

# Učinci pioglitazona u traumatskoj ozljedi mozga u štakora

---

Slavić, Ante

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:027712>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ante Slavić

**UČINCI PIOGLITAZONA U TRAUMATSKOJ OZLJEDI MOZGA U ŠTAKORA**

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ante Slavić

**UČINCI PIOGLITAZONA U TRAUMATSKOJ OZLJEDI MOZGA U ŠTAKORA**

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

Mentor rada: **izv. prof. dr. sc. Kristina Pilipović dr. med.**

Diplomski rad obranjen je dana 24. rujna 2019. na Medicinskom fakultetu u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Jasenka Mršić-Pelčić, dr.med.
2. Izv. prof. dr. sc. Kristina Pilipović, dr. med.
3. Doc. dr. sc. Tanja Čelić, dr.med.

Rad ima 56 stranica, 15 slika i 54 literaturna navoda.

*Prvenstveno se zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Kristini Pilipović, dr. med. na nesebičnom dijeljenju znanja, stalnoj dostupnosti, svim savjetima i pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada, jer bez nje ovaj rad ne bi bio ono što je.*

*Zahvaljujem se Maji Rukavini, mag. pharm. inv. zbog strpljenja i stalne dostupnosti za raspravu te neiscrpnom izvoru pozitivne energije tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se Tamari Janković, dipl. sanit. ing. i Marini Jakovac, med. lab. ing. na svim savjetima i pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se i svim ostalima na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci koji su na bilo koji način pridonijeli tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se svojim roditeljima, jer bez njih sve ovo ne bi bilo moguće.*

## **Sažetak**

U današnje vrijeme traumatska ozljeda mozga (TBI) jedan je od glavnih socioekonomskih i javnozdravstvenih problema. Zbog svoje velike smrtnosti i brojnih poteškoća nastalih od same ozljede, TBI je potrebno pridati više pažnje. U ovom radu je opisan utjecaj primjene pioglitazona na neurodegeneraciju i ekspresiju mikroglije u parijetalnom korteksu i hipokampusu te utjecaj na ekspresiju ciklooksigenaze-2 (COX-2), inducibilne oksidaze dušikovog oksida (iNOS) i proteina toplinskog šoka 70 (HSP70) u hipokampusu nakon TBI uzrokovane modelom lateralne ozljede tlakom tekućine (LPFI). Pioglitazon je primijenjen u dozi od 1 mg/kg 10 min i 12 h nakon indukcije TBI. Kontrolna grupa štakora je lažno operirana i primijenjeno im je otapalo. Štakori su dekapitirani 24 sata nakon TBI te su parijetalni korteks i hipokampus analizirani biokemijskim i histološkim metodama. Analize su pokazale da nakon TBI nastaju neurodegenerativne promjene u parijetalnom korteksu i dentatnom girusu (DG) hipokampusa, kao i značajna reakcija mikroglije u parijetalnom korteksu i svim ispitivanim dijelovima hipokampusa. U hipokampusu je zabilježena i povećana ekspresija COX-2 i HSP70. Pioglitazon je značajno smanjio broj Iba1 pozitivnih stanica u DG hipokampusa ozlijeđenih životinja, dok na ostale ispitivane parametre nije imao učinka. Ovim radom pokazano je da pioglitazon, primijenjen u dvije doze nakon TBI uzrokovane s LPFI, djeluje na posttraumastku reaktivnu mikrogliozu u određenim moždanim regijama, no točan mehanizam ovog djelovanja nije jasan te su potrebna daljnja istraživanja učinaka ovog lijeka u tretmanu TBI.

**Ključne riječi:** traumatska ozljeda mozga, pioglitazon, parametri upale, neurodegeneracija

## **Summary**

Today, traumatic brain injury (TBI) is one of the major socio-economic and public health issues. Due to its high mortality and the many difficulties caused by the injury itself, TBI needs more attention. This paper describes the effects of pioglitazone on the neurodegeneration and expression of microglia in the parietal cortex and hippocampus, and the effect on the expression of COX-2, iNOS, and HSP70 in the hippocampus, after TBI caused by lateral fluid pressure injury (LPFI) model. Pioglitazone was administered at a dose of 1 mg/kg 10 min and 12 h after TBI induction. The control group of rats was sham operated and the vehicle was administered instead of the drug. Rats were decapitated 24 hours after TBI and the parietal cortex and hippocampus were analyzed by biochemical and histological methods. Analyzes revealed that after TBI, neurodegeneration occurs in the parietal cortex and dentate gyrus (DG) of the hippocampus, as well as microglia reactions in the parietal cortex and all the tested areas of the hippocampus. Expressions of COX-2 and HSP70 in the hippocampus were significantly higher after brain trauma. Pioglitazone cause a reduction in the number of Iba1 positive cells in the DG hippocampus of the injured animals compared to vehicle-treated, injured rats. This work demonstrates that pioglitazone, administered at two doses after LPFI-induced TBI, can significantly reduce the number of Iba1 positive cells in certain brain regions, but the exact mechanism of this effect is not clear suggesting that further studies on this drug in the treatment of TBI are needed.

**Keywords:** traumatic brain injury, pioglitazone, parameters of inflammation, neurodegeneration.

## Sadržaj

<b>1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>1</b>
1.1. Općenito o traumatskoj ozljedi mozga .....	1
1.2. Patogeneza traumatske ozljede mozga .....	3
1.2.1. Primarna ozljeda mozga.....	3
1.2.2. Sekundarna ozljeda mozga.....	4
1.2.3. Protektivni čimbenici u traumatskoj ozljedi mozga.....	13
1.3. Eksperimentalni modeli traumatske ozljede mozga .....	15
1.3.1. Modeli žarišne traumatske ozljede mozga .....	15
1.3.2. Modeli difuzne traumatske ozljede mozga .....	16
1.3.3. Kombinirani model žarišne i difuzne traumatske ozljede mozga .....	16
1.4. Farmakoterapija traumatske ozljede mozga .....	16
1.4.1. Sadašnje stanje .....	16
1.4.2. Pioglitazon .....	17
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>20</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>21</b>
3.1. Pokusne životinje i tretman .....	21
3.2. Priprema tkiva.....	23
3.3. Fluoro Jade C histofluorescencija.....	24
3.4. Imunohistokemijske i imunofluorescencijske analize .....	24
3.5. Western blot analiza .....	25
3.6. Kvantifikacija proteina .....	26
3.7. Prikupljanje podataka i statističke analize .....	26
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>27</b>
4.1. Utjecaj pioglitazona na neurodegeneraciju u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga .....	27
4.2. Utjecaj pioglitazona na reakciju mikroglije u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga .....	30



4.3. Utjecaj pioglitazona na ekspresije parametara upale i staničnog stresa u hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga .....	36
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>40</b>
5.1. Utjecaj pioglitazona na neurodegeneraciju u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga .....	40
5.2. Utjecaj pioglitazona na reakciju mikroglije u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga .....	40
5.3. Utjecaj pioglitazona na ekspresije parametara upale i staničnog stresa u hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga .....	42
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>45</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>46</b>
Popis skraćenica .....	52
Životopis.....	56

# 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

## 1.1. Općenito o traumatskoj ozljedi mozga

Traumatska ozljeda mozga (engl. *traumatic brain injury*, TBI) je jedan od glavnih socioekonomskih i javnozdravstvenih problema. Također se naziva „tiha epidemija“ jer problemi koji nastaju iz same ozljede često nisu prepoznatljivi te su također podcijenjeni od strane društva. TBI je uzrokovana sudarima u prometu, napadima, padovima itd. To je ozljeda koja se zadobiva kada glava nasilno i iznenada udara od predmet ili kada predmet probija lubanju i zahvaća moždano tkivo. Simptomi TBI mogu biti blagi, umjereni i teški, ovisno o samom oštećenju mozga.

U 2009. godini TBI je bio vodeći uzrok smrti u SAD-u za populaciju u dobi 1-44 godina, a u razdoblju od (2002-2006) približno 1,7 milijuna ozljeda na godinu, što uključuje sve tipove TBI ozljede. Broj slučajeva povezan s TBI u SAD-u iznosi 93,8 na 100 000 ljudi (Faul i sur., 2015.). U istraživanju koje uključuje podatke od 1990. do 2000. stopa hospitalizacije u Europi iznosi 235 na 100 000 ljudi. Prosječna stopa smrtnosti u Europi je 15 na 100 000 ljudi, a omjer hospitaliziranih pacijenata je 22:1,5:1 za blage, umjerene i teške (Tagliaferri i sur., 2006).

Glasgowska skala kome (engl. *Glasgow Coma Scale*, GCS) je najčešća i najraširenija metoda kliničkog ocjenjivanja ozljeda uzrokovanih s TBI. Osobe s GCS rezultatom od 3 do 8 su klasificirane kao teške, 9 do 12 kao umjerene i 13 do 15 kao blage TBI. Iako blage TBI predstavljaju 75 % od svih godišnjih TBI u SAD-u, one mogu imati daljnje komplikacije u obliku invalidnosti ili neuropsihičkih komplikacija. Uz to, 43 % pacijenata koji zahtijevaju hospitalizaciju nastavljaju imati kognitivne, socijalne i fizičke deficite u roku jedne godine nakon ozljede (Nguyen R i sur., 2016.).

Međutim, ovi navedeni podatci znatno su niži, te na taj način podcjenjuju TBI iz nekoliko razloga. Prvi razlog je taj da ovi podatci ne uključuju sportske i rekreacijske ozljede,

koje nisu praćene gubitkom svijest, te samim time nije bilo traženja liječničke pomoći kao ni hospitalizacije. Drugi razlog je taj da ovi podatci ne uključuju TBI koje se liječe u vojnim ustanovama. Zadnji razlog su osobe koje traže liječničku pomoć, ali im TBI nije dijagnosticiran (Langlois i sur., 2006.).

Muškarci su u dvostruko većem riziku u odnosu na žene za zadobivanje TBI. Djeca u dobi od 0 do 4 godine i stariji adolescenti u dobi od 15 do 19 godina su pod većim rizikom od zadobivanja TBI nego osobe u drugim dobnim skupinama. Što se tiče samo hospitalizacija, odrasli stariji od 75 godina imaju najveći rizik zadobivanja TBI (Langlois i sur., 2006.).

Traumatska ozljeda mozga se zabrinjavajuće povećava u pojedinim skupinama. Istraživanja su pokazala da 87 % osoba u zatvoru ima povijest ozljede mozga, uključujući i TBI. Također vojno osoblje koje služi u Afganistanu i Iraku te žrtve terorističkih napada su također pod povećanim rizikom od TBI (Langlois i sur., 2006.).

Glavni uzroci TBI-a su padovi, nesreće s motornim vozilima i napadi. Eksplozije su vodeći razlozi TBI kod vojnog osoblja u ratnim zonama. Sportske i rekreacijske ozljede su također jedni od vodećih uzroka TBI-a, uključujući nesvijesti koje su podcijenjene, te se za njih ne traži dodatna medicinska obrada (Langlois i sur., 2006.).

Mnoga istraživanja su ispitala dugoročni ishod nakon TBI. Promjene u neurološkom, fizičkom, kognitivnom te bihevioralnom funkcioniranju su već od prije poznata, iako same promjene variraju ovisno o stupnju ozljede mozga. Neke od ovih promjena se riješe u periodu od šest mjeseci nakon ozljede, dok neke ostaju čak i godinama (Ponsford i sur., 2014.).

TBI je glavni uzrok invalidnosti u SAD-u. Ovakav oblik invalidnosti može se manifestirati kao kognitivni deficit koji vodi ka nemogućnosti ili smanjenoj mogućnosti obavljanja posla ili svakodnevnih aktivnosti. Procjenjuje se da prevalencija invalidnosti povezana sa TBI varira između 2,5 do 6,5 milijuna ljudi u SAD-u. Što u prosijeku iznosi da 1,1 % populacije SAD-a živi s invaliditetom povezanim s TBI. Te osobe imaju smanjen

životni vijek za približno 8 godina. Ustanovljeno je da je rizik od smrti nakon TBI 7 puta veći od zdrave populacije u prvoj godini nakon ozljede (Faul i sur., 2015.).

Povezanost između TBI-a i Alzheimerera je kontroverzna. Iako je točan uzrok nastanka Alzheimerera nepoznat, brojne studije pokazuju da je TBI mogući uzrok. Prema Lye i Shores (2000.), postoji moguća povezanost, a to je da oštećenje krvožilne barijere mozga uzrokuje ulijevanje plazmatskih proteina u mozak, oslobađanje slobodnih radikala kisika, gubitak moždanih rezervi te taloženje amiloid- $\beta$  (Ab) proteina. Također TBI se povezuje sa post-traumatskom epilepsijom. U studiji od 4500 pacijenata s TBI, ustanovljeno je da su napadaji jedan od vodećih rizika blage, umjerene i teške TBI. Rizik od napada se pojavljuje kod 4 % populacije koje su imale TBI, a rizik od epilepsije se povećava za 45-53 % kod penetrirajućih TBI (Faul i sur., 2015).

## **1.2. Patogeneza traumatske ozljede mozga**

### **1.2.1. Primarna ozljeda mozga**

Primarna ozljeda mozga je povezana s mehaničkom silom koja djeluje na mozak te na taj način uzrokuje fizikalna oštećenja moždanog tkiva i vaskulature. Sile koje djeluju na mozak rezultat su kombinacije akceleracije, deceleracije i rotacijskih sila (Lennon i sur., 2018.). Smatra se da linearna akceleracijska sila dovodi do površinske ozljede mozga, dok rotacijska sila, odnosno pokret, može uzrokovati dublje moždane lezije te potres mozga. S obzirom da je mozak viskoelastični organ s minimalnom potporom, teško može pretrpjeti utjecaj takve sile. Siva tvar koja je najbliža površinskom sloju mozga je ugrožena od linearne sile, što može uzrokovati kortikalne kontuzije i hemoragije. Dok je bijela tvar, koja se nalazi dublje u mozgu ugrožena sa rotacijskom silom (Greve i Zink, 2009.).

Kada glava udara u predmet poput vjetrobranskog stakla ili tlo, TBI može nastati bez prijeloma ili ozljede same lubanje. Takva ozljeda se naziva zatvorena ozljeda glave, iz tog

razloga što je barijera između mozga i lubanje ostala netaknuta. Također fraktura lubanje koja može nastati udarcem glave od predmet može rezultirati tim da je jedan dio kosti penetrira u moždano tkivo. Takve ozljede mogu nastati i penetracijom stranog tijela poput metka. Takva ozljeda se naziva otvorena ili ubodna ozljeda, i one mogu izazvati daljnja oštećenja mozga te izazvati veću šansu od infekcije (Lennon i sur., 2018.).

### **1.2.2. Sekundarna ozljeda mozga**

Nakon primarne ozljede mozga nastaje sekundarna faza ozljede mozga. Ona nastaje kao rezultat kompleksnih slijedova događaja koji započinju prilikom primarne ozljede mozga. Sekundarna ozljeda mozga nastaje pod različitim faktorima, uključujući edem, ishemiju, ekscitotoksičnosti i upalu (Hinskon i sur., 2015.).

Ozljeda se može pojaviti satima ili danima nakon ozljede mozga. Ozljeda može biti posljedica oštećenja ili lokalnog smanjenja moždanog protoka krvi (engl. *cerebral blood flow*, CBF) nakon TBI. Smanjenje CBF-a može rezultirati s lokalnim edemom, hemoragijom ili povećanim intrakranijalnim tlakom. Kao rezultat neadekvatne perfuzije, ionske pumpe mogu zakazati što dovodi do poremećaja izmjene kalcija i natrija (Percival, 2018.). Sami poremećaj natrij-kalij pumpe prisutne u membranama neurona, što rezultira prolaznom depolarizacijom stanične membrane. Depolarizacija izaziva oslobađanje glutamata, što može dovesti do ekscitotoksične smrti neurona. Ekscitotoksičnost je povezana s porastom unutarstaničnog kalcija ( $\text{Ca}^{2+}$ ), koji aktivira brojne enzime (npr. proteaze, fosfolipaze i endonukleaze) koji mogu oštetiti samu stanicu. Porast ( $\text{Ca}^{2+}$ ) također povećava i stvaranje slobodnih radikala što može dovesti do daljnjih oštećenja, uključujući oštećenja mitohondrija koje može dodatno pogoršati oksidativni stres (Hammad i sur., 2018.).

