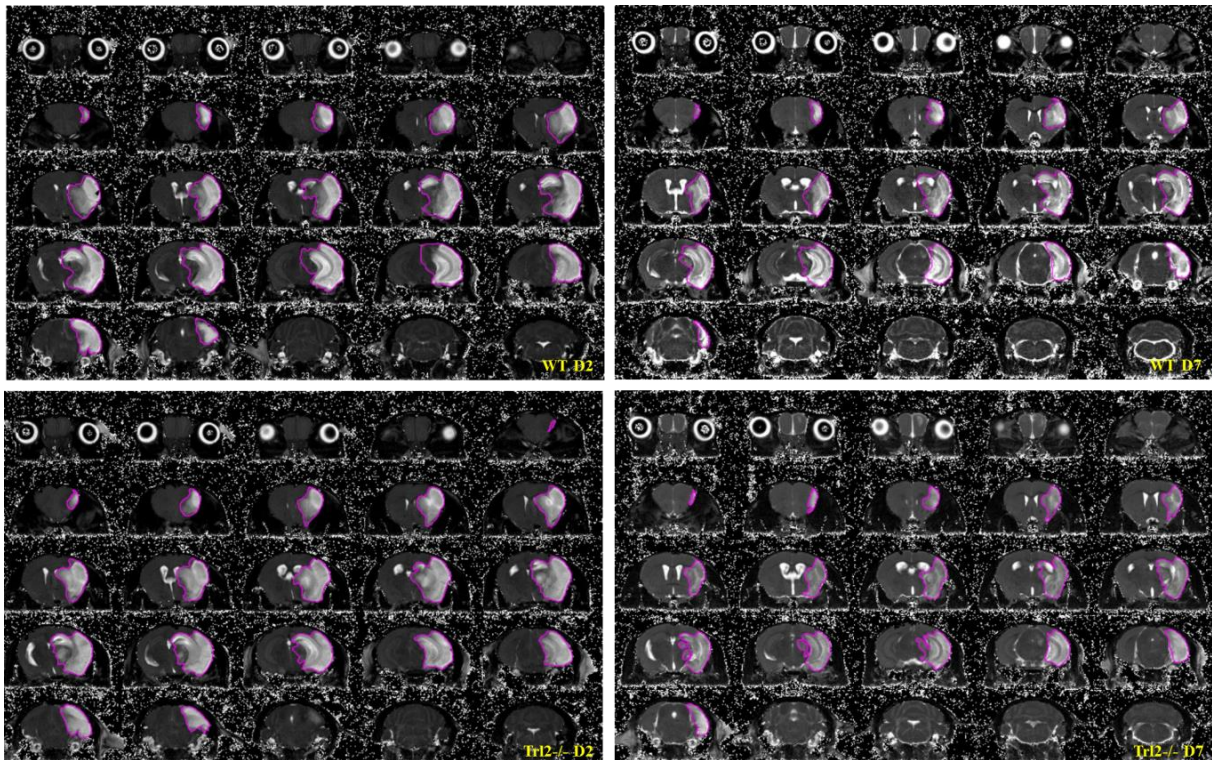
Slika 2 Primjeri T2 slika prikazuju ručno ocrtanu zdravu ipsilateralnu i kontralateralnu hemisferu kontrolnog miša divljeg tipa (WT) i testnog miša sa onemogućenim *Tlr2* genom (*Tlr2*^{-/-}) snimljenih 7 dana prije izazivanja ishemijskog oštećenja (BL – engl. baseline).



Slika 3 Usporedbe očitanih segmentacija za ipsilateralnu (IL) i kontralateralnu (CL) hemisferu prije izazivanja ishemijskog oštećenja (BL – engl. baseline), za ishemijsku leziju (SA – engl. stroke area) dva dana nakon MCAO-a, te za volumen IL hemisfere 28 dana nakon MCAO-a, (D28) pokazuje značajnu podudarnost u izmjerenim vrijednostima dvoje nezavisnih istraživača.

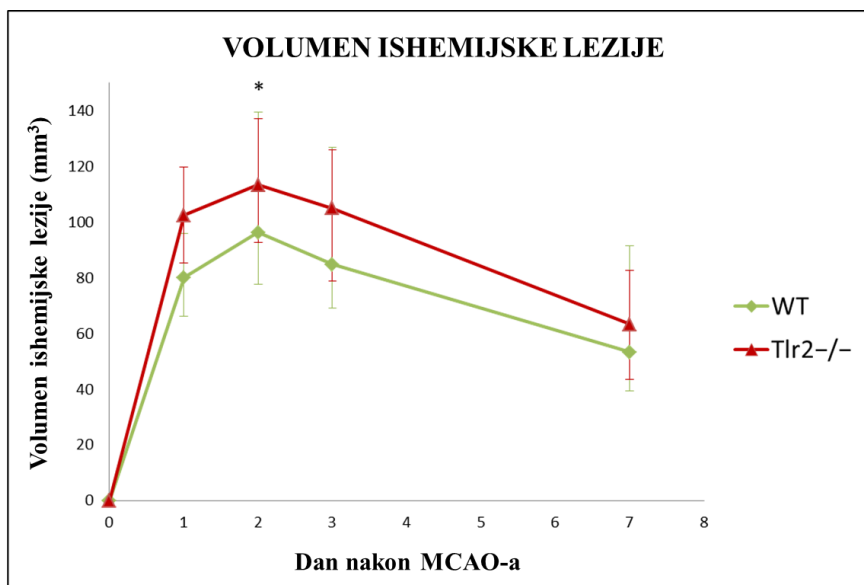
Oštećenje koje nastaje zbog začepjenja srednje moždane arterije (MCA) ubrzano se razvija te lezija u 24 sata nakon MCAO-a zahvaća čitavo područje irigacije MCA, koru velikog mozga i strijatum. Volumen ishemijskog oštećenja mjereno je na slikama T2 mapa na kojima se vidi

bolji kontrast područja zahvaćenog vazogenim edemom, vidljivog i kao svjetlije hiperintenzivno područje na T2 slikama (Slika 4.). T2 mape koriste se za kvantitativno mjerenje vremena T2-relaksacije u svakom vokselu, no iako daju slike manje rezolucije i slabijeg kontrasta u medijanoj liniji mozga, omogućavaju pritom lako mjerenje područja zahvaćenog edemom do sedmog dana nakon MCAO-a (Slika 4.). Analiza vrijednosti segmentacije ishemijske lezije za oba soja pokazuje da nema značajne razlike u izmjenjenim vrijednostima oba nezavisna istraživača ($p=0.920$) te da pokazuju značajnu podudarnost ($R^2= 0.999$; Slika 3.).