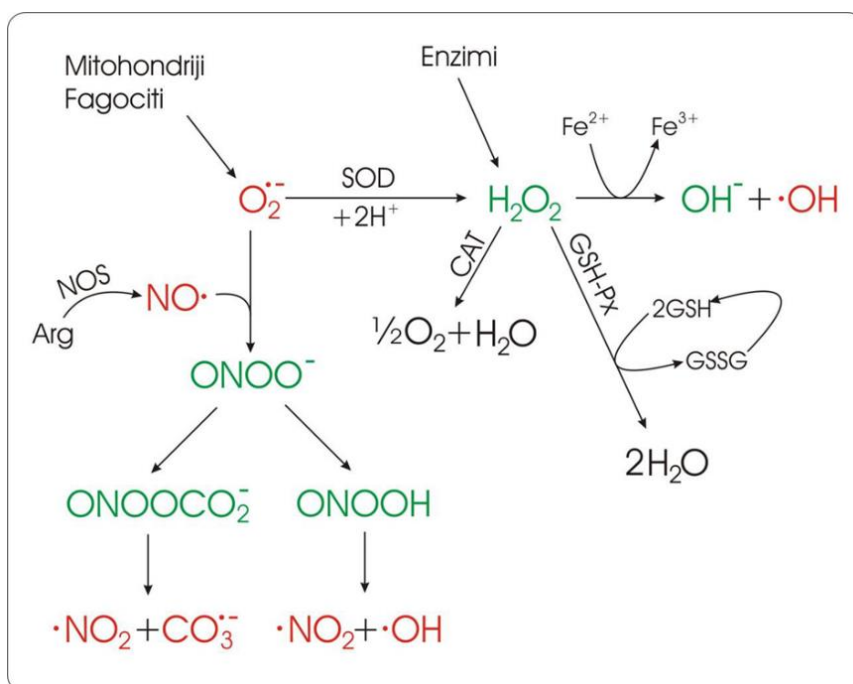
### 1.2.2.1. Oksidativni stres

Slobodni radikali su atomi ili skupine atoma s nesparenim elektronima i mogu nastati procesom oksidacije, tj. uklanjanjem jednog elektrona iz para. Na taj način sama molekula postaje destruktivna i nestabilna. Kada se jednom formiraju, reaktivni radikali mogu započeti lančane reakcije. Kako bi se spriječilo djelovanje slobodnih radikala, tijelo mora imati obrambeni sustav antioksidansa. Antioksidanski su molekule koje mogu reagirati sa slobodnim radikalima i prekinuti lančane reakcije prije nego što dođe do oštećenja vitalnih molekula (Cornelius i sur., 2013.).

Određeni oksidansi i njegovi derivati nastaju nakon TBI, uključujući radikale: ( $O_2^{\bullet-}$ ) superoksidni anion; ( $\bullet OH$ ) hidroksilni radikal, ( $HO_2^{\bullet-}$ ) hidroperoksidni radikal; ( $CO_3^{\bullet-}$ ) karbonat, ( $NO$ ) dušikov (II) oksid, ( $NO_2$ ) dušikov (IV) oksid, ( $NO_3^-$ ) nitrat) i ne-radikali ( $(H_2O_2)$  vodikov peroksid, ( $HOCl$ ) hipoklorna kiselina, ( $ONOO^-$ ) peroksininitrit, ( $ONOOH$ ) peroksininitritna kiselina, ( $ROOR$ ) organski peroksidi) (Slika 1.).

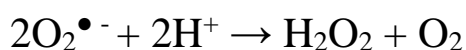
Superoksidni anioni se formiraju kada je kisik reduciran za jedan elektron.  $O_2^{\bullet-}$  je formiran u mitohondriju, a za to se upotrebljava 2-5 % kisika koji se inače koristi u proizvodnji energije. Pojačana proizvodnja reaktivnih kisikovih/dušikovih jedinaka (ROS/RNS) izaziva oksidativni/dušični stres, koji vodi do oštećenja lipida, proteina i nukleinskih kiselina (Cornelius i sur., 2013.). Oksidativno/nitrozativno oštećeni neuroni od strane slobodnih radikala mogu biti prisutni, ali ne i funkcionalni. Kao posljedica oksidativnog stresa, funkcija i transport mitohondrija do sinaptičke regije je smanjena, što dovodi do neurodegeneracije nakon ozljede mozga (Ansari i sur., 2008.).

Nakon TBI, produkcija mikrovaskularnog superoksidnog aniona ( $O_2^{\bullet-}$ ) je povećana. Unutar oziljeđenog živčanog sustava, postoji niz mogućih izvora  $O_2^{\bullet-}$  koji se pojavljuju unutar nekoliko minuta ili sati nakon ozljede. U kasnijem razdoblju aktivirana mikroglija i

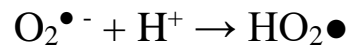


**Slika 1.** Mehanizam nastajanja reaktivnih spojeva kisika i dušika kod ozlijeđene stanice mozga. Zelenom bojom označeni su ne-radikalni spojevi, dok su crvenom bojom označeni radikalni reaktivni spojevi kisika, odnosno dušika. Skraćenice:  $O_2^{\bullet-}$ , superoksidni anion;  $H_2O_2$ , vodikov peroksid;  $OH^-$ , hidroksil;  $\bullet OH$ , hidroksilni radikal;  $NO\bullet$ , dušikov monoksid;  $ONOO^-$ , peroksinitrit;  $ONOOCO_2^-$ , nitrozoperoksikarbonat;  $ONOOH$ , peroksinitritna kiselina;  $\bullet NO_2$ , dušikov dioksid;  $CO_3^{\bullet-}$ , karbonat; SOD, superoksid dizmutaza; CAT, katalaza; GSH-Px, glutation peroksidaza; GSH, reducirani glutation; GSSG, oksidirani glutation; Arg, arginin; NOS, sintaza dušikovog oksida. Preuzeto uz dozvolu iz Pilipović K. Traumatska ozljeda mozga u štakora: mehanizmi oštećenja i oporavka te učinci pioglitazona i enoksaparina (2011).

direktna reaktivnost prema biološkim supstratima u vodenom okruženju je relativno slaba. Ako je i formirana,  $O_2^{\bullet-}$  prolazi spontanu reakciju dismutacije kako bi formirao  $H_2O_2$  u reakciji koja je ubrzana enzimom superoksid dismutaza (SOD):



U otopinama,  $O_2^{\bullet-}$  se nalazi u ravnoteži sa hidoksilnim radikalom ( $HO_2\bullet$ ):

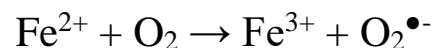


koji je više topljiv u mastima i znatno jači oksidacijski ili redukcijski agens (14).

Centralni živčani sustav je iznimno bogat izvor željeza i njegova distribucija ovisi o osjetljivosti različitih regija na oksidativno oštećenje. U normalnim okolnostima redoks - aktivno željezo, male molekulske mase, je prisutno u izrazito niskim količinama. U plazmi, transportni protein željeza transferin čvrsto veže željezo u obliku  $Fe^{3+}$ . Unutarstanično feritin, globularni protein, veže  $Fe^{3+}$  te ga održava u topljivom i netoksičnom stanju. Feritin i transferin imaju veliki afinitet prema željezu i održavaju ga u nekatalitičkom stanju pri neutralnom pH. Kada pH vrijednost iznosi 6,0 ili manje (što je vrijednost koja se javlja nakon ozljede mozga) dolazi do otpuštanja željeza od strane feritina i transferina. Jednom kada je željezo otpušteno, može katalizirati reakciju kisikovih radikala (Hall i sur., 2010.).

Drugi izvor katalitički aktivnog željeza je hemoglobin. Mehanička ozljeda koja uzrokuje hemoragiju dovodi do pojave hemoglobina na tom području. Željezo se otpušta iz hemoglobina od strane  $H_2O_2$  ili od lipidnih peroksida LOOH, i to otpuštanje je povećano kada je pH manji od 6.5 Slobodno željezo ili kelati željeza sudjeluju u reakcijama slobodnih radikala u dvije razine (Cornelius i sur., 2013.) :

Prvo, autooksidacija  $Fe^{2+}$  dovodi do formiranja  $O_2^{\bullet-}$



Drugo,  $Fe^{2+}$  oksidira u prisutnosti  $H_2O_2$  i formira  $\bullet OH$  (Fentonova reakcija)



Lipidna peroksidacija se može definirati kao proces u kojem nezasićeni lipid ulazi u reakciju s hidoksilnim radikalom. Višestruko nezasićene masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) prisutne u glikolipidima, fosfolipidima i kolesterolu su



najčešće meta peroksidacije. PUFA su masne kiseline koje se sastoje od dvije ili više dvostrukih veza. Njihova sveprisutnost, veliko obilje te osjetljivost ka oksidaciji, čini ih jednim od glavnih meta oksidativnog stresa kroz proces lipidne peroksidacije (Anthonymuthua i sur., 2016.).

Kod TBI, lipidna peroksidacija je obilježena s dva glavna puta : enzimatski i ne-enzimatski. Enzimatski put uključuje aktivaciju fosfolipaze A2 (PLA2), ciklooksigenaze (COX), lipooksigenaze (LOX), citokrom c i ostale peroksidaze. Ne-enzimatski put uključuje interakciju prijelaznih metala i reaktivnih kisikovih spojeva (ROS). Akumulacija brojnih produkata lipidne peroksidacije je poznata po svojoj toksičnosti za samu stanicu. Lipidni medijatori nastali iz oksidacije višestruko nezasićenih masnih kiselina su uključeni u procese disregulacije cerebralnog protoka krvi, oštećenja krvno moždane barijere, aktiviranje upalnog odgovora te programiranje smrti stanice (Anthonymuthua i sur., 2016.).

#### **1.2.2.2. Upala**

Nakon primarne mehaničke ozljede kod TBI, slijedi sekundarni proces, odnosno razvoj upalnog odgovora. Upala je reakcija tkiva na ozljedu. Četiri su glavna klinička znaka upale koje je opisao A. K. Celzo kao: crvenilo (rubor), toplinu (calor), oteklinu (tumor) i bol (dolor) i to prije više od 1800 godina.

Početna upalna reakcija dolazi nakon ekstravazacije krvnih produkata te oslobađanja komponenti koji se nalaze unutar stanice. Također, upalne stanice koje su prisutne u tkivu mozga, astrociti i mikroglije, dovode do stvaranja ROS i RNS (Mathew i sur., 1994.; Rock i sur., 2008.).

Daljni tijek upale je aktivacija urođenog imunološkog odgovora, čime se izaziva upalni odgovor posredovan od strane domaćina unutar intrakranijalnog odjeljka. Među važnijim endogenim medijatorima neuroupale su proupalni citokini, kemokini te komplemente

anafilatoksina. Ove upalne stanice dodatno pridonose razvoju sekundarne ozljede mozga pogoršanjem upalnog odgovora u oštećenom mozgu kroz oksidacijski nalet neutrofila koji oslobađaju proteolitičke i neurotoksične enzime. Nadalje, iako se dugo vremena smatralo da središnji živčani sustav zaštićen od sustavnog imunološkog odgovora (zbog same svoje odvojenosti s krvno moždanom barijerom), znanstvenici su proteklih godina otkrili kako je zapravo SŽS bogat izvor upalnih medijatora. Također je ustanovljeno da su stanice koje su prisutne u tkivu mozga (astrociti, neuroni i mikroglia) sposobne sintetizirati sve upalne medijatore iz perifernog imunološkog sustava (Schmidt i sur., 2005.).

Nakon TBI, djelovanjem fosfolipaza dolazi do oslobađanja arahidonske kiseline iz membrana ozlijeđenih stanica. Arahidonska kiselina se pod utjecajem enzima ciklooksigenaze (engl. *cyclooxygenase*, COX) pretvara u prostaglandin (PG). Ciklooksigenaza je važan enzim u stvaranju upalnog odgovora. Postoje dva oblika ciklooksigenaze, a to su konstitutivna COX-1 i inducibilna COX-2.

COX-1 je pretežno prisutan u mikroglia kod glodavaca i u ljudskom mozgu, te se njegova ekspresija povećava sa starenjem organizma (Choi i sur., 2013.).

COX-2 utječe na regulaciju brojnih metaboličkih koraka u sintezi prostanoida, te ima brojne važne uloge poput npr. dugotrajne potencijacije hipokampusu te regulacija tjelesne temperature (Saper i sur., 1992.). Činjenica da je COX-2 okarakteriziran kao predstavnik gena ranog odgovora (IEG), koji mogu izravno utjecati na staničnu funkciju, naglašava njegovu potencijalnu važnost u nizu patofizioloških procesa. COX-2 ima snažne učinke na mozak putem složenih učinaka prostanoida koji, između ostalog, uključuju: modulaciju oslobađanja glutamata, cerebralnu vazokonstrikciju, indukciju oslobađanja ROS-a i utjecaj na neuroendokrinu funkciju. Stoga je moguće da povećani broj COX-2 u ozlijeđenim neuronima može pridonijeti smrti neurona nakon ozljede mozga. Također, dokazano je da inhibicija

aktivnosti COX-2 štiti od oštećenja uzrokovanih ishemijom te neurotoksičnosti uzrokovanom kroničnom neuroupalom (Cernak i sur., 2002.).

Poznato je da mikroglia može migrirati na mjesto ozljede s ciljem da uspostavi sigurno okruženje te na taj način ublažili štetne posljedice ozljede. Akutna funkcija mikroglie kao odgovor na TBI je eradicirati stanične i molekularne krhotine. Taj proces uklanjanja oštećenih stanica je veoma važan za uspostavljanje normalnog moždanog stanja. Također, aktivirana mikroglia je sposobna osloboditi supstance poput proupalnih citokina, ROS, RNS, te glutamate koji mogu dodatno pogoršati stanje (Donat i sur., 2017.).

Što se tiče morfologije mikroglie, ona se kao odgovor na oštećenje tkiva ili invaziju patogena može promijeniti u amoeboidni oblik, prvenstveno ponašajući se kao fagocit tj. makrofag što dovodi do toga da ju je teško razlikovati od infiltrirajućih makrofaga. Općenito se ta stanja aktiviranja klasificiraju kao M1-klasično aktiviran, na jednom kraju i M2-alternativno aktiviran, na drugom kraju. Proupalni M1 fenotip pogoduje proizvodnji i otpuštanju citokina koji mogu pogoršati neuralnu ozljedu. Suprotno tome, M2 je povezan s oslobađanjem neurotrofičnih čimbenika koji potiču popravak te ulogu fagocita. Stoga je teško pronaći jasan mikroglialni fenotip kod kroničnih bolesti te TBI gdje su mnoge studije na životinjama pokazale mješovitu ekspresiju različitih markera povezanih sa M1 i M2 fenotipom (Donat i sur., 2017.).

### **1.2.2.3. Transkripcijski čimbenici**

Nuklearni čimbenik kapa B (engl. *nuclear factor kappa B*, NFκB) je proteinski kompleks identificiran prije više od 30 godina kao transkripcijski čimbenik koji može stimulirati ekspresiju imunoglobulin κ svjetlosni lanac u B stanicama. Nadalje, studije su pokazale da se NFκB veže za DNA kao dimer koji je formiran kombinacijom nekoliko proteina koji sadržavaju RHD na N-terminalnom kraju. Ovi proteini su članovi NFκB obitelji i u sisavcima oni uključuju: podjedinicu p50 i njegov prekursor p105 (kodirani od strane

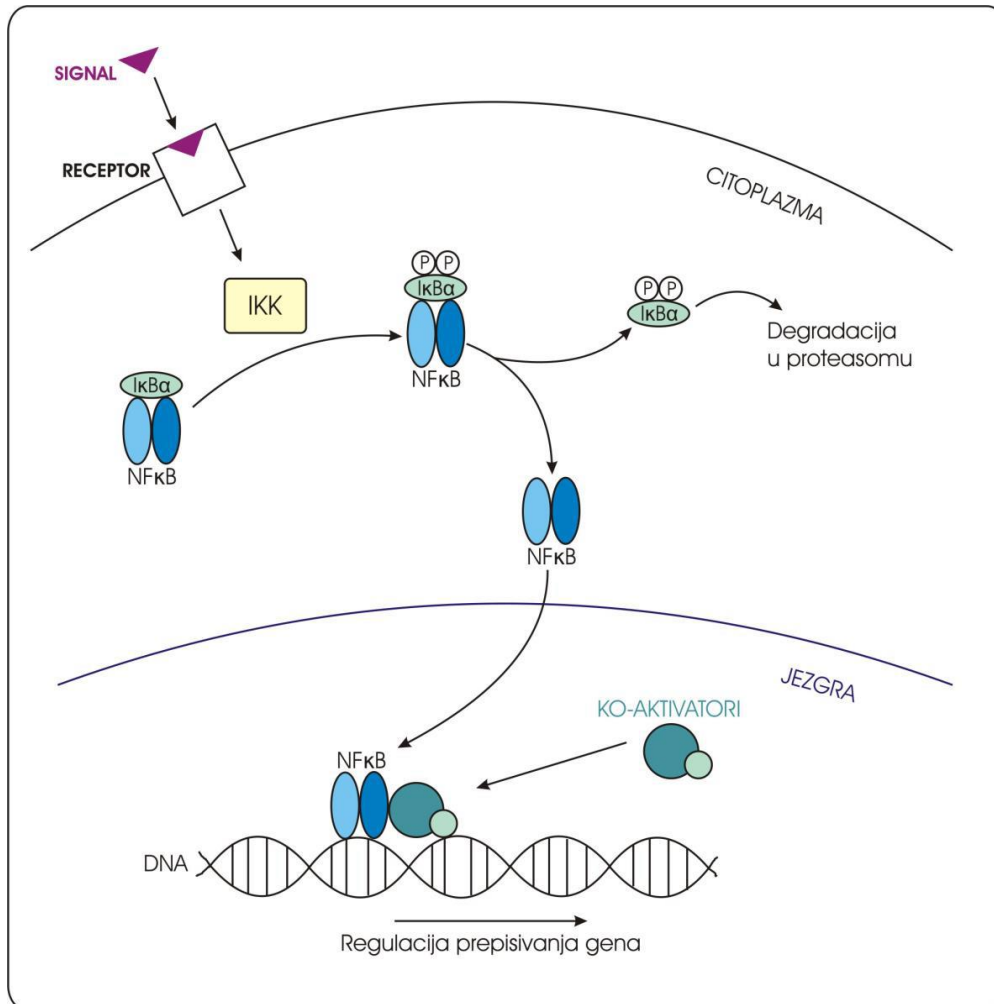
NFκB1 gena); podjedinicu p52 i njegov prekursor p100 (kodirani od strane NFκB2 gena); podjedinicu p65 (koja se također naziva RelA); c-Rel; i RelB (Giuliani i sur., 2018.).

Iako je prvo opisan u B limfocitima, NFκB je gotovo sveprisutan. On regulira ekspresiju tisuće gene, od kojih većina sudjeluje u upalnim i imunim reakcijama. NFκB ima temeljnu ulogu u nastajanju i aktivaciji limfocita, i važan je za urođenu i stečenu imunost. Pored njegove uloge kod upale i imuniteta, NFκB regulira ostale gene koji su uključeni u preživljavanje stanice te njihovu proliferaciju te diferencijaciju (Giuliani i sur., 2018.).

Mehanizam kojim NFκB regulira transkripciju može biti opisan na sljedeći način. U fazi mirovanja, NFκB dimeri su lokalizirani u citoplazmi u neaktivnoj formi, tako što su vezani za inhibitorne proteine poznate kao inhibitori κB (IκB). Širok spektar podražaja može aktivirati NFκB razgradnjom IκB. Ovo vodi do translokacije dimera u jezgru, gdje dolazi do posljedičnog djelovanja na ekspresiju mnogih gena (Slika 2.). Kao što je rečeno, u fazi mirovanja NFκB dimeri su lokalizirani u citoplazmi tako što su vezani na IκB. Međutim, ustanovljeno je da se kompleks građen od IκBα i p50/p65 dimera, može prebacivati iz citoplazme u nukleus i obrnuto iako ostaje transkripcijski neaktivan. Tek nakon degradacije IκB proteina, ovaj dimer se lokalizira u jezgri gdje se veže za DNA. IκB obitelj proteina je karakterizirana prisustvom pojedinih fragmenata ankirinskih ponavljanja (ANK), koji su odgovori za vezanje IκB za NFκB dimere. Pojedini proteini IκB su identificirani, uključujući IκBα, IκBβ, IκBε, IκBζ, i Bcl-3. Prekursori proteina p100 i p105 imaju nekoliko fragmenata ANK u njihovom C-terminalnom dijelu, koji rade kao IκB proteini i samim time su poznati kao IκBδ i IκBγ (Giuliani i sur., 2018.).

Proteini obitelji NFκB pronađeni su i u središnjem živčanom sustavu. I njegova aktivacija u središnjem živčanom sustavu može biti potaknuta ne-patološkim signalima (poput npr. neurotransmitera), za razliku od ostalih stanica koje nisu povezane sa SŽS-om, gdje je većinom potaknuta patološkim događajem (Grilli i sur., 1999.). S obzirom da su istraživanja

pokazala da aktivacija NFκB ima važnu ulogu u neurodegenerativnim bolestima, aktivacija NFκB je zabilježena u neuronima i ne-neuralnim stanicama u mozgu, te nakon TBI. Nakon ozljede NFκB se pojavljuje već nakon jednog sata, a u nekim stanicama i do jedne godine nakon TBI (Nonaka i sur., 1999.).



**Slika 2.** Aktivacija NFκB signalnog puta. U citoplazmi stanice NFκB se nalazi vezan za IκB protein, kojeg aktiviraju različiti signali, te uzrokuju degradaciju i fosforilaciju IκB proteina. Dolazi do oslobađanja NFκB te njegove translokacije u jezgru. Skraćenice: IKK-IκB kinaza, IκBα-inhibitorni protein NFκB signalnog puta, NFκB-nuklearni čimbenik kapa B, P-fosfatna skupina, DNA i deoksiribonukleinska kiselina. Preuzeto uz dozvolu iz Pilipović K. Traumatska ozljeda mozga u štakora: mehanizmi oštećenja i oporavka te učinci pioglitazona i enoksaparina (2011).

### **1.2.3. Protektivni čimbenici u traumatskoj ozljedi mozga**

#### **1.2.3.1. Proteini toplinskog šoka**

Proteini toplinskog šoka (engl. *heat-shock proteins*, HSPs) ili proteini stresa, su prisutni u svim organizmima i svim stanicama organizama (Liz i sur., 2001.). Hipertermija, izloženost metalima, uvjeti koji dovode do praznjena glutaciona, te ishemijske i reperfuzijske ozljede, samo su neke od različitih aktivatora staničnog stresa koji dovodi do pojačane ekspresije HSP-a. Akumulacija HSP-a daje zaštitu stanici, osobito kada dolazi do iste povrede. Ovaj fenomen, nazvan prekondicioniranje, omogućuje tkivima, organima, čak i organizmima da prežive povrede koje bi inače bile smrtonosne (Welch, 2001.). Određeni HSP-ovi, poznati i pod nazivom šaperoni, imaju ključnu ulogu u savijanju, tj. rastavljanju proteina, sastavljanju multiproteinskih kompleksa, transportu/sortiranju proteina u ispravne subcelularne odjeljke, kontrolu i signalizaciju staničnog ciklusa te zaštitu stanica od stresa tj. apoptoze. Također, izvanstanični HSP-ovi mogu potaknuti imunološke stanice poput makrofaga i dendritičkih stanica. HSP-ovi čine veliku obitelj proteina koja se često klasificira na temelju njihove molekularne težine, pa imamo: HSP10, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, itd. (Liz i sur., 2003.).

Obitelj proteina toplinskog šoka od 70-kDa tj. HSP70 it molekularnih šaperona, predstavljaju jednu od najprisutnijih i evolucijski najočuvanijih u svim organizmima. Članovi obitelji HSP70 kontroliraju sve aspekte stanične proteostaze, kao što je: savijanje lanca, unos proteina u organele, oporavak proteina od agregacije te sastavljanje multiproteinskih kompleksa. Ovi šaperoni povećavaju preživljavanje i dugovječnost organizma koji su suočeni sa proteotoksičnim stresom. Izvanstanični HSP70 imaju brojne citoprotektivne i imunomodulacijske funkcije (Radons, 2016.). Iako se često nazivaju unutarstaničnim proteinima, otkriveno je da HSP-ovi mogu i napustiti stanicu. Preciznije, HSP70 je pronađen u plazmi zdrave osobe. U mozgu, HSP70 je induciran raznim patološkim podražajima koji

uključuju ishemiju, ekscitotoksičnost povrede te upalne reakcije, tj. glavne uzroke TBI. HSP70 se može inducirati u većini tipova stanica, uključujući neurone, astrocite, mikrogliji te endotelu u SŽS. Nagada se da povećana ekspresija HSP70 ima ulogu u preživljavanju stanica te njihovom oporavku nakon cerebralnih ozljeda. Samim time, osim specifičnih unutarstaničnih uloga HSP70, on također može modulirati neuroendokrine i imunološke odgovore koji utječu na ishod u teških TBI (Rocha i sur., 2005.).

### **1.2.3.2. Neurotrofini**

Neurotrofini su prepoznati kao promotori preživljavanja neurona, ali zapravo oni mogu regulirati mnoge aspekte razvoja neurona i njegovih funkcija, uključujući stvaranje sinapse i sinaptičku plastičnost. Četiri neurotrofina se pojavljuju kod sisavaca: NGF, BDNF, neurotrofin-3 i neurotrofin-4. Prvi neurotrofin koji je pronađen je čimbenik rasta neurona (engl. *nerve growth factor*, NGF). Drugi koji je pronađen je neurotrofini čimbenik rasta (engl. *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF), koji je izoliran iz mozga svinje (Reichardt i sur., 2006.).

BDNF igra važnu ulogu u moduliranju sinaptičke funkcije neurona. Jedan je od najproučavanijih neurotrofina u SŽS-u, i zadobio je iznimnu pažnju zbog njegove važnosti u razvoju i održavanju normalne moždane funkcije. Ustanovljeno je da BDNF posreduje preživljavanju i diferencijaciji neurona tako da veže i aktivira tropomiozin receptor kinaze B (engl. *tropomyosin receptor kinase B*, TrkB), člana velike obitelji Trk receptora, koji se nalaze na presinaptičkoj i postsinaptičkoj membrani (Cattaneo i sur., 2016.).

Nekoliko studija je pokazalo povezanost između polimorfizma BDNF-a i različitih neuropatoloških stanja poput Alzheimerove bolesti, opsesivno-kompulzivnog poremećaja, poremećaja prehrane, a tako i povezanost s krajnjim funkcijama kod osoba koje su zadobile

TBI. Studije kod eksperimentalne TBI su pokazale pojačanu ekspresiju BDNF u hipokampusu nakon žarišne ozljede (Rostami i sur., 2011.).

### **1.3. Eksperimentalni modeli traumatske ozljede mozga**

Eksperimentalni modeli TBI omogućavaju proučavanje dinamične ozljede mozga u kontroliranim uvjetima. Ti modeli su nužni za daljnje proučavanje visoko kompleksne patologije TBI. U eksperimentalnim modelima se najčešće upotrebljavaju mali glodavci, najviše zbog njihove cerebralne fiziologije koje su slične onoj ljudskoj. Postoji više modela eksperimentalne TBI, onaj koji će se koristiti ovisi o znanstveniku, jer jedan model ne može pokriti cijeli spektar događaja nakon TBI.

#### **1.3.1. Modeli žarišne traumatske ozljede mozga**

Za istraživanje promjena kod žarišne ozljede, koriste se dva najpoznatija modela TBI, a to su: model pada utega (engl. *weight drop model*) i model kontroliranog kortikalnog udara (engl. *controlled cortical impact, CCI*).

Model pada utega, kako mu ime samo govori, je model u kojem uteg slobodno pada kroz aparaturu koja ga navodi te udara od lubanju životinje, metalnu pločicu fiksiranu za lubanju ili kroz otvor na lubanji direktno na mozak (O'Connor i sur., 2011.). Ovdje se težina ozljede regulira tako da se poveća ili smanji masa utega, te promjenom visine pada samog utega.

CCI model je invazivna metoda koja koristi udarač koji stvara mehaničku energiju koja zatim djeluje na neoštećenu ovojnicu mozga. U ovom slučaju kompresirani zrak je izvor mehaničke energije koja djeluje na mozak. Ovaj model ima brojne prednosti zbog same mogućnosti kontroliranja različitih parametara poput vremena, brzine te dubine ozljede (O'Connor i sur., 2011.).



### **1.3.2. Modeli difuzne traumatske ozljede mozga**

Kako bi reproducirali difuznu aksonalnu ozljedu, koristi se model akceleracijskog udarca (engl. *impact acceleration model*). U ovom modelu se koristi kaciga koja je napravljena od nehrđajućeg čelika koja je zacementirana za lubanju pomoću tankog sloja dentalnog akrilata. Životinja se postavlja na pjenastu površinu i čelična kaciga se namjesti točno ispod pada utega. Udarac se zadobiva tako što se uteg otpušta s određene visine na čeličnu kacigu (Marmarou i sur., 1994.).

### **1.3.3. Kombinirani model žarišne i difuzne traumatske ozljede mozga.**

Model lateralne ozljede tlakom tekućine (engl. *lateral fluid percussion injury*, LFPI) je najzastupljeniji i najčešće korišten model za procjenu žarišne i difuzne ozljede mozga. To je model koji se sastoji od uređaja koji uzrokuje ozljedu kroz otvor u lubanji tako da primjenjuje kratak pritisak tekućine na tvrdu mozgovnicu. Standardiziran je kako bi se omogućila manipulacija samih parametara ozljede (Alder i sur., 2011.).

## **1.4. Farmakoterapija traumatske ozljede mozga**

### **1.4.1. Sadašnje stanje**

Bez obzira na velika ulaganja zadnjih par desetljeća, TBI i dalje ostaje glavni izvor invalidnosti i smrti u razvijenom društvu.

Iako se smatra da neuroupala ima štetne posljedice na sam mozak, prethodna istraživanja su pokazala da visoke doze protuupalnih lijekova korištene nakon TBI vode ka većim posljedicama (Mashkouri i sur., 2016.).

Minociklin je derivat tetraciklina koji ima neuroprotektivna i protuupalna svojstva. Ovaj lijek smanjuje otpuštanje proupalnih citokina i kemokina. Ispitivanja na animalnim modelima su pokazala smanjenje upale u ozlijeđenom tkivu, ali ostala ispitivanja drugih istraživača

dokazuju suprotno. Također, melatonin je hormon kojeg proizvodi epifiza i trenutno se istražuje njegov samostalni učinak zbog njegovih neuroprotektivnih karakteristika. To je enzim, koji lako prolazi kroz staničnu membranu. Njegov mehanizam djelovanja je inhibicija mikroglijalne aktivacije i smanjenje sekrecije citokina. Efekti melatonina na TBI varira te su potrebna daljnja istraživanja. Nadalje, statini su poznata grupa lijekova koji se koriste za smanjenje kolesterola u krvi, imaju neuroprotektivna i protuupalna djelovanja na animalnim modelima. Statini inhibiraju signalni put TLR4 proteina, aktivaciju NF $\kappa$ B i G-proteine, što sve skupa dovodi do redukcije mikroglijalne aktivacije. Statini su lijekovi koji su dobro tolerirani od strane pacijenata uz blage nuspojave. Oni pokazuju obećavajuće pretkliničke rezultate za ostala stanja povezana s neurološkim oštećenjima (Mashkouri i sur., 2016.).

Matične stanice su neidentificirane stanice koje imaju potencijal za regeneraciju oštećenog tkiva. Pretklinička ispitivanja su pokazala izuzetnu regenerativnu sposobnost matičnih stanica da se transformiraju u nove diferencirane neurone nakon TBI. Također, matične stanice su pokazale značajan potencijal u sekvenciraju smrti neuronskih stanica te produljenjem upalnog odgovora, što rezultira povećanjem oporavka kognitivnih i motoričkih funkcija (Mashkouri i sur., 2016.).

Kod ozljeda poput TBI, primjena samo jednog lijeka nije najbolja opcija. Kombinacija lijekova i matičnih stanica bi mogla poboljšati rezultate liječenja. Kombinacija lijekova poput faktor stimulacije granulocita (G-CSF), eritropoetina i statina, mogu poboljšati funkcije matičnih stanica prema popravku moždanog tkiva (Mahkouri i sur., 2016.).

#### **1.4.2. Pioglitazon**

Peroksisom proliferator-aktivirani receptori (PPAR) su proteini koji pripadaju superobitelji proteina koji se nazivaju nuklearni receptori. PPAR su otkriveni u glodavcima 1990. i pripadaju superobitelji proteina koja sadrži 48 članova. Strukturno PPAR su slični

steroidnim hormonskim receptorima. Oni djeluju kao heterodimeri zajedno sa koaktivnim kompleksom koji se vežu za peroksisom proliferator elemente odgovora (engl. *peroxisome proliferator response elements*, PPRE) na molekuli DNA, što dovodi do transaktivacije i transrepresije različitih gena (Tyagi i sur., 2011.).

PPAR postoji u tri različite forme,  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ , i  $\gamma$ , od kojih je izoforma PPAR $\gamma$  najbolje proučena. PPAR $\gamma$  se dijeli na:  $\gamma 1$ –koji se nalazi u svim tkivima, uključujući srce, mišiće, crijeva, bubrege, gušterača i jetra.  $\gamma 2$ –koji se nalazi većinom u adipoznom tkivu,  $\gamma 3$ –koji se nalazi u makrofagima, debelom crijevu i bijelom adipoznom tkivu, te  $\gamma 4$ –koji se nalazi u endotelu (Tyagi i sur., 2011.).