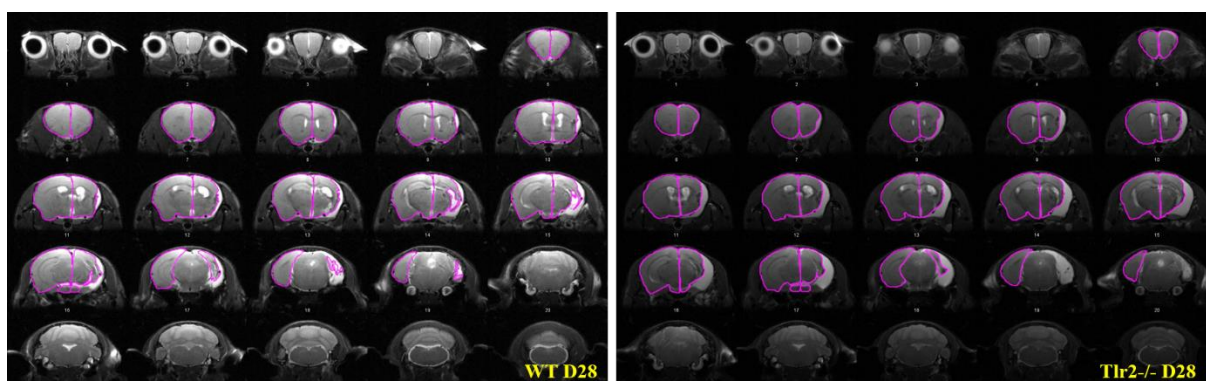
Slika 4 Reprezentativne T2 mape mozga miša divljeg tipa (WT) i miša sa onemogućenim *Tlr2* genom (*Tlr2*^{-/-}) dva (D2) i sedam (D7) dana nakon izazivanja oštećenja (MCAO) prikazuju hiperintenzivno područje ishemijske lezije i način obilježavanja oštećenog područja. U akutnoj fazi (D2) hiperintenzivno područje vidljivo na T2 slikama prikazuje područje zahvaćeno vazogenim edemom. Sedam dana nakon MCAO-a rezolucijom moždanog edema smanjuje se hiperintenzivno područje vidljivo na T2 slikama.

Volumen ishemijske lezije za oba soja bio je najveći drugi dan nakon MCAO-a, pri čemu su testni *Tlr2*^{-/-} miševi imali značajno veći volumen oštećenja od kontrolnih WT životinja (Slika 5.). Nakon drugog dana postupnom rezolucijom edema volumen lezije se smanjio za obje skupine, izjednačavajući se u vrijednosti prema 7. danu nakon MCAO-a (Slika 5.).



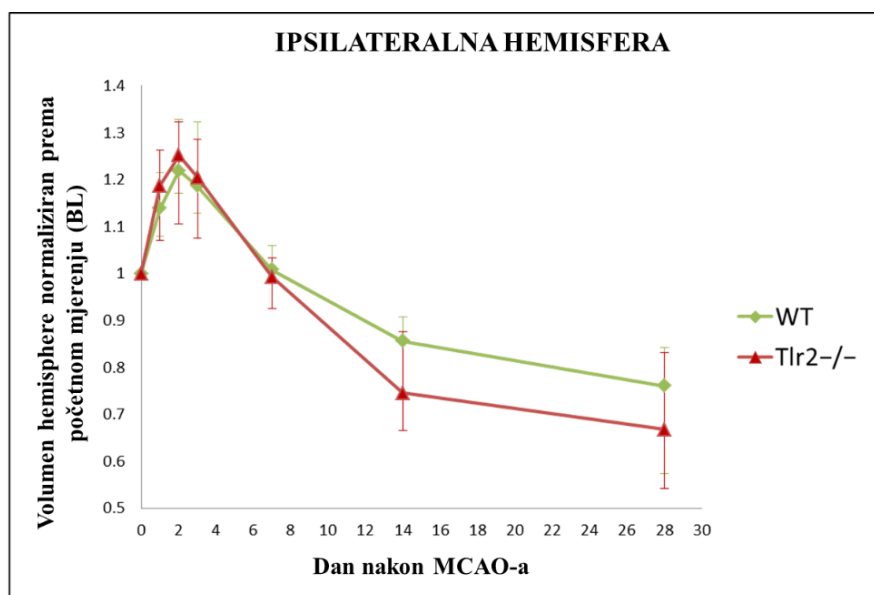
Slika 5 Procjena volumena ishemijskog oštećenja magnetskom rezonancijom nakon izazivanja ishemijskog oštećenja u miševa divljeg tipa (WT) i miševa s onemogućenim *Tlr2* genom (*Tlr2*^{-/-}). Volumen ishemijskog oštećenja značajno je veći kod miševa s onemogućenim *Tlr2* genom dva dana nakon izazivanja oštećenja (* $p > 0.05$).

Kako u kroničnoj fazi ishemijskog moždanog udara dolazi do nekroze, fagocitoze, reorganizacije preostalog tkiva najčešće u obliku astroglijalnog ožiljka, unilateralnog ili globalnog proširenja lateralnog ventrikula uz formacije cisti, korištenje T2 mape se ne može koristiti za mjerenje volumena ishemijske lezije. Zbog masivnih promjena u zahvaćenoj ipsilateralnoj hemisferi rezoluciju ishemijske lezije u kasnijim vremenskim točkama 14 i 28 dana nakon MCAO-a mjerimo kao ostatak vijabilnog tkiva na T2 slikama (Slika 6.). Analiza vrijednosti segmentacije ipsilateralne hemisfere za oba soja pokazuje da nema značajne razlike u izmjenjenim vrijednostima za oba istraživača ($p = 0.995$) te da pokazuju značajnu podudarnost ($R^2 = 0.998$; Slika 3.).

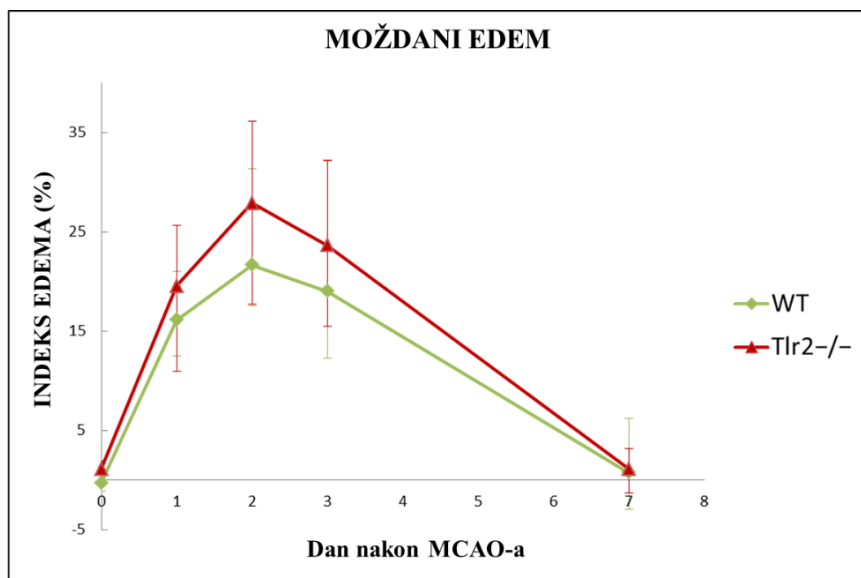


Slika 6 Reprezentativne T2-ponderirane slike mozga miša divljeg tipa (WT) i miša sa onemogućenim *Tlr2* genom (*Tlr2*^{-/-}) 28 dana nakon izazivanja ishemijskog oštećenja (D28). Lijevo ocrtano područje prikazuje zdravu kontralateralnu hemisferu, dok desno ocrtano područje prikazuje oštećenu ipsilateralnu hemisferu koja se značajno smanjila kod obje istraživane skupine.

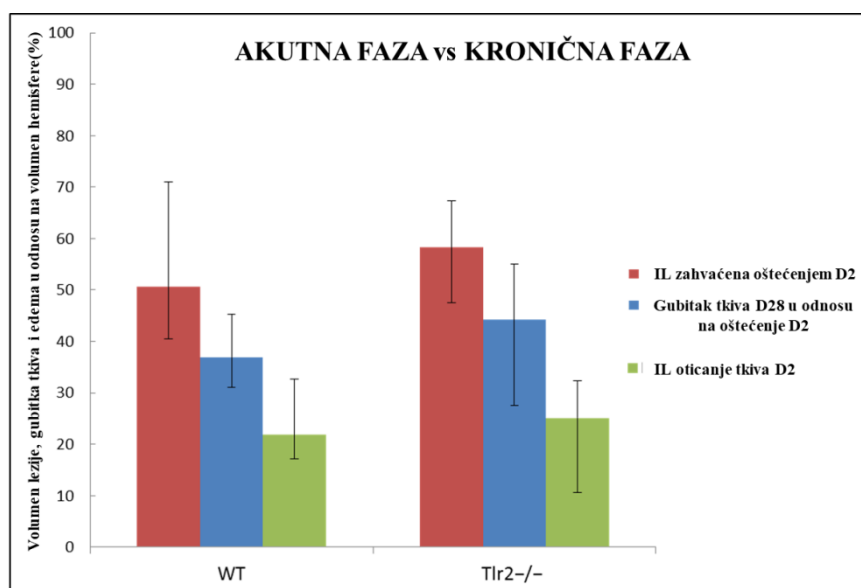
U akutnoj fazi nakon izazivanja ishemijskog oštećenja pratimo rast oštećene ipsilateralne hemisfere do drugog dana nakon MCAO-a (Slika 7.), što se poklapa i s trenutkom maksimalnog moždanog edema (Slika 8.) kod obje istraživane skupine, s nešto izraženijim povećanjem ipsilateralne hemisfere i edemom na drugi dan za *Tlr2*^{-/-} (Slike 7. i 8.). Nakon 14 dana vidljiv je značajan gubitak tkiva ipsilateralne hemisfere kod obje skupine životinja, koji se nastavlja 28 dana nakon MCAO-a, i to izraženije za testnu *Tlr2*^{-/-} skupinu životinja (Slika 7.). U akutnoj fazi *Tlr2*^{-/-} miševi pokazuju veći postotak ipsilateralne (IL) hemisfere zahvaćen ishemijskim oštećenjem (SA), posljedično izraženije povećanje ipsilateralne hemisfere, te u kroničnoj fazi veći postotak gubitka tkiva od WT miševa (Slika 9.).



Slika 7 . Longitudinalna procjena volumena ipsilateralne hemisfere (IL) magnetskom rezonancijom nakon izazivanja ishemijskog oštećenja u miševa divljeg tipa i miševa s onemogućenim *Tlr2* genom (*Tlr2*^{-/-}). Volumen hemisfere normaliziran prema početnoj vrijednosti izmjerenoj prije izazivanja oštećenja prikazuje povećanje volumena u akutnoj fazi nakon izazivanja oštećenja, za kojim slijedi značajan gubitak tkiva od 14. dana nakon izazivanja oštećenja.