Tiazolidindioni (TZD) tj. glitazoni su najviše istraživani PPAR $\gamma$  ligandi. To je lijek koji se koristi kao antidijabetik, a nakon njega su uslijedili roziglitazon i pioglitazon. Otkriveno je kako PPAR $\gamma$  ima bitnu ulogu u imunom odgovoru nakon upale. Oni imaju sposobnost inhibirati ekspresiju upalnih citokina te usmjeriti diferencijaciju imunoloških stanica prema protuupalnim fenotipovima. Značajka PPAR $\gamma$  je strukturna raznolikost njegovih liganda koje obuhvaćaju endogene metabolite, dijetalne spojeve i sintetičke lijekove. Sve veća učestalost pojave upalnih i alergijskih bolesti, zajedno sa ohrabrujućim rezultatima nedavnih kliničkih ispitivanja, ukazuju na to da prirodni agonisti PPAR $\gamma$  koji se nalaze u hrani mogu biti korisni za ljudsko zdravlje djelujući kao protuupalne molekule. Agonisti PPAR $\gamma$  također su pokazali djelotvornost kod Parkinsonove bolesti, Alzheimerove bolesti, Amiotrofične lateralne skleroze te kod ozljeda mozga. Oni djeluju na mikroglija stanice i inhibiraju aktivaciju mikroglija stanica (Tyagi i sur., 2011.).

Uloga PPAR-a u moduliranju metabolizma lipida i glukoze je dobro utvrđena. U novije se vrijeme dokazalo da PPAR modulira i upale. Npr. agonisti PPAR-a inhibiraju proizvodnju proupalnih molekula perifernim imunološkim stanicama kao i rezidentnim glijalnim stanicama. Nadalje, agonisti PPAR receptora su pokazali efikasnost u suzbijanju razvoja upale

SŽS-a i neurodegenerativnih poremećaja. Oralna primjena PPAR $\gamma$  agonista pioglitazona smanjila je aktivaciju glija i nakupljanje A $\beta$  pozitivnih plakova u hipokampusu i korteksu (McIntosh i sur., 1989.).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Iz svega navedenog u Uvodu i pregledu područja istraživanja ovog rada razvidno je da su sadašnja znanja o mehanizmima oštećenja i oporavka mozga nakon TBI nisu cjelovita, te da učinci primjene pioglitazona u eksperimentalnoj TBI nisu u cijelosti razjašnjeni.

Stoga, ciljevi ovog istraživanja u modelu TBI u štakora su:

1. istražiti učinke pioglitazona na neurodegeneraciju u različitim regijama mozga štakora (parijetalni korteks i hipokampus) nakon TBI,
2. evaluirati utjecaj primjene istraživanih PPAR $\gamma$  agonista na reakciju mikroglije u gore navedenim moždanim strukturama, te
3. istražiti učinke pioglitazona na razine ekspresija proteina od interesa.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Pokusne životinje i tretman

Eksperimentalni pokusi učinjeni su na odraslim jedinkama Wistar štakora muškog spola, tjelesne mase 350-450 g. Životinje su držane u nastambi za pokusne životinje Zavoda za farmakologiju u kontroliranim uvjetima s pravilnim izmjenjivanjem razdoblja 12-satne svjetlosti i tame, uz sobnu temperaturi 20-24 °C i vlagu 45-65 %. Životinje su hranjene standardnom hranom za štakore i pile su vodu *ad libitum*. Svi su se eksperimentalni postupci izvodili između 10 h i 14 h. Postupci sa životinjama odobreni su od Fakultetskog etičkog povjerenstva i izvedeni u skladu sa odredbama Republike Hrvatske (NN 135/06; NN 37/13, NN 50/1), kao i europskim smjernicama sukladno direktivama Vijeća Europe (86/609/EEC). Ispitivanja su bila provedena te u skladu s osnovama tzv. 3R pristupa: *Replacement* = nadomještanje životinja, *Reduction* = smanjenje broja životinja, *Refinement* = oplemenjivanje postupaka prema životinjama.

TBI je uzrokovana primjenom LFPI modela (39). Ukratko, životinje su anestetizirane izofluranom (4 % prilikom indukcije, 2 % prilikom održavanja anestezije) u smjesi dušikovog oksida i kisika u omjeru 2:1. Nakon nastupa anestezije, životinje su smještene na aparat za stereotaksiju, koža im je dezinficirana te s.c. ubrizgana 0,5 %-tna otopina bupivakaina. Potom je učinjen otvor u lubanji veličine 5 mm nad lijevim parijetalnim korteksom, pazeći da se očuva tvrda ovojnica mozga. Na mjesto otvora smještena je te dentalnim cementom fiksirana plastična spojnica tipa Luer-Lock (Slika 4.) kojom su životinje spojene na LFPI aparat (VCU Biomedical Engineering Facility, Richmond, VA, SAD) (Slika 5.). Ozljeda mozga je inducirana naglim injiciranjem fiziološke otopine u kranijalnu šupljinu pod tlakom od 1,8-2,2 atm. U analizu su uključene samo one životinje kod kojih je prestanak disanja nakon ozljede trajao manje od 60 sekundi. Nakon induksijske ozljede, Luer-Lock je uklonjen, a koža je zašivena. Potom je na ranu stavljena antibiotska mast te su životinje vraćene u svoje kaveze sa

slobodnim pristupom vodi i hrani. Štakori su slučajnim odabirom dodijeljeni trima eksperimentalnim grupama. Lažno operirani štakori koji su tretirani i.p. otapalom (dimetil-sulfoksidom) 10 min i 12 sati nakon lažne TBI, su služili kao kontrolna skupina. Oni su tretirani identično kao i štakori koji su zadobili TBI, ali bez same ozljede mozga. Štakori koji su zadobili ozljedu mozga iz druge dvije grupe su tretirane i.p. sa 1 mg/kg pioglitazona ili otapala 10 min i 12 sati nakon indukcije TBI.



**Slika 3.** Životinja koja je anestezirana te postavljena na uređaj stereotaksiju. Na mjesto otvora lubanje je fiksirana dentalnim cementom spojnicica tipa Luer – Lock, nad lijevim parijetalnim korteksom. Preuzeto uz dozvolu iz Pilipović K. Traumatska ozljeda mozga u štakora: mehanizmi oštećenja i oporavka te učinci pioglitazona i enoksaparina (2011).



**Slika 4.** Sustav za LFP ozljedu u štakora: aparat za LFP ozljedu (A), osciloskop (B), računalo (C). Preuzeto uz dozvolu iz Pilipović K. Traumatska ozljeda mozga u štakora: mehanizmi oštećenja i oporavka te učinci pioglitazona i enoksaparina (2011).

### 3.2. Priprema tkiva

Sve životinje su žrtvovane 24 sata nakon TBI ili lažne traumatske procedure. Za Western blot analizu, uzorci ipsilateralnog hipokampusa (N=4 po skupini) su homogenizirani u puferu za lizu koji se sastoji od 25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, i mješavine inhibitora proteaza (aprotinin, leupeptin, PMSF, natrijev ortovanadat, natrijev fluorid, natrijev pirofosfat). Nakon inkubacije u trajanju od 1 sata, uzorci su centrifugirani na  $10000\times g$  pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 10 min, te su supernatanti stavljeni na pohranu na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Za histološke analize, štakori (N=3-4 po skupini) su anestetizirani s natrijevim tiopentalom te transkardijalno perfundirani s fosfatnim puferom (PBS, 0,1 M , pH 7,4) nakon čega je uslijedila fiksacija s 4%-tnim paraformaldehidom u PBS-u. Mozgovi su zatim izvađeni i čuvani u paraformaldehidu 18-22 sati pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , te nakon toga uklopljeni u parafin.



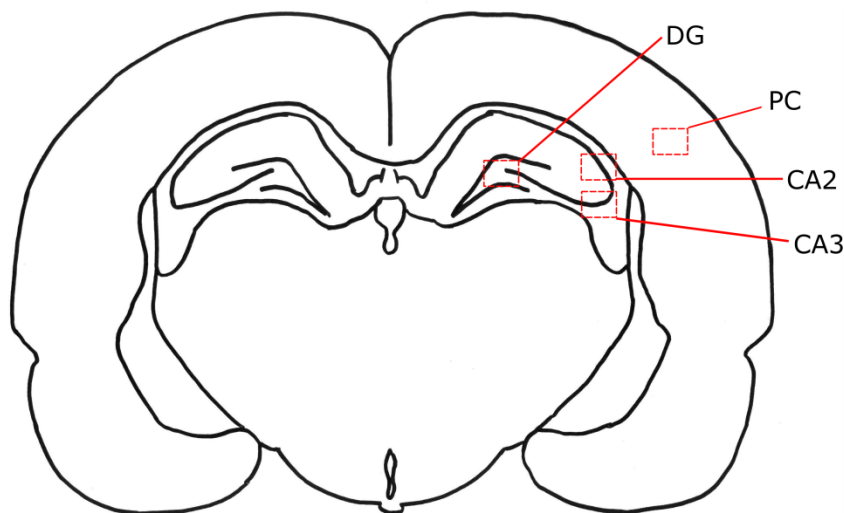
### 3.3. Fluoro Jade C histofluorescencija

Detekcija Fluoro Jade C fluorescentnom bojom označenih degenerirajućih neurona je učinjena na 3-4 µm debelim parafinskim preparatima koji su prethodno deparafinizirani u ksilenu zatim dehidrirani u padajućim koncentracijama etanola te tretirani s 0,006%-tnim kalijevim permanganatom, razrijeđenim u dH<sub>2</sub>O, tijekom 10 min. Sekcije su isprane sa dH<sub>2</sub>O 2 puta po 1 min, te inkubirane u tami s 0,0001% Fluoro Jade C otopinom (Chemicon, Millipore, Billerica, MA, SAD) u 0,1% octenoj kiselini kroz 20 min. Nakon ispiranja sa dH<sub>2</sub>O (3 puta, po 1 min), zatim sušenja na zraku, sekcije su uronjene u ksilen i prekrivene s medijem za montiranje. Kvantifikacija broja Fluoro Jade C pozitivnih neurona u parijetalnom korteksu i regijama hipokampusa (Slika 5.) je učinjena na mikrofotografijama na povećanju od ×400 koristeći ImageJ software (NIH, Bethesda, USA). Mikrofotografije su učinjene pomoću Olympus IX73 mikroskopa i Olympus XM10 digitalne kamera (Olympus, Tokio, Japan).

### 3.4. Imunohistokemijske i imunofluorescencijske analize

Imunohistokemijska detekcija stanica mikroglije u parijetalnom korteksu i hipokampusu učinjena je pomoću protutijela protiv ionizirane kalcij-vezujuća adaptorska molekula 1 (engl. *Ionized calcium binding adaptor molecule 1*, Iba1) na parafinskim rezovima debljine 3-4 µm. Prvo se stakalca sa rezovima mozga deparafiniziraju tako što se urone u ksilol, a nakon toga se dehidriraju kroz padajuće koncentracije etanola do destilirane vode. Nakon toga slijedi zagrijavanje stakalaca uronjenih u citratni pufer (10mM, pH 6,0) u mikrovalnoj pećnici. Nespecifična mjesta vezanja su blokirana s 5% normalnim kozjim serumom i 1% albuminom goveđeg seruma (engl. *Bovine serum albumin*, BSA) s 0,025% Tritona X-100 u TBS-u. Uzorci su zatim inkubirani s primarnim protutijelima preko noći na 4 °C. Idući dan uzorci su inkubirani sa sekundarnim protutijelom označenim fluorescentnom bojom. Vizualizacija jezgara učinjena je primjenom 1 µg/ml 4', 6'-diamino-2-fenilindol dihidroklorid (engl. 4',6-

diamino-2-phenylindole, *dihydrochloride*, DAPI) (Molecular Probes, Eugene, OR, SAD), 20 min pri sobnoj temperaturi. Sve fotografije rezova preparata mozga učinjene pomoću Olympus IX73 mikroskopa i Olympus XM10 digitalne kamera (Olympus, Tokio, Japan). Za kvantifikaciju broja i udjela površine Iba1 obojenih stanica mikroglije su korištene mikrofotografije učinjene pri povećanju od  $\times 400$  (Slika 5.).



**Slika 5.** Shematski prikaz koronalnog presjeka mozga štakora na kojem su označene histološkim metodama analizirane moždane strukture, parijetalni korteks (PC) te dentatni girus (DG), CA2 i CA3 regije hipokampusa.

### 3.5. Western blot analiza

U uzorcima hipokampusa, pomoću Western blota su mjerene ekspresije proteina: COX-2; inducibilne oksidaze dušikovog oksida, iNOS; HSP70 i  $\beta$ -aktina. Proteinski uzorci su stavljeni na SDS-PAGE gel pod određenim uvjetima, zatim su transferirani na nitroceluloznu membranu gdje su blokirani 1 sat pri sobnoj temperaturi s odgovarajućim puferom za blokiranje, te su inkubirani s primarnim protutijelom preko noći pri 4 °C. Idući dan, membrane su tretirane odgovarajućim biotiniliranim sekundarnim protutijelom 1 sat, a zatim isprane 30 min sa streptavidin-HRP pri sobnoj temperaturi. Membrane su vizualizirane kemiluminiscencijom koristeći supstrat Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate

(Pierce, Rockford, IL, USA), signal je dobiven pomoću Kodak Image Station 440CF, a jačina signala pomoću Kodak 1D Image Analysis Software (Eastman Kodak Inc, Rochester, NY, USA).

### **3.6. Kvantifikacija proteina**

Koncentracije proteina u uzorcima određivane su metodom po Bradfordu (1976.), korištenjem pročišćenog BSA kao standarda.

### **3.7. Prikupljanje podataka i statističke analize**

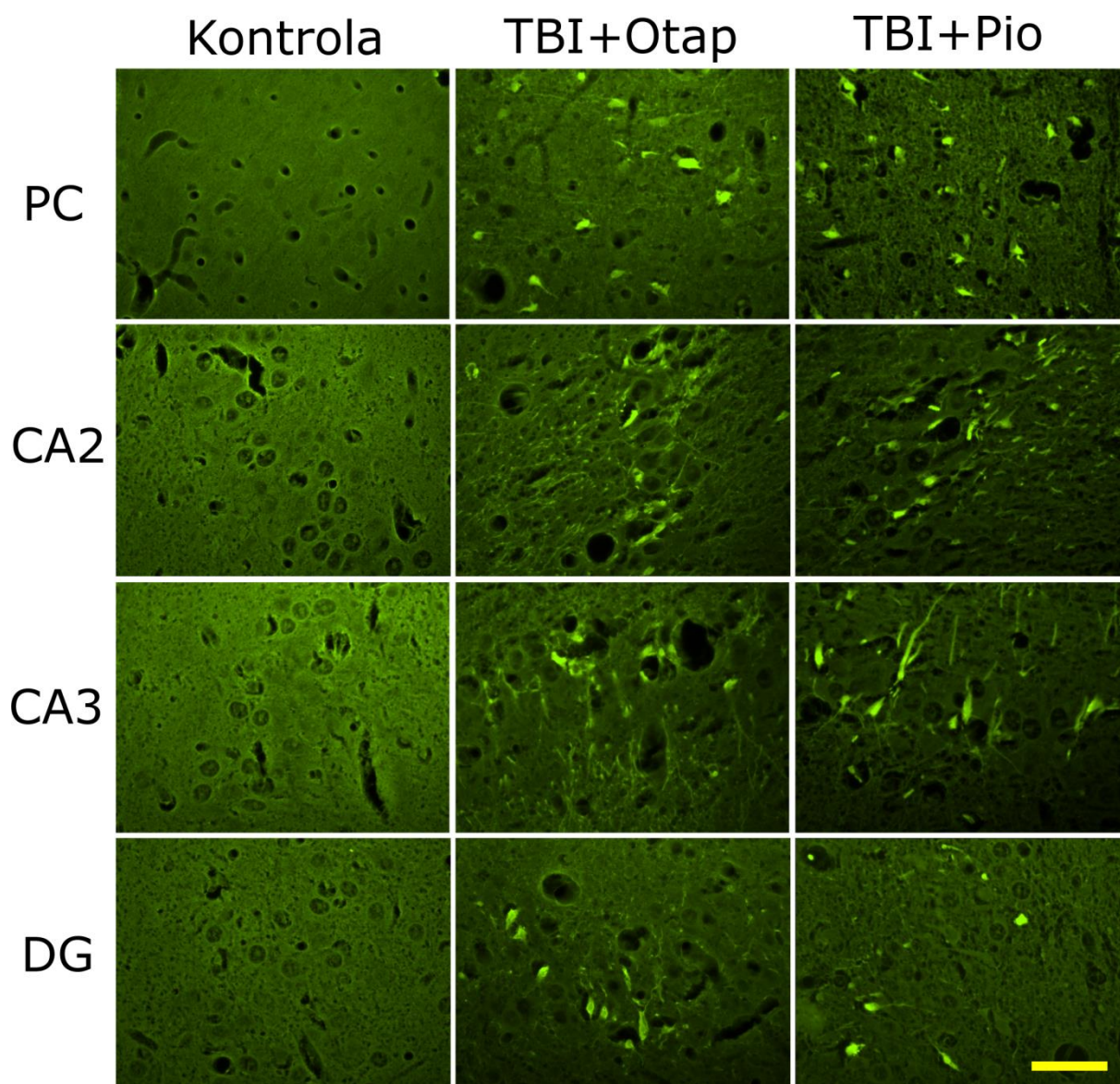
Za pohranu podataka te izradu grafičkih prikaza korišten je program Microsoft Office Excell® (Microsoft Corp., Redmond, WA, SAD). Za analizu mikrofotografija korišten je ImageJ program (NIH, Bethesda, MD, SAD). Vrijednosti koje su dobivene izražene su kao mjera središnjice i raspršenja. Za statističku obradu podataka korišteni su parametrijski postupci statističke raščlambe, jednosmjerna (*one-way*) analiza varijance (ANOVA) s Duncan Multiple Range post-hoc testom. Razina od  $P < 0,05$  smatrana je statistički značajnom. Postupci statističke raščlambe učinjeni su pomoću računalne programske potpore STATISTICA® inačica 13 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD).