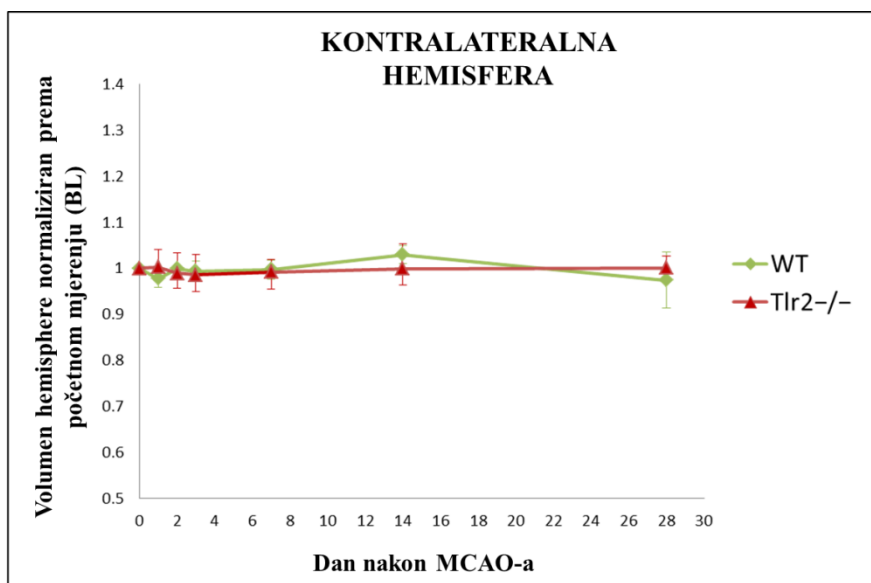


Slika 8 Postotak moždanog edema mjereno magnetskom rezonancijom nakon izazivanja ishemijskog oštećenja u miševa divljeg tipa (WT) i miševa s onemogućenim *Tlr2* genom (*Tlr2*^{-/-}) prikazuje značajno povećanje ipsilateralne hemisfere u obje skupine miševa u prva tri dana nakon izazivanja oštećenja.



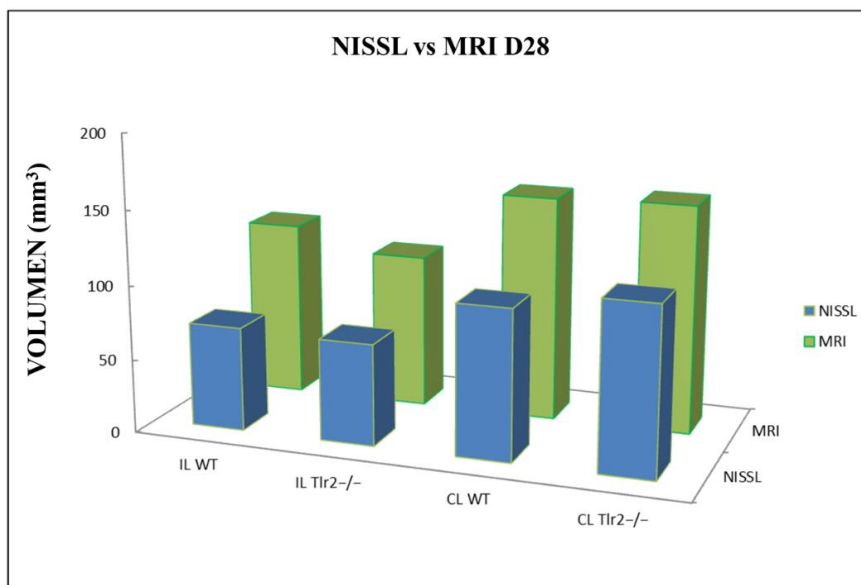
Slika 9 Procjena volumena ipsilateralne hemisfere (IL), gubitka tkiva i edema magnetskom rezonancijom nakon izazivanja ishemijskog oštećenja u miševa divljeg tipa (WT) i miševa s onemogućenim *Tlr2* genom (*Tlr2*^{-/-}). U akutnoj fazi *Tlr2*^{-/-} miševi pokazuju veći postotak ipsilateralne hemisfere zahvaćen ishemijskim oštećenjem (SA) te u kroničnoj fazi veći postotak gubitka tkiva od WT miševa.

Kontralateralna, nezahvaćena hemisfera ostaje uz manje oscilacije u volumenu nepromijenjena u obje skupine životinja (Slika 10.).

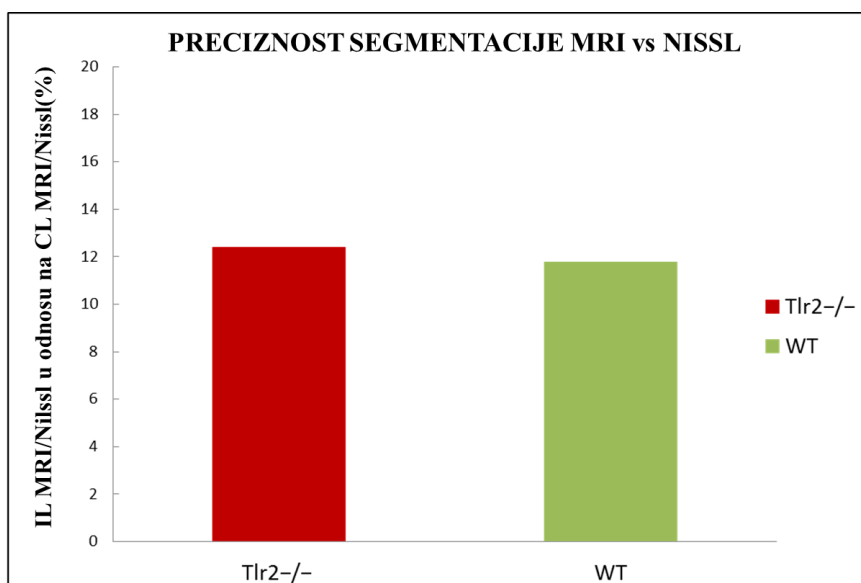


Slika 10. Longitudinalna procjena volumena kontralateralne hemisfere magnetskom rezonancijom nakon izazivanja ishemijskog oštećenja u miševa divljeg tipa (WT) i miševa s onemogućenim *Tlr2* genom (*Tlr2*^{-/-}). Volumen hemisfere normaliziran prema početnoj vrijednosti izmjerenoj prije izazivanja oštećenja ne pokazuje značajne promjene tijekom čitavog vremena praćenja nakon izazivanja oštećenja.

Kako bi što vjernije segmentirali promjene vidljive na magnetskoj rezonanciji 28 dana nakon izazivanja oštećenja, mozgovi su izolirani, izrezani i bojeni Nisslom, koji također omogućava volumetrijsku analizu histološki obrađenog tkiva nakon ishemijskog oštećenja. Usporedbom volumena izmjerenih MR-om i serijskih rezova bojenih Nisslom, uočen je očekivano manji volumen ipsilateralne i kontralateralne hemisfere na serijskim rezovima bojenima Nisslom (Slika 11.) Međutim, fiksacija i dehidracija tkiva nije samo utjecala na sažimanje tkiva već i na gubitak razlike između testne i kontrolne skupine izmjerene na MR-u (Slika 11.). Uočena razlika u volumetrijskom mjerenju MR-om i Nisslom prikazuje da postoji razlika od 12% u mjerenju ipsilateralne hemisfere u odnosu na kontralateralnu hemisferu ukazujući na drugačiji učinak fiksacije i dehidracije na oštećenu hemisferu u odnosu na zdravu hemisferu (Slika 12.).



Slika 11 Usporedba volumena ipsilateralne (IL) i kontralateralne (CL) hemisfere mjenjenih magnetskom rezonancijom (MRI) i histološkim rezovima bojenim Nisslom 28 dana nakon ishemijskog oštećenja prikazuje gubitak značajne razlike među ispitanim skupinama u IL hemisferi za histološka *ex vivo* mjerenja, a koju uočavamo mjerenjem *in vivo* na magnetskoj rezonanciji.



Slika 12 Usporedba segmentacije ipsilateralne (IL) i kontralateralne (CL) hemisfere magnetskom rezonancijom i na histološkim rezovima bojenim Nisslom prikazuje da postoji razlika od 12% u mjerenju IL hemisfere u odnosu na CL hemisferu ukazujući na drugačiji učinak fiksacije i dehidracije na oštećenu hemisferu u odnosu na zdravu.

5. RASPRAVA

Usklađivanje životinjskih modela moždanog udara s kliničkim istraživanjima zahtjeva rigorozan dizajn samih pokusa koji pritom mora zadovoljavati STAIR (prema engl. *Stroke Therapy Academic Industry Roundtable*) kriterije (Rewell *i sur.*, 2017). Ti kriteriji uključuju dosljednost u uspješnoj indukciji moždanog udara i veličini lezije te dugotrajno praćenje životinja koristeći višestruka mjerenja na pojedinačnim životinjama. Kako ne postoji jedinstvena metoda analize ishemijske lezije u mišjem modelu moždanog udara praćenog magnetskom rezonancijom, kojom bismo longitudinalno pratili evoluciju, progresiju i rezoluciju ishemijskog oštećenja, ovim smo radom uspostavili Zagrebački pristup standardizirane manualne segmentacije i pritom vrednovali naš pristup usporedbom miševa s onemogućenim *Tlr2* genom i miševa divljeg tipa.

Izvještavanje o smrtnosti jedna je od ključnih razlika u mjerama ishoda između kliničkih i bazičnih istraživanja, pri čemu se ishod kliničkog liječenja često procjenjuje smanjenjem smrtnosti, dok se u bazičnim istraživanjima rijetko izvještava o smrtnosti (Banks i Marotta, 2007; Sicard i Fisher, 2009; Turner, Jickling i Sharp, 2011). Korišteni životinjski model MCAO daje leziju varijabilne veličine koja je u skladu sa varijabilnošću moždanog udara kod ljudi (Bahmani *i sur.*, 2011; Adamczak *i sur.*, 2014). Preoperativnom i postoperativnom skrbi maksimizirano je preživljavanje životinja. Sposobnost održavanja životinja do mjesec dana nakon moždanog udara, sa smrtnosti ograničenom samo na akutnu fazu, u potpunosti je u skladu sa humanim podacima koji pokazuju 28% smrtnosti unutar 28 dana od moždanog udara (Macleod, 2010).

Neke od većih izazova u segmentaciji moždanog udara eksperimentalnim MR-om čine lezije različitih veličina i oblika, niska rezolucija slike u usporedbi sa slikama dobivenim kliničkim MR-om, fluktuacija u dobivenom kontrastu te značajne moždane promjene kako u asimetriji tako i u veličini i reorganizaciji moždanih struktura (Brønnum-Hansen, Davidsen i Thorvaldsen, 2001). Zagrebačkim pristupom segmentacije evolucija ishemijskog oštećenja može se uspješno segmentirati u svim mjerenim vremenskim točkama koristeći slike T2 snimki i T2 mapa. Naš pristup segmentacije sadržava jednostavan automatski sustav za prijenos i konverziju podataka s MR-a u formate pogodne za analizu. Također, omogućava jednostavno ocrtavanje zahvaćenog područja koristeći makronaredbe i tipkovničke prečace FIJI programa što ubrzava sam proces segmentacije. Držeći se jasno definiranih smjernica za segmentaciju, kako u akutnoj fazi, tako i u kroničnoj fazi nakon izazivanja ishemijske ozljede, poboljšana je dosljednost među istraživačima uključenima u proces analize. Zagrebačkim pristupom smanjili smo mogućnost pogrešaka tijekom ili nakon ocrtavanja i broj koraka potrebnih za obradu podataka te povećali sljedivost specifičnom pohranom i imenovanjem podataka, kao i brzinu

uočavanja mogućih pogrešaka u samoj segmentaciji. Iako trenutno postoji nekoliko objavljenih metoda koje koriste automatske algoritme za određivanje veličine ishemijske lezije, većina je napravljena za štakore te sve omogućavaju praćenje promjena samo u akutnoj fazi nakon moždanog udara (Mulder *i sur.*, 2017). Kako se automatske metode temelje na korištenju više različitih modaliteta snimanja i zahtijevaju više stupnjeva pretvorbe podataka koristeći kompleksne algoritme to ih čini osjetljivijima na pogreške. Pogreške prvenstveno proizlaze iz poravnanja sa širenjem oznaka ili s anatomskim atlasima koji su napravljeni na *ex vivo* mozgovima kod kojih se ne uzima u obzir promjena u veličini mozga zbog fiksacije životinje. Pogreške u prvom koraku poravnanja se potom prenose na sve ostale korake. Iako će se poboljšanjem automatskih metoda ubrzati sam proces analize i smanjiti pogreške u preciznosti, trenutno nijedna metoda ne može postići performanse usporedive s onima istreniranog stručnjaka. Pažljivim postavljanjem kriterija za analizu smanjuju se moguća odstupanja u segmentaciji te dovodi do objektivnije kvantifikacije.