## 4. REZULTATI

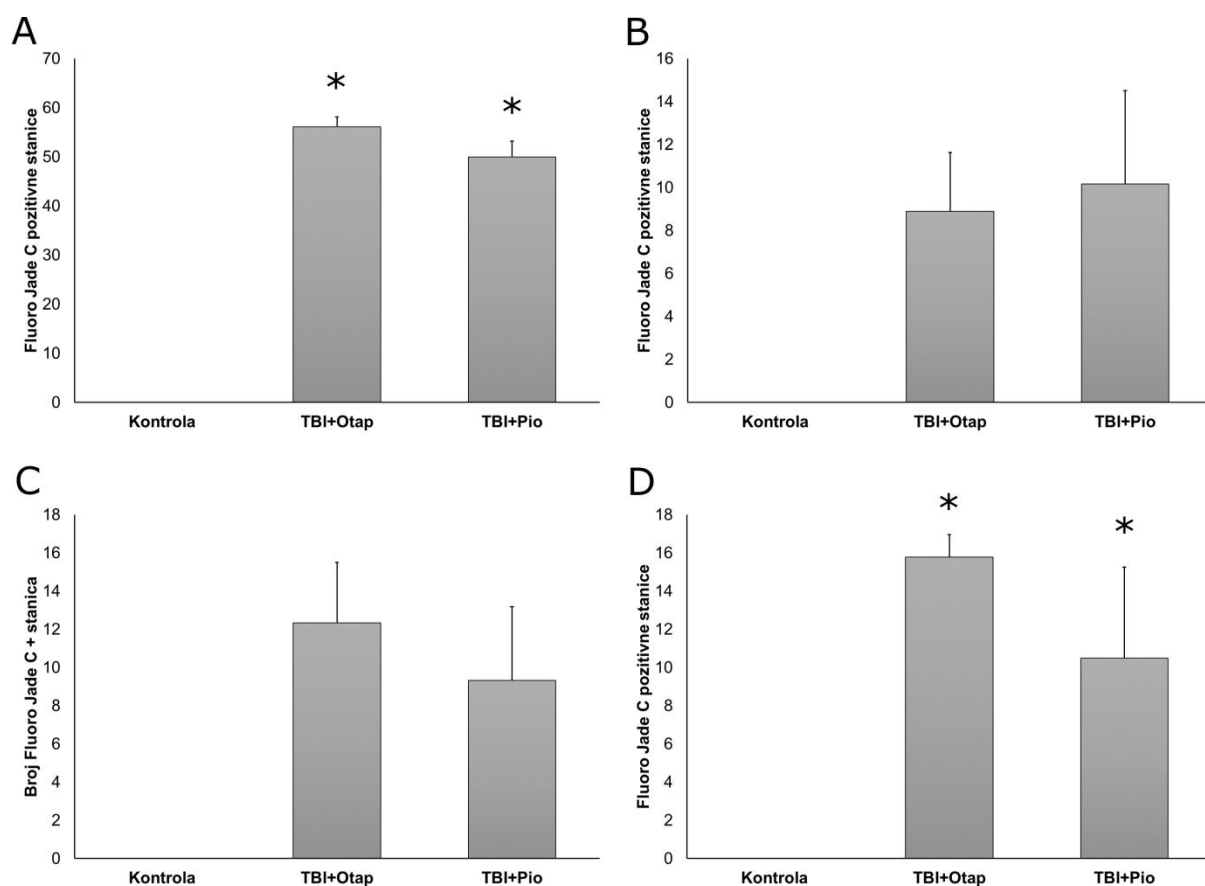
### 4.1. Utjecaj pioglitazona na neurodegeneraciju u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga

Kako bi istražili utjecaj pioglitazona na neurodegeneraciju u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga, koristili smo Fluoro-Jade C bojanje. Mikrofotografija (Slika 6.) pokazuje Fluoro-Jade C pozitivno obojene degenerativne neuronske stanice i njihove procese. Vidljivo je da se broj Fluoro-Jade C pozitivno obojenih stanica u ozlijeđenih štakora kod kojih je primijenjen pioglitazon smanjio u dentatnom girusu (DG) hipokampusa.

U ovom radu prikazana je kvantifikacija Fluoro Jade C bojanja koja je pokazala značajnu razliku između broja degeneriranih stanica u parijetalnom korteksu [ $F(2,6) = 198,17$ ;  $P < 0,001$ ] (Slika 7A) i dentatnom girusu hipokampusa [ $F(2,6) = 8,075$ ;  $P = 0,020$ ] (Slika 7D) između skupine ozlijeđenih štakora tretiranih otapalom te ozlijeđenih štakora tretiranih pioglitazonom nakon traumatske ozljede mozga u odnosu na kontrolnu skupinu. ANOVA analiza nije pokazala značajan utjecaj traume na broj Fluoro Jade C pozitivnih stanica u druge dvije regije hipokampusa, odnosno u CA2 [ $F(2,6) = 3,481$ ;  $P = 0,099$ ] (Slika 7B) i CA3 [ $F(2,6) = 4,987$ ;  $P = 0,053$ ] (Slika 7C). Primjena pioglitazona nije značajno utjecala na razinu neurodegenerativnih promjena u istraživanim regijama mozga ozlijeđenih životinja ( $P > 0,05$ ).



**Slika 6.** Učinak pioglitazona na neurodegeneraciju u parijetalnom korteksu (PC) te CA2, CA3 i DG regijama hipokampusa u štakora s traumatskom ozljedom mozga. Prikazane su mikrofotografije prereza mozgovog životinja kontrolne skupine (Kontrola), te ozlijeđenih štakora tretiranih otapalom (TBI+Otap) ili pioglitazonom (TBI+Pio). Linija skale: 50  $\mu\text{m}$ .

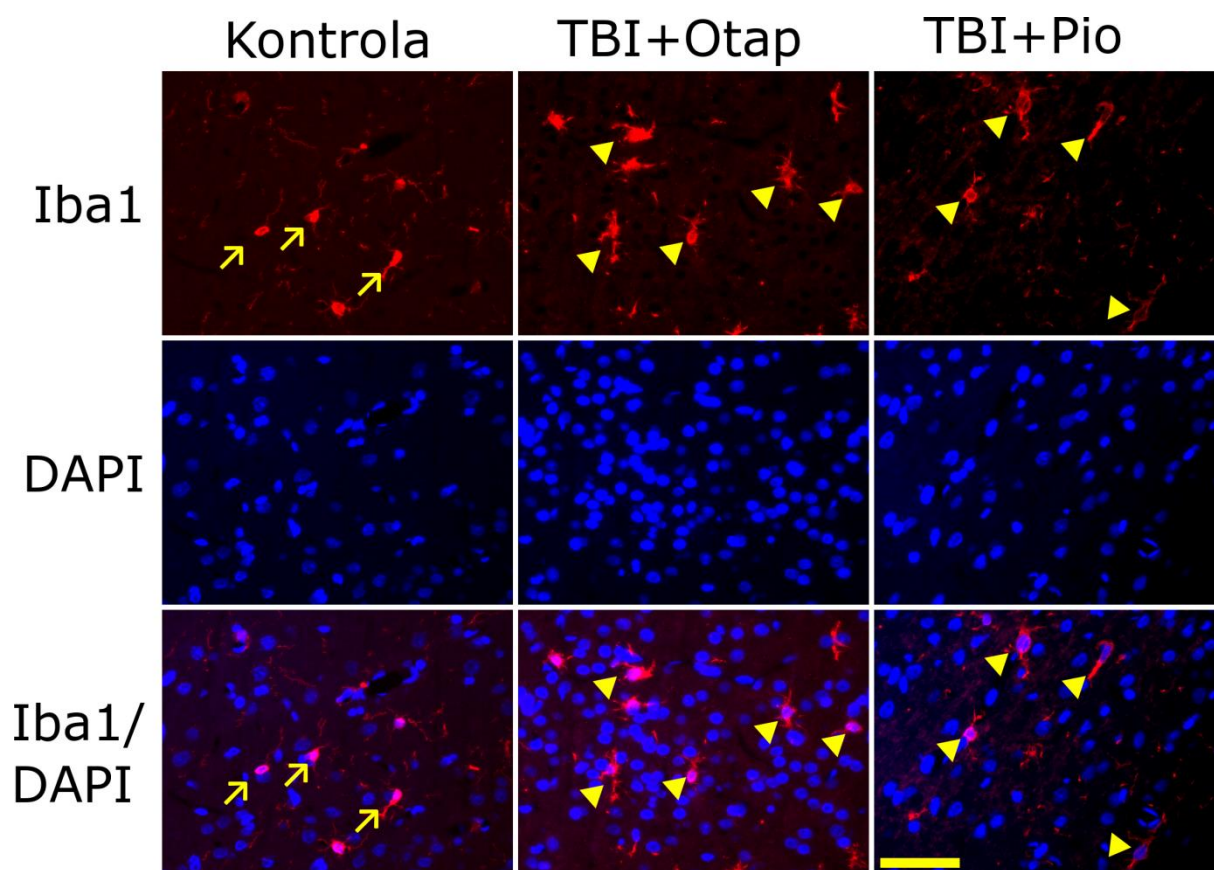


**Slika 7.** Učinak pioglitazona na neurodegeneraciju u parijetalnom korteksu (A) te CA2 (B), CA3 (C) i DG (D) regijama hipokampusa u štakora s traumatskom ozljedom mozga. Prikazani su histogrami s rezultatima kvantifikacije broja Fluoro Jade C pozitivnih stanica u životinja kontrolne skupine (Kontrola), te ozlijeđenih štakora tretiranih otapalom (TBI+Otap) ili pioglitazonom (TBI+Pio). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti  $\pm$  SEM (n=3). \*P < 0,05; značajno različito od Kontrole.

## **4.2. Utjecaj pioglitazona na reakciju mikroglije u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga**

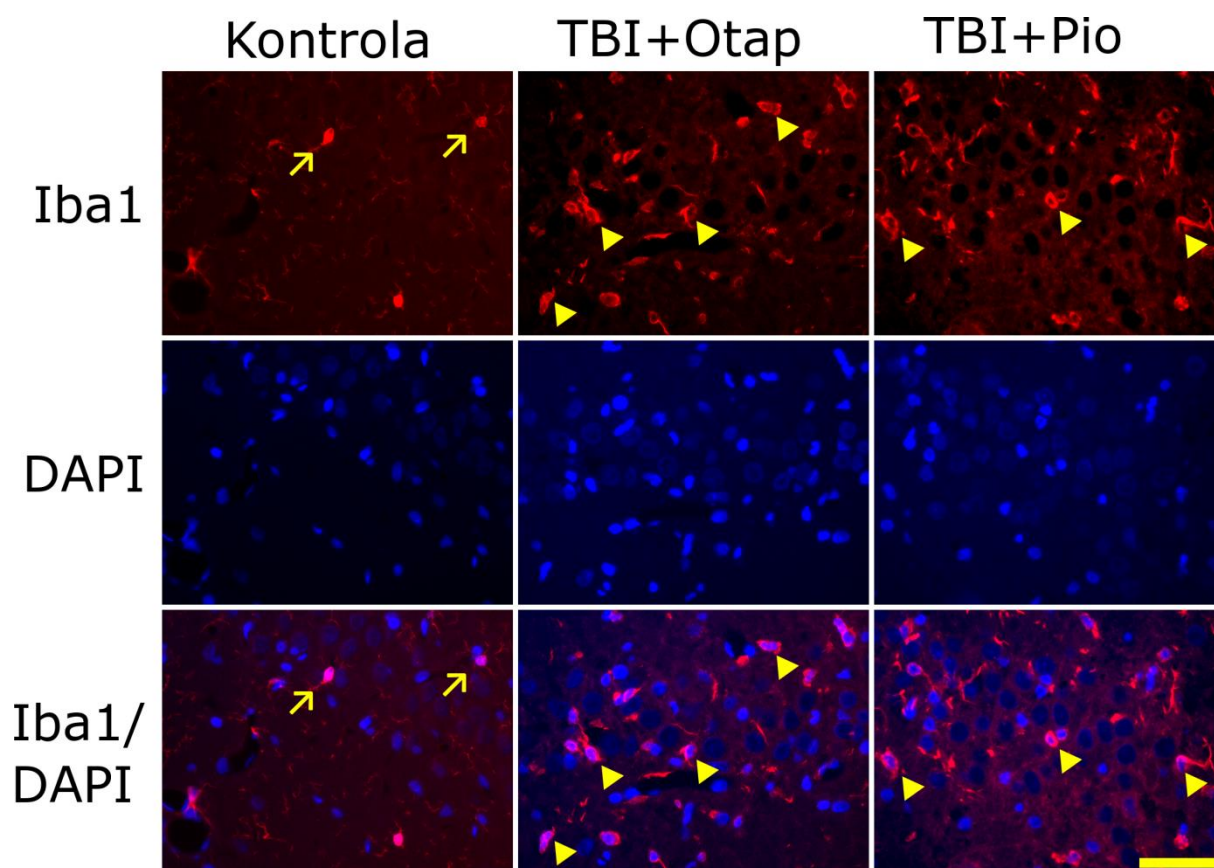
Kako bi prikazali reakciju mikroglije u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga, odredili smo morfološke promjene mikroglijalnih stanica pomoću Iba1 imunofluorescencije u kombinaciji s DAPI bojanjem te kvantificirali broj Iba1 pozitivnih stanica. Na Slikama broj 8-11., koje prikazuju područje parijetalnog korteksa (Slika 8.) te pojedine regije hipokampusa: CA2 (Slika 9.), CA3 (Slika 10.) i DG (Slika 11.), možemo vidjeti da su u uzorcima kontrolne skupine životinja prisutne stanice mikroglije s malim staničnim tijelima i tankim, razgranatim nastavcima. U grupi ozlijeđenih štakora tretiranih otapalom broj mikroglijalnih stanica, karakteriziranih promijenjenim oblikom, tj. karakterističnom hipertrofičnom, ameboidnom ili šipkastom morfologijom, prisutan je veći broj Iba1 pozitivnih stanica.

Kvantifikacija Iba1 pozitivnih stanica (Slika 12.) pokazala je da postoji statistički značajan utjecaj primjene pioglitazona na reakciju mikroglije u životinja nakon traumatske ozljede mozga u DG regiji hipokampusa [ $F(2,6)=20,835$ ;  $P=0,002$ ] (Slika 12.D). Suprotno tome, u parijetalnom korteksu [ $F(2,6)=5,677$ ;  $P=0,041$ ] (Slika 12.A), te CA2 [ $F(2,6)=7,280$ ;  $P=0,0249$ ] (Slika 12.B) i CA3 [ $F(2,6)=15,494$ ;  $P=0,004$ ] (Slika 12.C.) regijama hipokampusa primjena lijeka nije utjecala na traumom izazvanu mikroglijalnu aktivaciju.