Koristeći Zagrebački pristup segmentaciji uspješno smo odredili volumene hemisfera, lezije i gubitak tkiva ipsilateralne hemisfere, kako za kontrolnu skupinu životinja divljeg tipa, tako i za životinje s onemogućenim *Tlr2*^{-/-} genom, u svim istraživanim vremenskim točkama. Također, ova metoda, iako korištena na malom broju životinja, omogućila je razlikovanje testne od kontrolne skupine životinja, kod kojih vidimo značajno veću ishemijsku ozljedu u akutnoj fazi nakon moždanog udara, što se odrazilo i na veći moždani edem. Osim promjena vidljivih u akutnoj fazi nakon moždanog udara, korišteni Zagrebački pristup segmentacije omogućio nam je praćenje promjena u kroničnoj fazi, u kojoj možemo uočiti razlike u gubitku ipsilateralnog tkiva prominentnije za životinje s onemogućenim *Tlr2* genom.

Vrednovanjem segmentacije kronične faze moždanog udara na magnetskoj rezonanciji u usporedbi sa segmentacijom na histološkim rezovima bojenim Nisslom pokazan je dobro poznat učinak sažimanja tkiva prilikom fiksacije i dehidracije tkiva, zbog čega su ukupni volumeni svih mjerenih vrijednosti na *ex vivo* uzorcima i do 60% manji u odnosu na *in vivo* mjerenja. Dužina fiksacije i sama jačina fiksacije imaju najveći utjecaj na promjenu volumena izoliranog mišjeg mozga (Mouritzen Dam, 1979). Međutim, osim sažimanja tkiva, lomljenje i gubitak tkiva prilikom rezanja znatno otežavaju sam postupak segmentacije i volumetrije. Prilikom usporedbe volumetrijske analize uočeno je da je učinak fiksacije i dehidracije tkiva drugačiji na zdravo moždano tkivo u odnosu na tkivo zahvaćeno ishemijskom ozljedom, što je utjecalo i na razlike u izmjerenim vrijednostima hemisfera. Razlike u omjeru volumena ipsilateralne i kontralateralne hemisfere izmjerenih MR-om i Nisslom tolike su da se razlika između testne i kontrolne skupine miševa u potpunosti gubi. Ova činjenica ukazuje na potrebu razmatranja metoda koje se koriste za analizu pojedinačnih vremenskih točaka te na prednosti korištenja opreme koja omogućava longitudinalno *in vivo* snimanje životinja.

6. ZAKLJUČCI

1. Zagrebačkim pristupom manualne segmentacije moždanih hemisfera i ishemijske lezije mišjih mozgova uspjeli smo razlikovati miševa s onemogućenim *Trl2*-/- genom i kontrolnu skupinu miševa divljeg tipa.
2. Volumen ishemijske lezije te gubitak tkiva ipsilateralne hemisfere su u svim vremenskim točkama izraženiji u testnoj skupini *Trl2* -/- miševa u usporedbi s kontrolnom WT skupinom.
3. Dokazali smo da fiksacija i dehidracija tkiva utječu na sažimanje tkiva, ali i da imaju drugačiji učinak na zdravo moždano tkivo u odnosu na tkivo zahvaćeno ishemijskom ozljedom.
4. Zagrebačkim pristupom segmentacije može se uspješno segmentirati evolucija ishemijskog oštećenja u svim mjerenim vremenskim točkama, koristeći slike T2 snimki i T2 mapa magnetske rezonancije, uz značajnu podudarnost nezavisnih istraživača.

7. ZAHVALE

Veliku zahvalnost dugujemo mentorici, doc. dr. sc. Marini Radmilović, koja nas je, svojim stručnim savjetima, mladenačkim elanom i nesebičnom podrškom, vodila na putu od oblikovanja same ideje znanstvenog rada pa sve do njegove realizacije.

Zahvaljujemo dr. sc. Siniši Škokiću na stručnom vođenju kroz zahtjevno područje eksperimentalne magnetske rezonancije i analize slika.

Hvala asistentici Heleni Justić, mag. exp. biol., na prijateljskim savjetima, zavidnoj strpljivosti i vječnom optimizmu.

Na kraju, hvala našim obiteljima koje su tijekom zadnjih nekoliko mjeseci naučile sve o izgledu mišjeg mozga na magnetskoj rezonanciji, a bez čije bismo potpore teško došli do kraja ovog dugog puta stvaranja znanstvenog rada.

8. POPIS LITERATURE

- Adamczak, J. M. *i sur.* (2014.) 'In vivo bioluminescence imaging of vascular remodeling after stroke', *Frontiers in cellular neuroscience*. Frontiers Media S.A., 8, str. 274. doi: 10.3389/fncel.2014.00274.
- Alaverdashvili, M., Paterson, P. G. i Bradley, M. P. (2015.) 'Laser system refinements to reduce variability in infarct size in the rat photothrombotic stroke model', *Journal of neuroscience methods*. 2015/04/01, 247, str. 58–66. doi: 10.1016/j.jneumeth.2015.03.029.
- Amantea, D. *i sur.* (2014.) 'Understanding the Multifaceted Role of Inflammatory Mediators in Ischemic Stroke', *Current Medicinal Chemistry*, str. 2098–2117. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/0929867321666131227162634>.
- Bahmani, P. *i sur.* (2011.) 'Visualization of cell death in mice with focal cerebral ischemia using fluorescent annexin A5, propidium iodide, and TUNEL staining', *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2011/01/19. Nature Publishing Group, 31(5), str. 1311–1320. doi: 10.1038/jcbfm.2010.233.
- Banks, J. L. i Marotta, C. A. (2007.) 'Outcomes Validity and Reliability of the Modified Rankin Scale: Implications for Stroke Clinical Trials', *Stroke*. American Heart Association, 38(3), str. 1091–1096. doi: 10.1161/01.STR.0000258355.23810.c6.
- Benjamin, E. J. *i sur.* (2018.) *Heart disease and stroke statistics - 2018 update: A report from the American Heart Association*, *Circulation*. doi: 10.1161/CIR.0000000000000558.
- Bohacek, I. *i sur.* (2012.) 'Toll-like receptor 2 deficiency leads to delayed exacerbation of ischemic injury', *Journal of neuroinflammation*. BioMed Central, 9, str. 191. doi: 10.1186/1742-2094-9-191.
- Brønnum-Hansen, H., Davidsen, M. i Thorvaldsen, P. (2001.) 'Long-Term Survival and Causes of Death After Stroke', *Stroke*. American Heart Association, 32(9), str. 2131–2136. doi: 10.1161/hs0901.094253.
- CAMARADES (Collaborative Approach to Meta-Analysis and Review of Animal Data from Experimental Studies)* (2014.) Dostupno na: <http://www.dcn.ed.ac.uk/camarades/default.htm> (Pristupljeno: 01.04. 2019.).
- Caplan, L. R. (1991.) 'Diagnosis and Treatment of Ischemic Stroke', *JAMA*, 266(17), str. 2413–2418. doi: 10.1001/jama.1991.03470170101032.
- Dijkhuizen, R. M. i Nicolay, K. (2003.) 'Magnetic Resonance Imaging in Experimental Models of Brain Disorders', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. SAGE Publications Ltd STM, 23(12), str. 1383–1402. doi: 10.1097/01.WCB.0000100341.78607.EB.
- Dirnagl, U., Iadecola, C. i Moskowitz, M. A. (1999.) 'Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view', *Trends in Neurosciences*. Elsevier, 22(9), str. 391–397. doi: 10.1016/S0166-2236(99)01401-0.
- Dobrovojević, M., Špiranec, K. i Sindić, A. (2014.) 'Involvement of bradykinin in brain edema development after ischemic stroke', *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 467(2), str. 201–212. doi: 10.1007/s00424-014-1519-x.
- Doyle, K. P., Simon, R. P. i Stenzel-Poore, M. P. (2008.) 'Mechanisms of ischemic brain damage', *Neuropharmacology*. 2008/01/25, 55(3), str. 310–318. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.01.005.
- Durukan, A. i Tatlisumak, T. (2007.) 'Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia', *Pharmacology*