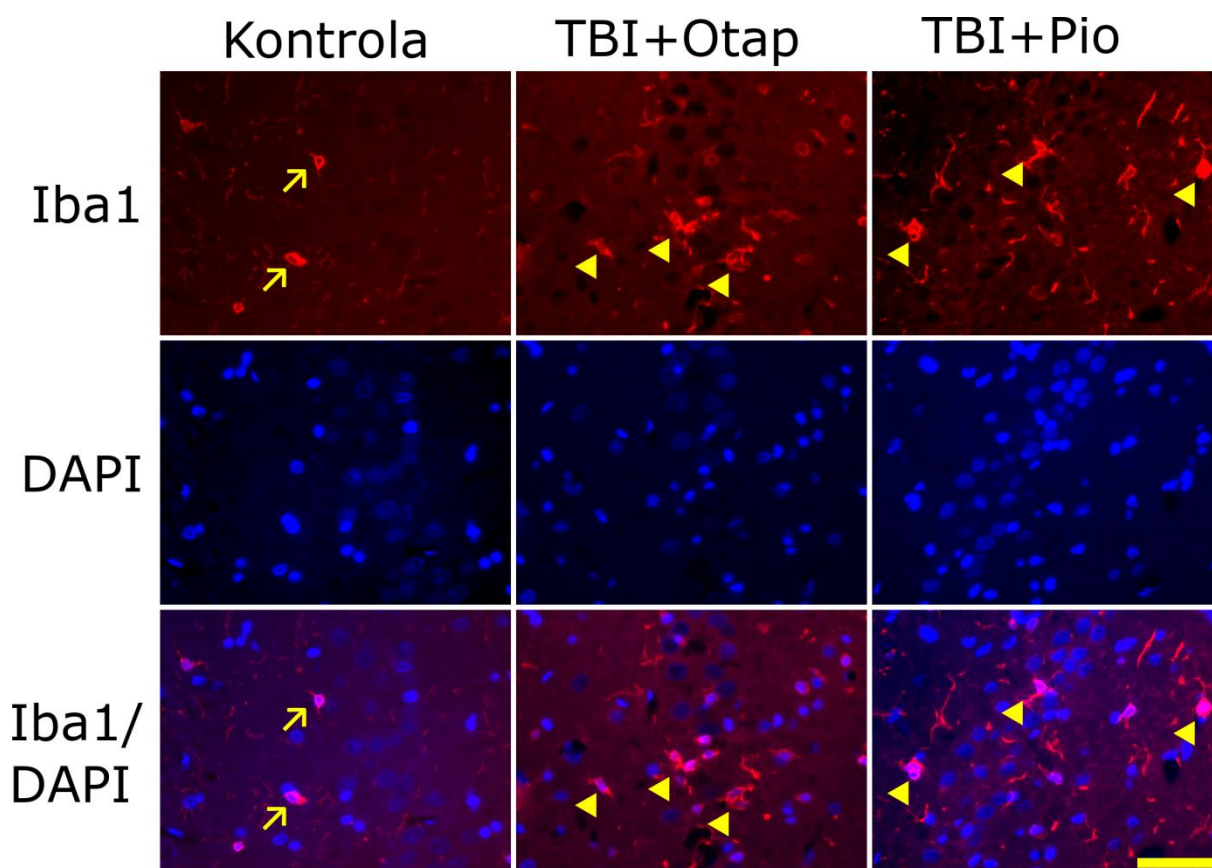


**Slika 8.** Učinak pioglitazona na reakciju mikroglije u parijetalnom korteksu (PC) štakora s traumatskom ozljedom mozga. Prikazane su mikrofotografije prereza mozgova životinja kontrolne skupine (Kontrola), te ozlijeđenih štakora tretiranih otapalom (TBI+Otap) ili pioglitazonom (TBI+Pio) na kojima su crvenim fluorescentnim bojanjem označene stanice imunoreaktivne na mikroglija/makrofagni marker Iba1 uz kontraobojanje jezgri plavom DAPI bojom. Strelice pokazuju mirujuće Iba1 imunoreaktivne stanice s malim staničnim tijelom i tankim, razgranatim nastavcima. Glave strelica pokazuju aktivirane stanice mikroglije karakteristične hipertrofične, ameboidne ili šipkaste morfologije. Linija skale: 50  $\mu\text{m}$ .

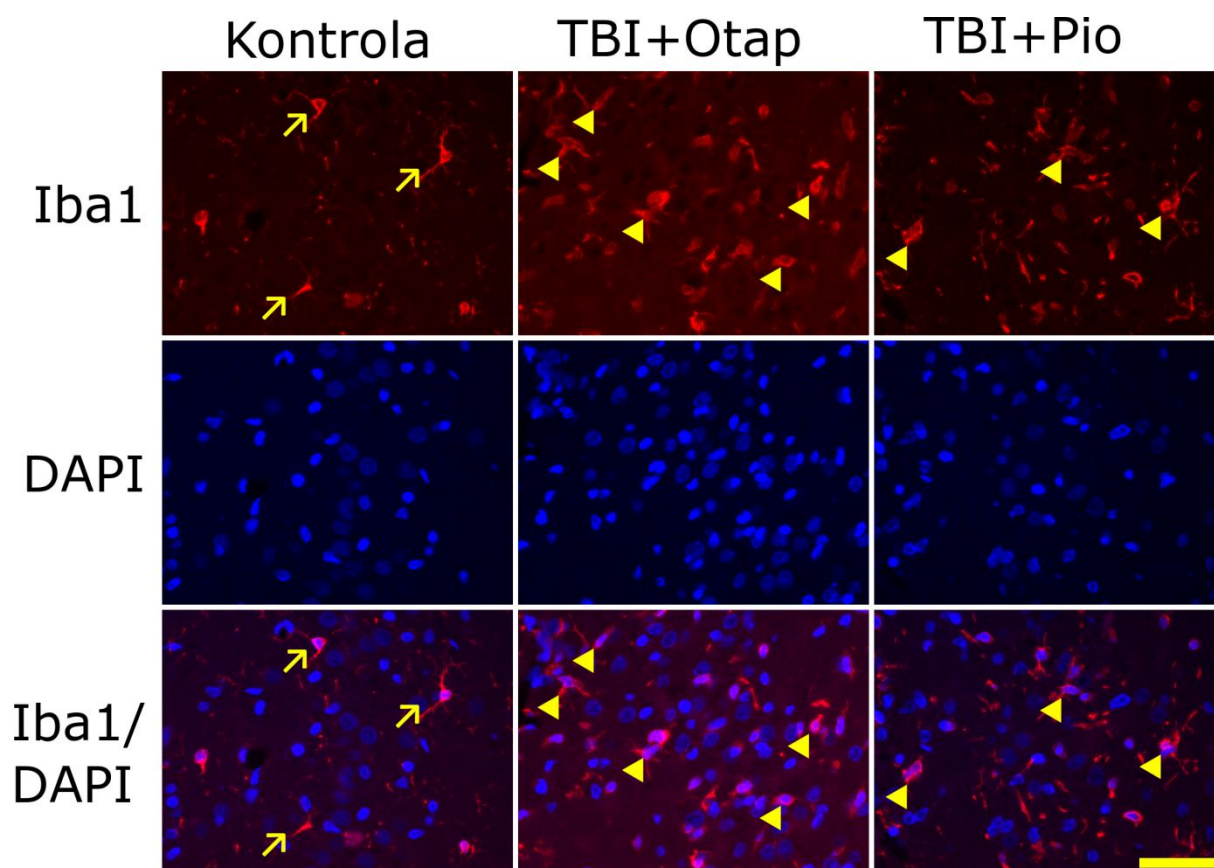




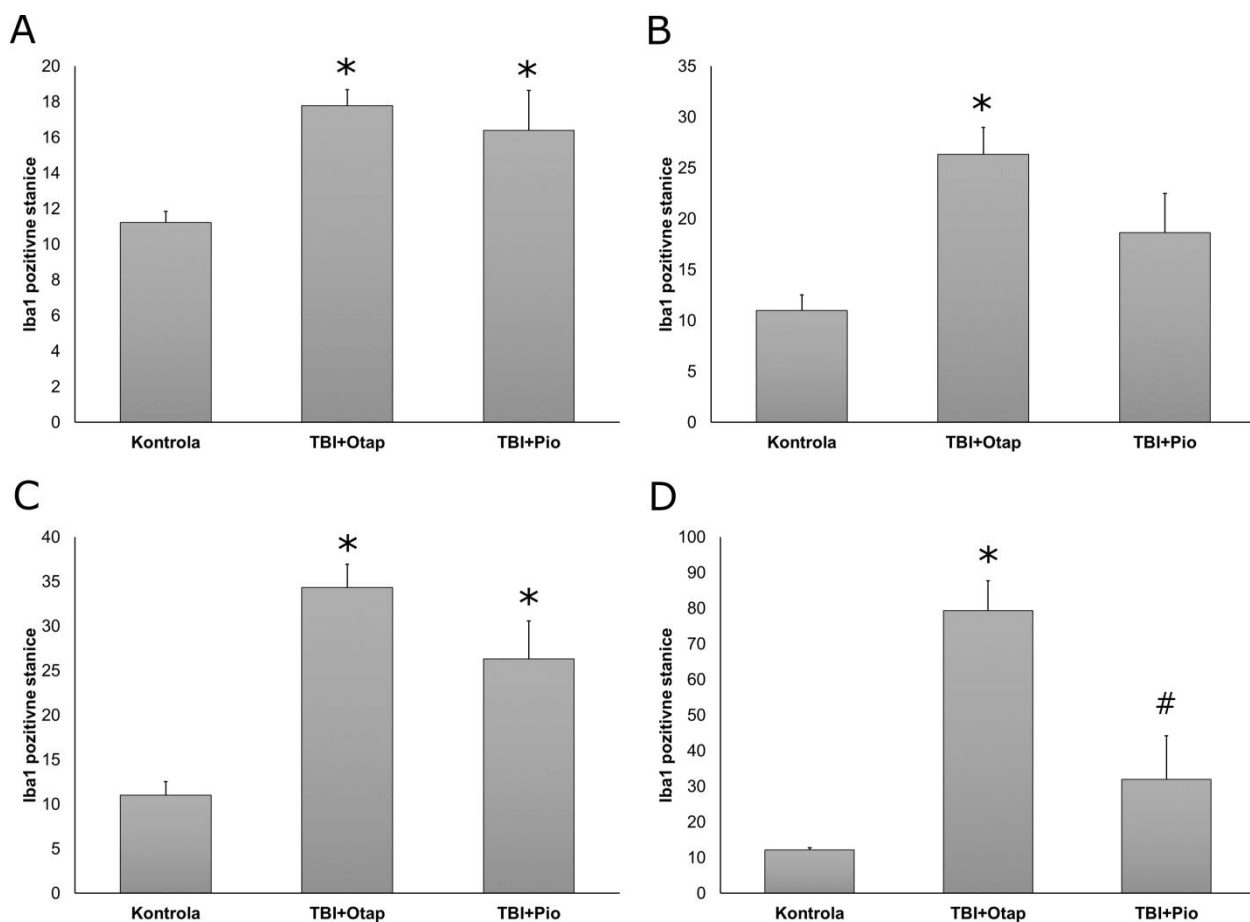
**Slika 9.** Učinak pioglitazona na reakciju mikroglije u CA2 regiji hipokampusa štakora s traumatskom ozljedom mozga. Prikazane su mikrofotografije prereza mozgova životinja kontrolne skupine (Kontrola), te ozlijeđenih štakora tretiranih otapalom (TBI+Otap) ili pioglitazonom (TBI+Pio) na kojima su crvenim fluorescentnim bojanjem označene stanice imunoreaktivne na mikroglija/makrofagni marker Iba1 uz kontraobojanje jezgri plavom DAPI bojom. Strelice pokazuju mirujuće Iba1 imunoreaktivne stanice s malim staničnim tijelom i tankim, razgranatim nastavcima. Glave strelica pokazuju aktivirane stanice mikroglije karakteristične hipertrofične, ameboidne ili šipkaste morfologije. Linija skale: 50  $\mu$ m.



**Slika 10.** Učinak pioglitazona na reakciju mikroglije u CA3 regiji hipokampusa štakora s traumatskom ozljedom mozga. Prikazane su mikrofotografije prereza mozgova životinja kontrolne skupine (Kontrola), te ozlijeđenih štakora tretiranih otapalom (TBI+Otap) ili pioglitazonom (TBI+Pio) na kojima su crvenim fluorescentnim bojanjem označene stanice imunoreaktivne na mikroglija/makrofagni marker Iba1 uz kontraobojanje jezgri plavom DAPI bojom. Strelice pokazuju mirujuće Iba1 imunoreaktivne stanice s malim staničnim tijelom i tankim, razgranatim nastavcima. Glave strelica pokazuju aktivirane stanice mikroglije karakteristične hipertrofične, ameboidne ili šipkaste morfologije. Linija skale: 50  $\mu$ m.



**Slika 11.** Učinak pioglitazona na reakciju mikroglije u dentatnom girusu (DG) hipokampusa štakora s traumatskom ozljedom mozga. Prikazane su mikrofotografije prereza mozgova životinja kontrolne skupine (Kontrola), te ozlijeđenih štakora tretiranih otapalom (TBI+Otap) ili pioglitazonom (TBI+Pio) na kojima su crvenim fluorescentnim bojanjem označene stanice imunoreaktivne na mikroglija/makrofagni marker Iba1 uz kontraobojanje jezgri plavom DAPI bojom. Strelice pokazuju mirujuće Iba1 imunoreaktivne stanice s malim staničnim tijelom i tankim, razgranatim nastavcima. Glave strelica pokazuju aktivirane stanice mikroglije karakteristične hipertrofične, ameboidne ili šipkaste morfologije. Linija skale: 50  $\mu\text{m}$ .



**Slika 12.** Učinak pioglitazona na reakciju mikroglije u parijetalnom korteksu (A) te CA2 (B), CA3 (C) i DG (D) regijama hipokampusa u štakora s traumatskom ozljedom mozga. Prikazani su histogrami s rezultatima kvantifikacije broja Iba1 pozitivnih stanica (A-D) u životinja kontrolne skupine (Kontrola), te ozlijeđenih štakora tretiranih otapalom (TBI+Otap) ili pioglitazonom (TBI+Pio). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti  $\pm$  SEM (n=3). \* $P < 0,05$ ; značajno različito od Kontrole; # $P < 0,05$ ; značajno različito od TBI+Otap.

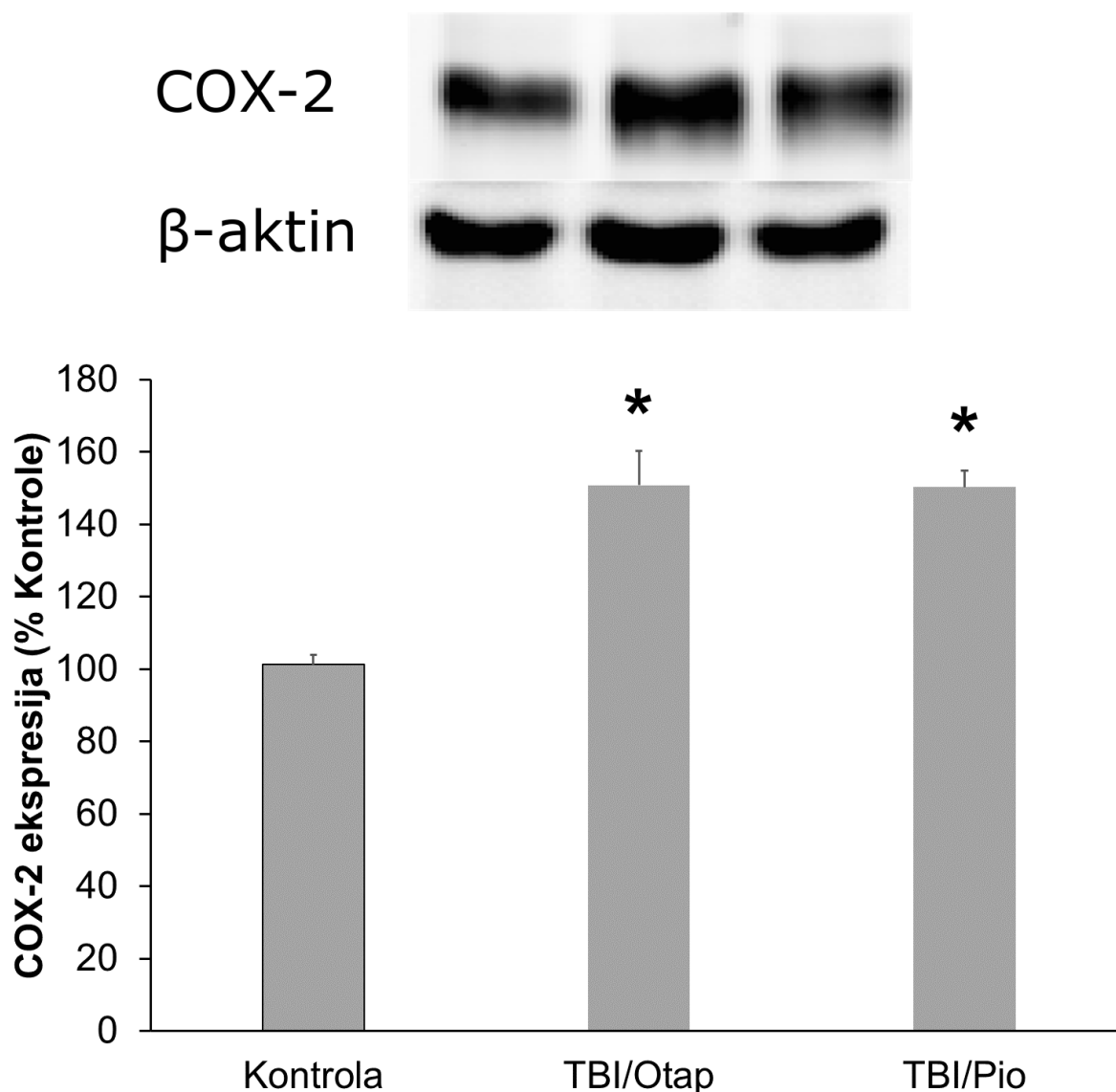
### **4.3. Utjecaj pioglitazona na ekspresije parametara upale i staničnog stresa u hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga**

S obzirom na to da smo utjecaj primjene pioglitazona na mikrogliju uočili samo u DG regiji hipokampusa, odlučili smo Western-Blot analizom izanalizirati samo tu regiju. Već od prije je poznato kako pioglitazon utječe na ekspresiju COX-2, iNOS te HSP70, vođeni time i sami smo učinili analizu ekspresije istih. Uzorke blotova štakora eksperimentalnih skupina i pripadajućih denzitometrijskih analiza blotova COX-2, iNOS te HSP70 korigirane su za vrijednosti ekspresije  $\beta$ -aktina i prikazane kao udio Kontrole.