Biochemistry and Behavior, 87(1), str. 179–197. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2007.04.015>.

Garcia, J. H. *i sur.* (1994.) 'Brain microvessels: factors altering their patency after the occlusion of a middle cerebral artery (Wistar rat)', *The American journal of pathology*, 145(3), str. 728–740. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8080052>.

Ghosh, N. *i sur.* (2012.) 'Automated core-penumbra quantification in neonatal ischemic brain injury', *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2012/08/29. Nature Publishing Group, 32(12), str. 2161–2170. doi: 10.1038/jcbfm.2012.121.

Ghosh, N. *i sur.* (2014.) 'Automated detection of brain abnormalities in neonatal hypoxia ischemic injury from MR images', *Medical image analysis*. 2014/05/16, 18(7), str. 1059–1069. doi: 10.1016/j.media.2014.05.002.

González, R. G. (2006.) 'Imaging-Guided Acute Ischemic Stroke Therapy: From "Time Is Brain" to "Physiology Is Brain"', *American Journal of Neuroradiology*, 27(4), str. 728 LP – 735. Dostupno na: <http://www.ajnr.org/content/27/4/728.abstract>.

Hemorrhagic stroke – National Stroke Association. (2019.) Dostupno na: <https://www.stroke.org/understand-stroke/what-is-stroke/hemorrhagic-stroke/> (Pristupljeno: 30.03.2019.).

Hua, F. *i sur.* (2009.) 'Differential roles of TLR2 and TLR4 in acute focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice', *Brain research*. 2009/01/22, 1262, str. 100–108. doi: 10.1016/j.brainres.2009.01.018.

Jacobs, M. *i sur.* (2001.) 'A Model for Multiparametric MRI Tissue Characterization in Experimental Cerebral Ischemia With Histological Validation in Rat : Part 1', *Stroke*, 32(4), str. 943–949. Dostupno na: <http://stroke.ahajournals.org/cgi/content/abstract/32/4/943>.

Jickling, G. C. *i sur.* (2014.) 'Hemorrhagic transformation after ischemic stroke in animals and humans', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. SAGE Publications, 34(2), str. 185–99. doi: 10.1038/jcbfm.2013.203.

Jin, R., Yang, G. i Li, G. (2010.) 'Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells', *Journal of leukocyte biology*. 2010/02/03. The Society for Leukocyte Biology, 87(5), str. 779–789. doi: 10.1189/jlb.1109766.

Kamel, H. i Iadecola, C. (2012.) 'Brain-immune interactions and ischemic stroke: clinical implications', *Archives of neurology*, 69(5), str. 576–581. doi: 10.1001/archneurol.2011.3590.

Kono, H. i Rock, K. L. (2008.) 'How dying cells alert the immune system to danger', *Nature reviews. Immunology*. 2008/03/14, 8(4), str. 279–289. doi: 10.1038/nri2215.

Lehnardt, S. *i sur.* (2007.) 'Toll-like receptor 2 mediates CNS injury in focal cerebral ischemia.', *Journal of neuroimmunology*. Elsevier, 190(1–2), str. 28–33. doi: 10.1016/j.jneuroim.2007.07.023.

Macleod, M. (2010.) 'How to avoid bumping into the translational roadblock', in Dirnagl, U. (ed.) *Rodent Models of Stroke*, str. 7–15. doi: 10.1007/978-1-60761-750-1.

Marc, F. *i sur.* (2009.) 'Update of the Stroke Therapy Academic Industry Roundtable Preclinical Recommendations', *Stroke*. American Heart Association, 40(6), str. 2244–2250. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.541128.

Metscher, B. D. (2009.) 'MicroCT for comparative morphology: simple staining methods allow high-contrast 3D imaging of diverse non-mineralized animal tissues', *BMC Physiology*, 9(1), str. 11. doi: 10.1186/1472-6793-9-11.

Miyazawa, T. *i sur.* (2003.) 'Effect of mild hypothermia on focal cerebral ischemia. Review of

- experimental studies', *Neurological Research*. Taylor & Francis, 25(5), str. 457–464. doi: 10.1179/016164103101201850.
- Mouritzen Dam, A. (1979.) *Shrinkage of the brain during histological procedures with fixation in formadehyde solutions of different concentrations*, *Journal für Hirnforschung*.
- Moždani udar – Wikipedija. (2018.) Dostupno na: https://hr.wikipedia.org/wiki/Moždani_udar (Pristupljeno: 01.04.2019.).
- Mulder, I. A. i sur. (2017.) 'Automated Ischemic Lesion Segmentation in MRI Mouse Brain Data after Transient Middle Cerebral Artery Occlusion', *Frontiers in neuroinformatics*. Frontiers Media S.A., 11, str. 3. doi: 10.3389/fninf.2017.00003.
- Nishimura, M. C. i sur. (2011.) 'Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination.', *Stroke*, 17(3), str. 472–476. doi: 10.1161/01.str.17.3.472.
- Osborne, K. A. i sur. (1987.) 'Quantitative assessment of early brain damage in a rat model of focal cerebral ischaemia', *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 50(4), str. 402–410. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3585350>.
- Phelan, C. M. i sur. (2017.) 'Identification of 12 new susceptibility loci for different histotypes of epithelial ovarian cancer', *Nature genetics*. 2017/03/27, 49(5), str. 680–691. doi: 10.1038/ng.3826.
- 'Recommendations for Standards Regarding Preclinical Neuroprotective and Restorative Drug Development' (1999.) *Stroke*. American Heart Association, 30(12), str. 2752–2758. doi: 10.1161/01.STR.30.12.2752.
- Rewell, S. S. J. i sur. (2017.) 'Evolution of ischemic damage and behavioural deficit over 6 months after MCAo in the rat: Selecting the optimal outcomes and statistical power for multi-centre preclinical trials', *PLoS one*. Public Library of Science, 12(2), str. e0171688–e0171688. doi: 10.1371/journal.pone.0171688.
- Schellinger, P. D. i sur. (2012.) 'Assessment of Additional Endpoints for Trials in Acute Stroke – What, When, Where, in Who?', *International Journal of Stroke*. SAGE Publications, 7(3), str. 227–230. doi: 10.1111/j.1747-4949.2012.00773.x.
- Sicard, K. M. i Fisher, M. (2009.) 'Animal models of focal brain ischemia', *Experimental & translational stroke medicine*. BioMed Central, 1, str. 7. doi: 10.1186/2040-7378-1-7.
- Spratt, N. J. i sur. (2006.) 'Modification of the method of thread manufacture improves stroke induction rate and reduces mortality after thread-occlusion of the middle cerebral artery in young or aged rats', *Journal of Neuroscience Methods*, 155(2), str. 285–290. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.01.020>.
- Turner, R. J., Jickling, G. C. i Sharp, F. R. (2011.) 'Are Underlying Assumptions of Current Animal Models of Human Stroke Correct: from STAIRs to High Hurdles?', *Translational Stroke Research*, 2(2), str. 138–143. doi: 10.1007/s12975-011-0067-3.
- Wang, Y., Ge, P. i Zhu, Y. (2013.) 'TLR2 and TLR4 in the brain injury caused by cerebral ischemia and reperfusion', *Mediators of inflammation*. 2013/06/23. Hindawi Publishing Corporation, 2013, str. 124614. doi: 10.1155/2013/124614.
- Ziegler, G. i sur. (2007.) 'TLR2 has a detrimental role in mouse transient focal cerebral ischemia', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 359(3), str. 574–579. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.05.157>.

9. SAŽETAK

Zagrebački pristup standardizirane manualne segmentacije ishemijske ozljede mišjeg mozga snimljenog magnetskom rezonancijom

Nika Filipović, Pavao Mioč

Moždani udar je treći najčešći uzrok smrti i najčešći uzrok invalidnosti u razvijenim zemljama. U pretkliničkim istraživanjima, uz sve suvremene modalitete oslikavanja, histologija se i dalje koristi kao zlatni standard određivanja veličine ishemijske lezije. Međutim, histološke metode zahtijevaju žrtvovanje životinja u pojedinim vremenskim točkama, po prirodi su dvodimenzionalne i zahtijevaju dugotrajnu pripremu tkiva. Opći cilj ovog rada bio je uspostaviti standardiziranu metodu segmentacije događaja koji slijede nakon ishemijske ozljede mozga miševa, snimljenih magnetskom rezonancijom, kojom bi se razlikovala testna skupina miševa s onemogućenim *Tlr2* genom (*Tlr2*^{-/-}) od kontrolne skupine miševa divljeg tipa (WT). Ukupno 24 miša podvrgnuta su operaciji okluzije srednje moždane arterije. Promjene na mozgu su longitudinalno snimane magnetskom rezonancijom. Mozgovi su segmentirani tehnikom ručnog ocrtavanja ipsilateralne i kontralateralne hemisfere te ishemijske lezije. Volumetrijska analiza u zadnjoj vremenskoj točki uspoređena je s histološkim preparatima bojenima prema Nisslu. Zagrebačkim pristupom manualne segmentacije pokazano je da *Tlr2*^{-/-} skupina ima veći volumen lezije u akutnoj fazi te izraženiji gubitak tkiva ipsilateralne hemisfere u kroničnoj fazi. Pokazana je razlika u volumetrijskom mjerenju MR-om i Nisslom. Reproducibilnost metode potvrđena je razlikom u mjerenim vrijednostima oba istraživača od oko 1%. Ovim radom uspostavljen je Zagrebački pristup standardizirane manualne segmentacije ishemijske ozljede mišjeg mozga.

Ključne riječi: ishemijski moždani udar, magnetska rezonancija, segmentacija

10. SUMMARY

A standardized Zagreb approach for manual segmentation of mouse brain ischemic injury using magnetic resonance imaging

Nika Filipović, Pavao Mioč

Stroke is the third leading cause of death and the most common cause of disability in Western world. In preclinical studies, despite all modern imaging methods, histology is still the golden standard for determining the size of ischemic lesion. However, histological methods are two-dimensional, require animal sacrifice at predefined time points and long-lasting tissue preparation. The aim of this study was to establish a standardized segmentation method for the events following ischemic brain injury in mice, using magnetic resonance imaging, which would allow differentiation of *Tlr2* knockout (*Tlr2*^{-/-}) test group from the wild type (WT) control group. In total, 24 mice underwent middle cerebral artery occlusion. Changes in the brain were monitored longitudinally with magnetic resonance imaging. Brain segmentation was performed by manual delineation of the ischemic lesion, ipsilateral and contralateral hemisphere. Volumetric analysis was compared to Nissl-stained histological sections. With the standardized Zagreb approach, we showed bigger lesion volume in the acute phase and more prominent ipsilateral tissue loss in the chronic phase for *Tlr2*^{-/-} group, a difference between volumetric measurement using MRI and histology, and about 1% interobserver measurement difference. With this study we established the standardized Zagreb approach for segmentation of ischemic mouse brain injury.

Key words: ischemic stroke, magnetic resonance, segmentation