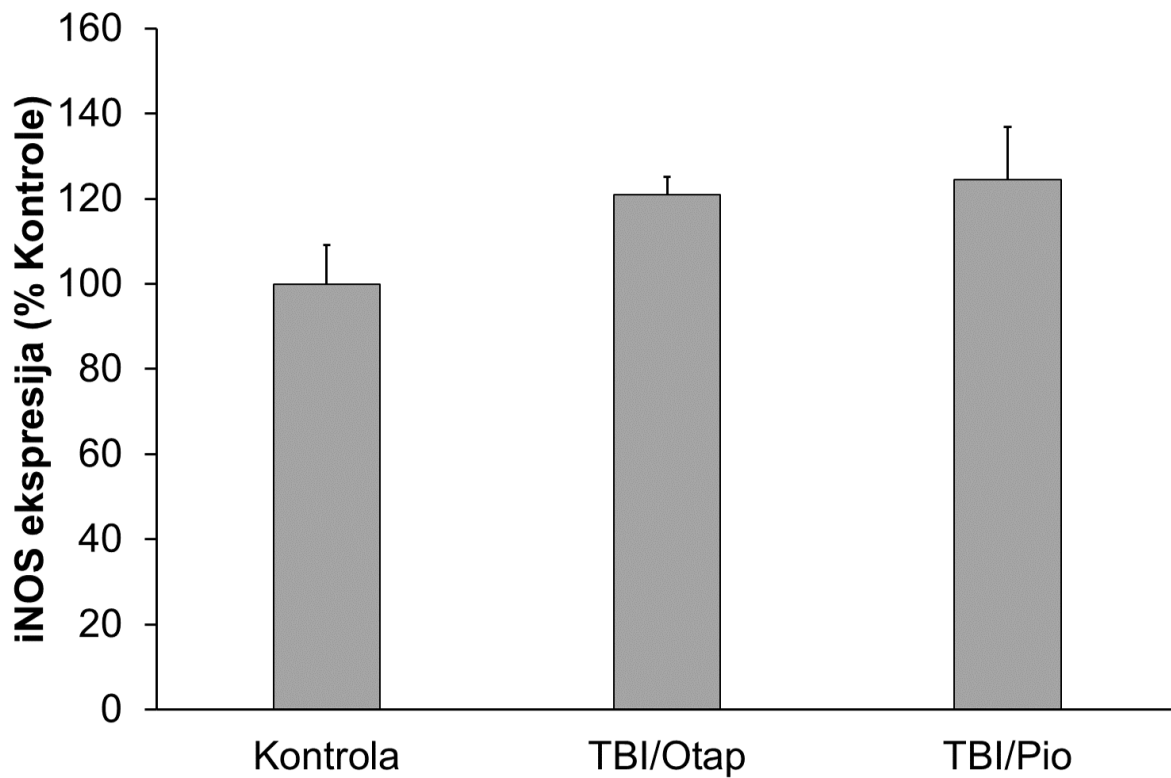
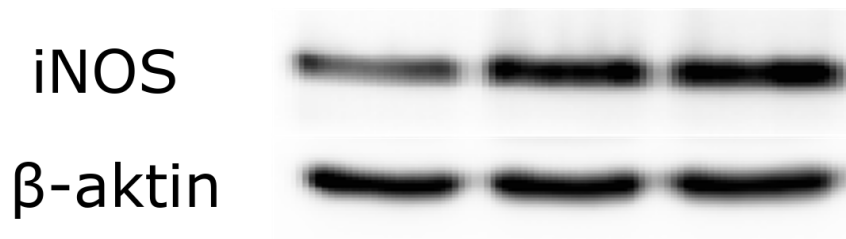
Iz rezultata vidljivih na Slici 13. uočljivo je da se ekspresija COX-2 u hipokampusu skupine štakora tretirani otapalom i skupine štakora tretiranih pioglitazonom nakon traumatske ozljede mozga, značajno razlikuje od kontrolne skupine. Utjecaj pioglitazona na skupinu tretiranih štakora nije statistički značajan [ $F(2,9)=21,136$ ;  $P < 0,001$ ].

Nadalje, ANOVA analiza nije pokazala statistički značajan utjecaj pioglitazona na ekspresiju iNOS u hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga [ $F(2,9)=2,049$ ;  $P=0,185$ ] (Slika 14.).

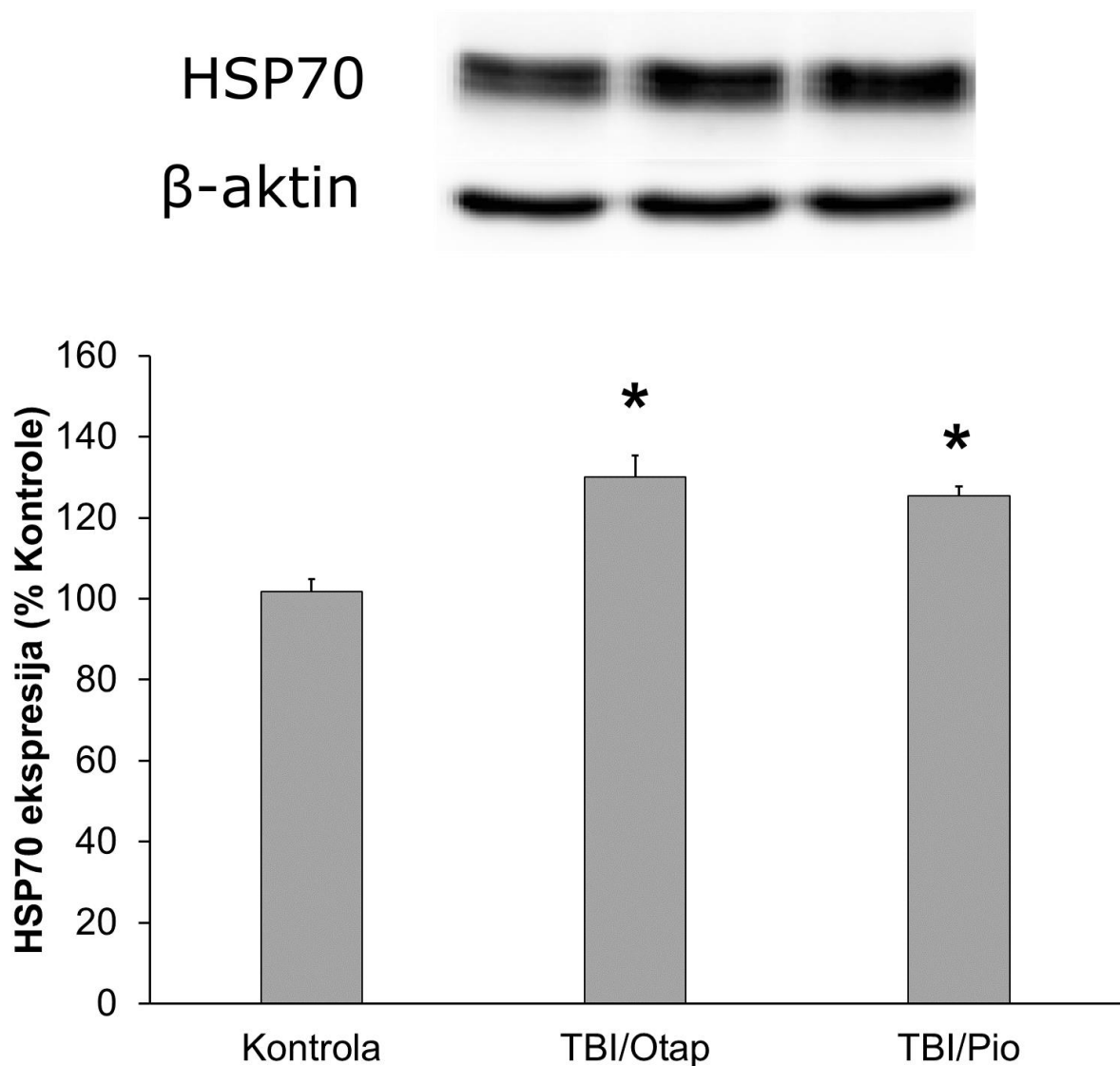
Ekspresija HSP70 u hipokampusu skupine štakora tretirani otapalom i skupine štakora tretiranih pioglitazonom nakon traumatske ozljede mozga, značajno razlikuje od kontrolne skupine. Utjecaj pioglitazona na skupinu tretiranih štakora nije statistički značajan [ $F(2,9)=15,613$ ;  $P=0,001$ ] (Slika 15.).



**Slika 13.** Učinak pioglitazona na ekspresiju COX-2 u ipsilateralnom hipokampusu štakora 24 sata nakon TBI. Prikazani su reprezentativni uzorci blotova štakora eksperimentalnih skupina i pripadajuće denzitometrijske analize blotova COX-2, korigiranih za vrijednosti ekspresije  $\beta$ -aktina i prikazanih kao udio Kontrole (%). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). Životinje kontrolne skupine (Kontrola), ozlijeđeni štakori tretirani otapalom (TBI+Otap) ili pioglitazonom (TBI+Pio). \* $P < 0,05$ ; značajno različito od Kontrole.



**Slika 14.** Učinak pioglitazona na ekspresiju iNOS u ipsilateralnom hipokampusu štakora 24 sata nakon TBI. Prikazani su reprezentativni uzorci blotova štakora eksperimentalnih skupina i pripadajuće denzitometrijske analize blotova iNOS, korigiranih za vrijednosti ekspresije  $\beta$ -aktina i prikazanih kao udio Kontrole (%). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). Životinje kontrolne skupine (Kontrola), ozlijeđeni štakori tretirani otapalom (TBI+Otap) ili pioglitazonom (TBI+Pio).



**Slika 15.** Učinak pioglitazona na ekspresiju HSP70 u ipsilateralnom hipokampusu štakora 24 sata nakon TBI. Prikazani su reprezentativni uzorci blotova štakora eksperimentalnih skupina i pripadajuće denzitometrijske analize blotova HSP70, korigiranih za vrijednosti ekspresije  $\beta$ -aktina i prikazanih kao udio Kontrole (%). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). Životinje kontrolne skupine (Kontrola), ozlijeđeni štakori tretirani otapalom (TBI+Otap) ili pioglitazonom (TBI+Pio). \* $P < 0,05$ ; značajno različito od Kontrole.



## **5. RASPRAVA**

### **5.1. Utjecaj pioglitazona na neurodegeneraciju u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga**

Kako bi odredili utjecaj pioglitazona na neurodegeneraciju nakon traumatske ozljede mozga, koristili smo Fluoro-Jade C bojanje. Fluoro Jade C je anionski fluorescentni derivat koji je koristan kod histološkog bojanja neurona podvrgnutih degeneraciji. Koristan je zbog toga što boja samo degenerativne neurone s minimalnim bojanjem pozadine. Idealan je za lokalizaciju ne samo degenerirajućih neurona, nego i udaljenih dendrita, aksona i terminala. Boja je vrlo otporna na blijeđenje i kompatibilna je s gotovo svim histološkim metodama bojanja. (Schmued i sur., 2005.).

U ovom radu je prikazano značajno oštećenje u parijetalnom korteksu te regijama hipokampusa, CA2, CA3 i dentatnom girusu, u štakora s traumatskom ozljedom mozga. Dobiveni rezultati su u skladu s ostalim istraživanjima neurodegeneracije nakon TBI u kojima se koristilo bojanje Fluoro-Jade C ili nekim drugim metodama bojanja poput: kiseli fuksin, imunohistokemija i bojanje srebrom (Hicks i sur., 1996.; Sato i sur., 2001.). Također, uspoređujući skupinu štakora tretiranih s pioglitazonom sa skupinom štakora tretiranih otapalom, možemo reći da ne postoji statistički značajan utjecaj pioglitazona na neurodegeneraciju u parijetalnom korteksu te regijama hipokampusa.

### **5.2. Utjecaj pioglitazona na reakciju mikroglije u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga**

Mikroglija je važna imuna stanica moždanog sustava koja služi kao makrofag koji pomaže razvoju mozga, održavanju okoline te kao odgovor na ozljedu i popravak iste (Orihuela i sur., 2016.). Njezina neuroupalna uloga je prepoznata kod ozljeda i bolesti CNS-a

uključujući TBI, kao produkcija različitih proupalnih faktora poput citokina i slobodnih radikala (Frank-Cannon i sur., 2009.).

Ekspresija Iba1 stanica je najviša u testisima i slezeni, a rijetka je u mozgu, plućima i bubrezima. U moždanim stanicama, ekspresija Iba1 je najviša u mikrogliji. Zbog toga se Iba1 protein koristi kao adaptorna molekula koja je medijator kalcijevih signala (Imai i sur., 1996.). U radu Pilipović i sur., (2015.), kao i u ovom radu je prikazan te uočen porast Iba1 pozitivno obojenih stanica u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga. Morfologija stanica mikroglije u parijetalnom korteksu i hipokampusu kod kontrolne grupe štakora je izražena u vidu malih staničnih tijela, s tankim i razgranatim nastavcima. Ako usporedimo kontrolnu skupinu sa skupinom ozlijeđenih štakora koji su primili otapalo možemo reći da su stanice mikroglije promijenile svoj oblik, tj. pojava hipertrofične, ameboidne ili šipkaste morfologije. Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima koji su već prije opisali aktivaciju mikroglije u ostalim TBI modelima (Rowe i sur., 2014.). Također, rezultati u ovom radu prikazuju kako pioglitazon utječe na reakciju mikroglije samo u dentatnom girusu hipokampusa štakora s traumatskom ozljedom mozga u vidu smanjenja Iba1 pozitivnih stanica dok je u radu Pilipović i sur., (2015.) primjena samo jedne doze pioglitazona značajno utjecala na smanjenje broja Iba1 pozitivnih stanica u parijetalnom korteksu. Utjecaj pioglitazona je također opisan u radu (Sauerbeck i sur., 2011.), ali na drugom modelu traumatske ozljede mozga (CCI), primjenjujući češće i veće doze pioglitazona (10 mg/kg nakon 15 min od TBI, te nakon 24 h, 48 h, 72 h i 96 h.). Koliko nam je poznato ovo je prvo istraživanje utjecaja pioglitazona na reakciju mikroglije u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga.

### **5.3. Utjecaj pioglitazona na ekspresije parametara upale i staničnog stresa u hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga**

Neuropala kao posljedica TBI nastaje nakon aktivacije zaostalih astrocita i mikroglije. TBI je patološka ozljeda s kompleksnom interakcijom između mozga, periferije te imunog sustava. Iako sve stanice mozga mogu proizvesti proupalne citokine, mikroglija je najviše zastupljena u proizvodnji istih. Uz proupalne citokine, također proizvodi kemokine i ostale upalne gene koji mogu narušiti funkciju krvno-moždane barijere, što može dovesti do privlačenja imunih stanica iz periferije. Ove stanice mogu dodatno naglasiti upalu CNS-a što može dovesti do smrti neurona i disfunkcije mozga nakon TBI (Xiong i sur., 2018.) U ovom radu ispitan je utjecaj pioglitazona na ekspresije pojedinih parametara upale i staničnog stresa u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga.

COX-2 je inducirana izoforma COX enzima, koja se može naći u upalnim stanicama i mozgu (predominantna izoforma u mozgu). COX-2 ima važnu ulogu u cerebrovaskularnoj homeostazi, ali s druge strane pretjerana ekspresija COX-2 može biti štetna. Kod patoloških stanja poput trauma, ishemija i kroničnih degenerativnih stanja, COX-2 proizvodi ROS i toksične metabolite prostaglandina koji mogu dodatno pogoršati ozljedu. COX-1 i COX-2 su povećani nakon TBI. Međutim, tretman s COX-2 inhibitorima u modelu TBI dovodi do kontradiktornih rezultata, gdje pojedine studije pokazuju korist terapije, a druge štetnost ili nedjelotvornost (Hickey i sur., 2007.).

Rezultati iz ovog rada pokazuju da se ekspresija COX-2 u hipokampusu skupine štakora tretiranih otapalom i skupine štakora tretiranih pioglitazonom nakon traumatske ozljede mozga, značajno povećala u usporedbi s kontrolnom skupinom. Ovi rezultati su u skladu s prethodnim istraživanjem od Kunz i sur., (2002.). Utjecaj pioglitazona na skupinu tretiranih štakora nije se pokazao statistički značajnim. Koliko nam je poznato ovo je prvo istraživanje

utjecaja pioglitazona na ekspresiju COX-2 u hipokampusu štakora u modelu traumatske ozljede mozga.

iNOS je izoforma sintaze dušikova oksida (engl. *nitric oxide synthase*, NOS) i ekspresiran je u makrofagima kao odgovor na proupalne citokine ili endotoksine, te za razliku od ostalih izoforma, ne dolazi do ekspresije ukoliko nije inducirana citokinima. Može proizvesti velik broj NO. Nakon indukcije, iNOS stalno proizvodi NO sve dok se enzim ne degradira. Studije pokazuju da NO deriviran iz iNOS-a doprinosi neurotoksičnosti nakon ishemijskog napada. Također postoje dokazi da NO deriviran iz iNOS-a doprinosi neurotoksičnosti kod TBI. Ekspresija iNOS-a je uvelike izazvana ozljedama mozga. Pacijenti koji su imali više razine iNOS-a imali su i teže posljedice. Kliničko istraživanje u drugoj fazi (NOSTRA) kod TBI pacijenata koji su koristili NOS inhibitor, je pokazalo značajno poboljšanje mjereno Glasgowskom skalom kome (Garry i sur., 2014.).

Rezultati iz ovog rada pokazuju kako traumatska ozljeda mozga nije imala značajan utjecaj na ekspresiju iNOS u hipokampusu štakora. Također, utjecaj pioglitazona na ekspresiju iNOS u hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga nije bio značajan.

HSP70 je najviše proučavan iz cijele porodice proteina toplinskog šoka. HSP70 može prevenirati reakciju na proupalne citokine. Povezan je sa smanjenjem produkcije TNF-a i IL-1 $\beta$ . On može utjecati i na ostale proteine i gene koji su uključeni u upalni odgovor. Spominje se da Hsp70 može djelovati sa NF $\kappa$ B, I $\kappa$ B, te spriječiti I $\kappa$ B fosforilaciju i disocijaciju NF $\kappa$ B (Kim i sur., 2012.).

Rezultati iz ovog rada pokazuju kako je traumatska ozljeda imala značajan utjecaj na ekspresiju HSP70 u skupini štakora tretiranih otapalom te u skupini štakora tretiranih pioglitazonom, u odnosu na kontrolnu skupinu. Ovi rezultati su u skladu s istraživanjem

provedenim od strane Truettner i sur., (1999.). Utjecaj pioglitazona na ekspresiju HSP70 u hipokampusu štakora nakon traumatske ozljede mozga nije bio značajan.

## 6. ZAKLJUČCI

1. U parijetalnom korteksu i hipokampusu, uočavamo značajnu razliku između broja degeneriranih stanica u parijetalnom korteksu i dentatnom girusu hipokampusa između skupine ozlijeđenih štakora tretiranih otapalom te ozlijeđenih štakora tretiranih pioglitazonom nakon traumatske ozljede mozga u odnosu na kontrolnu skupinu.
2. U prethodno navedenim skupinama također dolazi do povećane reakcije mikroglije u štakora nakon TBI.
3. U hipokampusu, nakon ozljede mozga uočavamo povećanu ekspresiju COX-2 i HP70.
4. Pioglitazon može značajano utjecati na reakciju mikroglije nakon traumatske ozljede mozga u DG regiji hipokampusa.

## 7. LITERATURA

1. Alder J., Fujioka W., Lifshitz J., Crockett DP., Thakker-Varia S. Lateral fluid percussion: model of traumatic brain injury in mice. *J Vis Exp.* 2011;(54):e3063.
2. Anthonymuthua TS., Kennya EM., Bayır H. Therapies targeting lipid peroxidation in traumatic brain injury. *Brain Res.* 2016;1640(Pt A):57-76.
3. Ansari MA., Roberts KN., Scheff SW. Oxidative stress and modification of synaptic proteins in hippocampus after traumatic brain injury. *Free Radic Biol Med.* 2008;45(4):443-452.
4. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
5. Cattaneo A., Cattane1 N., Begni V., Pariante CM., Riva MA. The human BDNF gene: peripheral gene expression and protein levels as biomarkers for psychiatric disorders. *Transl Psychiatry.* 2016;6(11):e958.
6. Cernak I., O'Connor C., Vink R. Inhibition of cyclooxygenase 2 by nimesulide improves cognitive outcome more than motor outcome following diffuse traumatic brain injury in rats. *Exp Brain Res.* 2002;147:193-199.
7. Choi SH., Aid S., Caracciolo L., Minami SS., Niikura T., Matsuoka Y., Turner RS., Mattson MP. Cyclooxygenase-1 inhibition reduces amyloid pathology and improves memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2013;124(1):59-68.
8. Cornelius C., Crupi R., Calabrese V., Graziano A., Milone P., Pennisi G., Radak Z., Calabrese EJ., Cuzzocrea1 S. Traumatic brain injury: oxidative stress and neuroprotection. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19(8):836-853.

9. Donat CK., Scott G., Gentleman SM., Sastre M. Microglial activation in traumatic brain injury. *Front Aging Neurosci.* 2017;9:208.
10. Faul M., Coronado V. *Handbook of clinical neurology.* 2015;127:3-13.
11. Frank-Cannon TC., Alto LT., McAlpine FE., Tansey MG. Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? *Mol Neurodegener.* 2009;4:47.
12. Garry PS., Ezra M., Rowland MJ., Westbrook J., Pattison KTS. The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment - From bench to bedside. *Exp Neurol.* 2015;263:235-243.
13. Giuliani C., Bucci I., Napolitano G. The role of the transcription factor nuclear factor-kappa B in thyroid autoimmunity and cancer. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:471.
14. Greve MW., Zink BJ. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Mt Sinai J Med.* 2009;76(2):97-104.
15. Grilli M., Memo M. Nuclear factor-kappaB/Rel proteins: a point of convergence of signalling pathways relevant in neuronal function and dysfunction. *Biochem Pharmacol.* 1999;57(1):1-7.
16. Hall ED., Vaishnav RA., Mustafa AG. Antioxidant therapies for traumatic brain injury. *Neurotherapeutics.* 2010;7(1):51-61.
17. Hammad A., Westacott L., Zaben M. The role of the complement system in traumatic brain injury: a review. *J Neuroinflammation.* 2018;15(1):24.
18. Hickey RW., Adelson PD., Johnnides MJ., Davis DS., Yu Z., Rose ME., Chang Y., Graham SH. Cyclooxygenase-2 activity following traumatic brain injury in the developing rat. *Pediatr Res.* 2007;62(3):271-6.



19. Hicks R., Soares H., Smith D., McIntosh T. Temporal and spatial characterization of neuronal injury following lateral fluid-percussion brain injury in the rat. *Acta Neuropathol.* 1996;91(3):236–46.
20. Hinson HE., Rowell S., Schreiber M. Clinical evidence of inflammation driving secondary brain injury: A systematic review. *J Trauma Acute Care Surg.* 2015; 78(1): 184–191.
21. Imai Y., Iwata I., Ito D., Ohsawa K., Kohsaka S. A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;224(3):855–862.
22. Kim N., Kim JY., Yenari MA. Anti-inflammatory properties and pharmacological induction of Hsp70 after brain injury. *Inflammopharmacol.* 2012;20:177–185.
23. Kunz T., Marklund N., Hillered L., Oliw EH. Cyclooxygenase-2, prostaglandin synthases, and prostaglandin H2 metabolism in traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 2002;19(9):1051–64.
24. Langlois JA., Rutland-Brown W., Wald MM. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *J Head Trauma Rehabil.* 2006;21(5):375-8.
25. Lennon S., Ramdharry G., Verheyden G. Physical management for neurological conditions. 4. izdanje. Edinburgh: Elsevier. 2018.
26. Li Z., Srivastava P. Heat-shock proteins. *Curr Protoc Immunol.* 2004;Appendix 1:Appendix 1T.
27. Lye TC., Shores, E.A. Traumatic brain injury as a risk factor for Alzheimer's disease: a review. *Neuropsychol Rev.* 2000;10(2):115-129.
28. Mathew P., Graham DI., Bullock R., Maxwell W., McCulloch J., Teasdale G. Focal brain injury: histological evidence of delayed inflammatory response in a new rodent model of focal cortical injury. *Acta Neurochir Suppl (Wien).* 1994;60:428-430.

29. Marmarou A., Foda MA., van den Brink W., Campbell J., Kita H., Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg.* 1994;80(2):291-300.
30. Mashkouri S., Crowley MG., Liska MG., Corey S., Borlongan CV. Utilizing pharmacotherapy and mesenchymal stem cell therapy to reduce inflammation following traumatic brain injury. *Neural Regen Res.* 2016;11(9):1379–1384.
31. McIntosh TK., Vink R., Noble L., Yamakami I., Fernyak S., Soares H., Faden AL. Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. *Neuroscience.* 1989;28(1):233–244.
32. Nguyen R., Fiest KM., McChesney J., Kwon CS., Jette N., Frolkis AD., Atta C., Mah S., Dhaliwal H., Reid A., Pringsheim T., Dykeman J., Gallagher C., the international incidence of traumatic brain injury: a systematic review and meta-analysis. *Can J Neurol Sci.* 2016;43(6):774-785.
33. Nonaka M., Chen XH., Pierce JE., Leoni MJ., McIntosh TK., Wolf JA., Smith DH. Prolonged activation of NF-kappaB following traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 1999;16(11):1023-1034.
34. O'Connor WT., Smyth A., Gilchrist MD.. Animal models of traumatic brain injury: A critical evaluation. *Pharmacol Ther.* 2011;130(2):106-113.
35. Orihuela R., McPeherson CA., Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol.* 2016;173(4):649–665.
36. Pangilinan PH. Classification and complications of traumatic brain injury. 2018. <https://emedicine.medscape.com>, pristupljeno 28. svibnja 2019.
37. Pilipović K., Župan Ž., Dolenc P., Mršić-Pelčić J., Župan G. A single dose of PPAR $\gamma$  agonist pioglitazone reduces cortical oxidative damage and microglial reaction

- following lateral fluid percussion brain injury in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2015 Jun 3;59:8-20.
38. Ponsford JL., Downing MG., Olver J., Ponsford M., Acher R., Carty M., Spitz G. Longitudinal follow-up of patients with traumatic brain injury: outcome at two, five, and ten years post-injury. *J Neurotrauma*. 2014;31(1):64-77.
39. Radons J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress Chaperones*. 2016 May;21(3):379-404.
40. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Phil Trans R Soc B*. 2006;361:1545–1564.
41. Rocha AB., Zanoni C., De Freitas GR., André C., Himelfarb S., Schneider RF., Grivicich I., Borges L., Schwartzmann G., Kaufmann M., Regner A. Serum Hsp70 as an early predictor of fatal outcome after severe traumatic brain injury in males. *J Neurotrauma*. 2005;22(9):966–977.
42. Rock KL., Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:99-126.
43. Rostami E., Krueger F., Zoubak S., Dal Monte O., Raymond V., Pardini M., Hodgkinson CA., Goldman D., Risling M., Grafman J.. BDNF polymorphism predicts general intelligence after penetrating traumatic brain injury. *PLoS ONE* 2011;6(11):e27389.
44. Rowe RK., Striz M., Bachstetter AD., Van Eldik LJ., Donohue KD., O'Hara BF., Lifshitz J. Diffuse brain injury induces acute post-traumatic sleep. *PLoS One* 2014;9(1):e82507.
45. Sauerbeck A., Gao J., Readnower R., Liu M., Pauly JR., Bing G., Sullivan PG. Pioglitazone attenuates mitochondrial dysfunction, cognitive impairment, cortical

- tissue loss, and inflammation following traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 2011;227(1):128–35.
46. Saper CB., Breder CD. Endogenous pyrogens in the CNS: role in the febrile response. *Prog Brain Res.* 1992;93:419-28.
47. Sato M., Chang E., Igarashi T., Noble LJ. Neuronal injury and loss after traumatic brain injury: time course and regional variability. *Brain Res.* 2001;917(1):45–54.
48. Schmidt OI., Heyde CE., Ertel W., Stahel PF. Closed head injury - an inflammatory disease? *Brain Res Brain Res Rev.* 2005;48(2):388-99.
49. Schmued LC., Stowers CC., Scallet AC., Xu L. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res.* 2005;21;1035(1):24-31.
50. Tagliaferri F., Compagnone C., Korsic M., Servadei F., Kraus J. A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochir.* 2006;148:255–268.
51. Truettner J., Schmidt-Kastner R., Busto R., Alonso OF., Loo JY., Dietrich WD., Ginsberg MD. Expression of brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, and heat shock protein HSP70 following fluid percussion brain injury in rats. *J Neurotrauma.* 1999 Jun;16(6):471-86.
52. Tyagi, S., Sharma, S., Gupta, P., Saini, A., & Kaushal, C. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research,* 2011;2(4), 236.
53. Welch WJ. Heat shock proteins as biomarkers for stroke and trauma. *Am J Med.* 2001;111:669 – 670.
54. Xiong Y., Mahmood A., Chopp M. Current understanding of neuroinflammation after traumatic brain injury and cell-based therapeutic opportunities. *Chin J Traumatol.* 2018;21(3):137-151.

## Popis skraćenica

•OH - hidroksilni radikal

Arg – arginin

BDNF - neurotrofni čimbenik rasta (engl. *brain-derived neurotrophic factor*)

BSA - albumin goveđi serum (engl. *Bovine serum albumin*)

C° - stupnjeva Celzijevih

CAT – katalaza

CBF – moždani protok krvi (engl. *Cerebral Blood Flow*)

CCI - model kontroliranog kortikalnog udara (engl. *controlled cortical impact*)

CO<sub>3</sub><sup>•-</sup> -karbonat

COX – ciklooksigenaza (engl. *cyclooxygenase*)

DAPI - 4', 6'-diamino-2-fenilindol dihidroklorid (engl. *4',6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride*)

DG – dentatni girus

dH<sub>2</sub>O – destilirana voda

GCS – Glasgowska skala kome (engl. *Glasgow Coma Scale*)

GSH - reducirani glutation

GSH-Px - glutation peroksidaza

GSSG - oksidirani glutation

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -vodikov peroksid

HO<sub>2</sub><sup>•</sup> - hidroperoksilni radikal

HOCl - hipoklorna kiselina

HSPs - Proteini toplinskog šoka (engl. *heat-shock proteins*)

Iba1 - ionizirana kalcij-vezujuća adaptorska molekula 1 (engl. *Ionized calcium binding adaptor molecule*)

iNOS – inducirana sintaza dušikova oksida

i.p. – intraperitonealno

kDa – kilodalton

LFPI - model lateralne ozljede tlakom tekućine (engl. *lateral fluid percussion injury*)

LOOH – lipidni peroksid

LOX – lipooksigenaza

min – minuta

ml – mililitar

mM – milimol

NFκB - Nuklearni čimbenik kapa B (engl. *nuclear factor kappa B*)

NGF - čimbenik rasta neurona (engl. *nerve growth factor*)

NO - dušikov (II) oksid

NO<sub>2</sub> - dušikov (IV) oksid

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - nitrat

NOS - sintaza dušikovog oksida

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - superoksidni anion

ONOO<sup>-</sup> - peroksinitrit

ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup> - nitrozoperoksikarbonat

ONOOH - peroksinitritna kiselina

PBS – fosfatni pufer

PC – parijetalni korteks

PG – prostaglandin

PLA2 – fosfolipaza A2

PPAR - peroksisom proliferator-aktivirani receptori

PPRE - peroksisom proliferator elemente odgovora (engl. *peroxisome proliferator response elements*)

PUFA - Višestruko nezasićene masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acids*)

RNS – reaktivni dušikov radikal

ROOR - organski peroksidi

ROS – reaktivni kisikov radikal

SAD – Sjedinjene Američke Države

SOD - superoksid dizmutaza

SŽS – Središnji živčani sustav

TBI – Traumatska ozljeda mozga (engl. *traumatic brain injury*)

TBI+Otap – skupina štakora tretiranih otapalom

TBI+Pio – skupina štakora tretiranih pioglitazonom

TrkB - tropomiozin receptor kinaze B (engl. *tropomyosin receptor kinase B*)

TZD – tiazolidindioni

μm – mikrometar



## **Životopis**

### **ANTE SLAVIĆ**

Ante Slavić rođen je 11. ožujka, 1995. u Splitu. Osnovnoškolsko obrazovanje završava u Kninu, 2009. godine. Srednjoškolsko obrazovanje završava 2013. godine u Medicinskoj i kemijskoj školi Šibenik, gdje stiče zvanje farmaceutskeg tehničara. Iduće godine upisuje Zdravstveno veleučilište Zagreb, gdje 2017. godine stiče naziv stručni prvostupnik (baccalaureus) sanitarnog inženjerstva (bacc. sanit. ing.). Iste godine upisuje se na Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci na diplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva.