Utjecaj eritropoetina na ekspresiju SIRT1 u modelu žarišne ishemije mozga u štakora

Dautović, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:340169

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-15**

Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository

zir.nsk.hr

UNIRI DIGITALNA KNJIŽNICA

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

SANITARNOG INŽENJERSTVA

Dautović Lucija

UTJECAJ ERITROPOETINA NA EKSPRESIJU SIRT1 U MODELU ŽARIŠNE ISHEMIJE MOZGA U ŠTAKORA

Diplomski rad

Rijeka, 2021

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

SANITARNOG INŽENJERSTVA

Dautović Lucija

UTJECAJ ERITROPOETINA NA EKSPRESIJU SIRT1 U MODELU ŽARIŠNE ISHEMIJE MOZGA U ŠTAKORA

Diplomski rad

Rijeka, 2021.

Mentor rada: **prof. dr. sc. Jasenka Mršić-Pelčić, dr.med.**

Završni rad obranjen je dana 15.srpnja 2021. u/na Medicinskom fakultetu u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof.dr.sc. Jasenka Mršić-Pelčić, dr.med.

2. prof.dr.sc. Dinko Vitezić, dr.med.

3. prof.dr.sc. Kristina Pilipović, dr.med.

Rad ima 40 stranica, 6 slika, 1 tablicu, 89 literaturnih navoda.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Jasenki Mršić-Pelčić, dr. med. na nesebičnom dijeljenju znanja i savjeta te strpljenju prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Kristini Pilipović, dr. med. na stalnoj dostupnosti, savjetima te pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se Marini Jakovac, med. lab. ing. na svim savjetima, pomoći i pozitivnoj energiji tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se Niki Gržeti, mag. bioteh. u med. i Ljerki Delač, dr.med. na pomoći i savjetima prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Veliko hvala mojim roditeljima na potpori tijekom studiranja.

SAŽETAK

Moždani udar je cerebrovaskularni poremećaj karakteriziran kliničkim znakovima brzog razvoja žarišnih ili globalnih poremećaja cerebralne funkcije. Jedan je od vodećih uzroka invalidnosti i smrtnosti u svijetu uz vrlo ograničene terapijske mogućnosti. Više od 80% moždanih udara je ishemijskog podrijetla, nastalih većinom uslijed okluzije srednje moždane arterije (engl. *middle cerebral artery occlusion* MCAO).

U ovom diplomskom radu ispitivan je učinak rekombinantnog humanog eritropoetina (rhEpo) na ekspresiju i aktivnost SIRT 1 proteina (engl. *silent information regulator two protein 1)*, ekspresiju iNOS-a i GFAP-a te aktivaciju mikroglije u korteksu i/ili hipokampusu štakora izloženih postupku MCAO. Hannover Wistar štakori muškog spola su bili izloženi žarišnoj cerebralnoj ishemiji primjenom metode MCAO tijekom 1 h. Ishemijskim životinjama je aplicirano ili otapalo ili rhEpo (5000 IU/kg, i.p.), 3 h nakon indukcije ishemije. Lažno operirane životinje su korištene kao kontrolna skupina. Životinje su žrtvovane 24 h nakon indukcije ishemije. Dobiveni rezultati pokazuju da je primjena rhEpo izazvala statistički značajan porast ekspresije SIRT1 proteina u korteksu ishemičnih životinja u usporedbi s kontrolnim skupinama. U radu nisu zabilježene značajnije promjene razine ekspresije iNOS-a i GFAP-a u ispitivanim regijama mozga. U hipokampusu ishemičnih životinja zabilježeno je smanjenje broja aktiviranih mikroglija stanica uslijed primjene rhEpo no dobiveni podaci nisu statistički značajni.

Ključne riječi: ishemijski moždani udar, MCAO, eritropoetin, SIRT1, štakori

SUMMARY

Stroke is a cerebrovascular disorder characterized by clinical signs of rapid development of focal or global disorders of cerebral function. It is one of the leading causes of disability and mortality in the world with very limited therapeutic possibilities. More than 80% of strokes are of ischemic origin, caused mostly by middle cerebral artery occlusion (*middle cerebral artery occlusion,* MCAO). The purpose of this thesis was to investigate the effect of recombinant human erythropoietin (rhEpo) on the expression and activity of SIRT 1 protein (*silent information regulator two protein 1*), the expression of iNOS and GFAP and the activation of microglia in the cortex and / or hippocampus of rats exposed to MCAO procedure. Hannover Wistar male rats were exposed to focal cerebral ischemia using the MCAO method for 1 h. Ischemic animals were administered either a solvent or rhEpo (5000 IU / kg, i.p.), 3 h after induction of ischemia. Falsely operated animals were used as a control group. Animals were sacrificed 24 h after induction of ischemia. The obtained results show that the administration of rhEpo caused a statistically significant increase in the expression of SIRT1 protein in the cortex of ischemic animals compared to the control groups. No significant changes in the level of iNOS and GFAP expression in the examined brain regions were observed. In the hippocampus of ischemic animals, a decrease in the number of activated microglial cells was observed due to the use of rhEpo, but the obtained data are not statistically significant.

Key words: ischemic stroke, MCAO, erythropoietin, SIRT1, rats

Sadržaj

1. Uvod i pregled područja istraživanja 1
1.1. Definicija moždanog udara 1
1.1.1. Ishemijski moždani udar 2
1.1.2. Simptomi i znakovi ishemijskog moždanog udara 2
1.1.3. Uloga glija stanica kod ishemijske ozljede 3
1.2. Epidemiologija 4
1.3. Prevencija moždanog udara 6
1.4. Terapija moždanog udara 7
1.5. Ispitivanje neuroprotektivnih lijekova 8
1.5.1. Eksperimentalni modeli ishemijske ozljede mozga 9
1.5.2. Eritropoetin 11
1.5.3. Uloga SIRT 1 12
2. Cilj istraživanja 13
3. Materijali i metode 14
3.1. Eksperimentalne životinje 14
3.2. Okluzija srednje moždane arterije (MCAO) 15
3.3. Priprema tkiva 16
3.4. Imunohistokemijske i imunofluorescencijske analize 16
3.5. Imunoprecipitacija 17
3.6. Western blot analiza 17
3.7. Kvantifikacija proteina 18
3.8. Prikupljanje podataka i statističke analize 18
4. Rezultati 20
4.1. Utjecaj rhEpo na ekspresiju i aktivnost SIRT 1 proteina u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon žarišne ishemije mozga 20

4.2. Utjecaj rhEpo na ekspresiju pokazatelja oksidativnog stresa i razine GFAP-a u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon žarišne ishemije mozga 22

4.3. Utjecaj rhEpo na reakciju mikroglije u girus dentatusu i CA1 regiji hipokampusa štakora nakon žarišne ishemije mozga 25

5. Rasprava 28

5.1. Utjecaj rhEpo na ekspresiju i aktivnost SIRT 1 proteina u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon žarišne ishemije mozga..... 28

5.2. Utjecaj rhEpo na ekspresiju pokazatelja oksidativnog stresa i razine GFAP-a u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon žarišne ishemije mozga 29

5.3. Utjecaj rhEpo na reakciju mikroglije u girus dentatusu i CA1 regiji hipokampusa štakora nakon žarišne ishemije mozga 30

6. Zaključak 31

7. Literatura 32

Životopis..... 40

1. Uvod i pregled područja istraživanja

1.1. Definicija moždanog udara

Iako razmjerno malen, metabolički gledano mozak je vrlo aktivan organ. Čini tek 2,3% ukupne mase, ali troši oko 18% srčanog volumena i 20% od ukupnog kisika u tijelu. (1) Osjetljivim na promjene opskrbe krvlju čine ga velike vaskularne i metaboličke potrebe te nedostatak značajnih energetskih rezervi. Jedna od mogućih posljedica takvih promjena je moždani udar, koji u današnje vrijeme predstavlja važan socijalno-ekonomski i zdravstveni problem u svijetu. (1, 2) Radi se o cerebrovaskularnom poremećaju kojeg karakterizira iznenadna pojava neuroloških simptoma i kliničkih znakova te se definira kao stanje uzrokovao krvarenjem ili začepljenjem moždanih krvnih žila. (3, 4) Nedostatak protoka krvi u mozgu uzrokuje disfunkciju moždanih stanica, oksidativni stres i neurološka oštećenja. (4) Trajna neurološka oštećenja su dokazana kod više od 60% preživjelih. (5)

Prema navodima Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization,* WHO), moždani udar je klinički sindrom definiran kao naglo nastali globalni neurološki deficit ili češće žarišni deficit koji traje dulje od 24 sata ili dovodi do smrti. (6) Ova bolest je visokog stupnja mortaliteta, te ima najveći stupanj invaliditeta. Nakon moždanog udara, 20-30 % osoba nije sposobno za svakodnevni život bez pomoći druge osobe. (7) Osim invalidnosti i smrti, posljedice moždanog udara su demencija i depresija. (8)

Najčešća vrsta moždanog udara je ishemijski moždani udar koji čini 80% svih slučajeva dok na hemoragijski otpada oko 20% svih moždanih udara. (9, 10)

1.1.1. Ishemijski moždani udar

Ishemijski moždani udar je najzastupljeniji te predstavlja glavni uzrok morbiditeta i smrtnosti u svijetu. Pri ishemiji nastupa niz biokemijskih promjena koje ubrzavaju staničnu smrt te dovode do staničnih oštećenja. (11) Dolazi do gubitka neurona te ozljede bijele tvari, što podrazumijeva demijelinizaciju i ozljedu aksona. (12)

Do ishemije dolazi smanjenjem moždanog protoka krvi, o čijem intenzitetu i trajanju ovisi preživljenje moždanog tkiva. (11) Začepljenje krvne žile uskraćuje prijenos kisika i glukoze, a taj nedostatak predstavlja problem jer je mozgu za koordinaciju tjelesnih procesa potrebno oko 20% cjelokupne proizvodnje glukoze i kisika. Poremećaj opskrbe energijom može dovesti do katastrofalne štete jer mozak sam skladišti vrlo malo energije. (13)

Krvna žila u kojoj najčešće dolazi do začepljenja je MCA (engl. *middle cerebral artery*). Ona opskrbljuje mozak s 80% krvi, te predstavlja najveću i najsloženiju moždanu arteriju. Privremeno ili trajno ograničavanje protoka krvi u MCA naziva se okluzija srednje moždane arterije (engl. *middle cerebral artery occlusion*, MCAO). (14, 15)

Ishemijsko oštećenje najveće je u središtu (engl. „*core*“) gdje je protok krvi sveden na minimum dok je u perifernim zonama (engl. „*penumbra*“) donekle očuvan i predstavlja područje koje se pravovremenom intervencijom može sačuvati od širenja infarktne, ishemijske lezije. Najosjetljiviji dijelovi mozga u uvjetima ishemije nalaze se u hipokampusu (CA1 regija), cerebelumu te u slojevima neokorteksa (3 i 5). (11)

1.1.2. Simptomi i znakovi ishemijskog moždanog udara

Simptomi ishemijskog moždanog udara uz lokalizaciju, ovise o veličini zahvaćene krvne žile i području koje opskrbljuje krvlju. (11)

Simptomi ishemijskog moždanog udara:

- Subjektivna slabost ruke i/ili noge
- Poremećaji govora
- Subjektivna slabost lica
- Parestezija ruku i/ili nogu
- Glavobolja
- Vrtoglavica (16)

Znakovi ishemijskog moždanog udara:

- Oštećenje vidnog polja
- Nenormalni pokreti očiju
- Pareza lica, ruku i/ili nogu
- Ataksični hod
- Dizartrija i/ili disfazija (16)

Postoje razlike u simptomima između muškaraca i žena. Kod žena je češće zabilježena opća slabost i promjena mentalnog statusa, dok su kod muškaraca češće zabilježene ataksija, parestezija i dvoslika. (17) Simptomi mogu biti stalno prisutni ili se pojaviti naknadno. Stanje je prolazno ako se simptomi ne zadržavaju duže od dva sata ili su manje uočljivi, te se takvo stanje naziva prolazni ishemijski napad (engl. *transient ischemic attack*, TIA). Nakon prolaznog ishemijskog napada do 80% moždanih udara se može spriječiti, stoga je ključna rana dijagnoza i liječenje. (18)

1.1.3. Uloga glija stanica kod ishemijske ozljede

Važnu ulogu u funkcioniranju središnjeg živčanog sustava (engl. *central nervous system*, CNS) imaju glija stanice mozga. Smatra se da 19 - 40% glija stanica čine astrociti, dok 10% čini mikroglija. Oligodendrociti čine 45-75% svih glija stanica, a preostale stanice su NG2 stanice. Osim što su uključene u razvoj CNS-a te sudjeluju u prilagodljivim i urođenim imunološkim odgovorima, glija stanice pružaju hranjivu i potpornu ulogu u normalnim fiziološkim uvjetima. Mogu osloboditi citokine, „otkriti“ i integrirati signale oštećenja neurona, te na mjesto moždanog udara privući imunosne stanice. Mikroglija stanice su „razgranate“, a to im omogućuje brz i učinkovit imunološki odgovor. (19) Eliminiraju mrtve stanice, mikrobe i druge čestice i topive antigene koji mogu ugroziti CNS. To su prve stanice koje registriraju ishemiju te odmah reagiraju i stupaju u interakcije s drugim stanicama CNS-a. To upućuje na njihovu važnost i složenost u patogenezi moždanog udara. Aktivacija ovih stanica je prvi korak u upalnom odgovoru nakon ishemijske ozljede. Astrociti izlučuju na mjestu ozljede i neurotrofne faktore, citokine, kemokine, reguliraju ravnotežu vode i različitih iona. (20, 21) Registriraju promjene u živčanoj aktivnosti i sastavu izvanstaničnog prostora te imaju bitnu ulogu u održavanju ključnih homeostatskih mehanizama. (22)

1.2. Epidemiologija

Moždani udar, tzv. epidemija 21.stoljeća, zahvaća približno 13,7 milijuna ljudi u svijetu i godišnje ubije oko 5,5 milijuna. (8) Najveća stopa mortaliteta zabilježena je u prvih mjesec dana bolesti. (7) Drugi je uzrok smrtnosti i prvi uzrok invalidnosti u Republici Hrvatskoj. U Sjedinjenim Američkim državama predstavlja vodeći uzrok onesposobljenosti u odrasloj dobi te je treći uzrok po smrtnosti u zemljama zapadne Europe. (23)

Neke studije ukazuju na to da je pojava moždanog udara viša u mlađim dobnim skupinama kod žena, dok se kod muškaraca incidencija povećava starenjem. Incidencija raste godinama, a udvostručuje se nakon 55. godine života. Međutim, između 1990. i 2016. povećala se incidencija moždanih udara u dobnim skupinama od 20 do 54 godine s 12,9% na 18,6% svih slučajeva širom svijeta. No u istom razdoblju, dobno standardizirane stope smrtnosti smanjile su se za 36,2%. (8)

Najniža zabilježena učestalost moždanog udara je u Latinskoj Americi (85–100 na 100 000 stanovnika), a najveća je u Kini (331–378 osoba na 100 000 stanovnika). Druga najviša stopa je u istočnoj Europi (181–218 na 100 000 stanovnika). (8)

Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, u 2019. godini, u Hrvatskoj je od moždanog udara umrlo 5180 osoba (2989 žena i 2191 muškaraca), dok je na liječenju 12 000 – 13 000 osoba. (24) Razlike između žena i muškaraca nisu zabilježene samo u Hrvatskoj već i u drugim zemljama. Prema podacima Eurostata, u svim zemljama EU veći je udio žena (10%) od muškaraca (7%) koji su umrli od moždanog udara. Dvije države članice EU koje su zabilježile najveći udio smrtnih slučajeva zbog moždanog udara su Bugarska (20%) i Rumunjska (19%). (25) Prema statističkim podacima, veći rizik od smrtnosti uzrokovane moždanim udarom imaju žene, a jedan od razloga tomu je njihov duži životni vijek. Uz životni vijek, kao čimbenici se navode trudnoća, tj. rizici povezani s trudnoćom i postporođajnim stanjem, primjena hormonske terapije i kontracepcije te brzi atrijski ritam. Brzi nepravilni atrijski ritam povećava rizik od moždanog udara u žena starijih od 75 godina za 20%. (26, 27, 28, 8)

Uz spolne razlike, rasa i etnička pripadnost također doprinose razlikama u trendovima moždanog udara. U Sjedinjenim Američkim Državama rizici od prvog moždanog udara dvostruko su veći kod Afroamerikanaca nego kod bijelaca, te Afroamerikanci pate od najvećeg broja smrtnosti uzrokovanih moždanim udarom u SAD-u. (26)

Iako se moždani udar klasificira kao hitno medicinsko stanje, te samim time zahtijeva hitnu zdravstvenu skrb, takva skrb nije svima jednako dostupna. (23) Razlog tomu je socioekonomski status koji kao jedna od glavnih odrednica zdravlja, kvalitete života i smrtnosti doprinosi i razlikama u incidenciji moždanog udara. Vrijeme od početka moždanog udara do dolaska u bolnicu je presudan faktor za pravovremeno liječenje. U istraživanju Niklasson i sur. dokazano je kako je pacijentima koji stanuju na područjima nižeg socioekonomskog statusa potrebno dulje vrijeme da dobiju pravovremenu medicinsku skrb. (23, 29*)* Sukladno tome dokazana je veća vjerojatnost invalidnosti kod pacijenata nižeg socioekonomskog statusa. (28) U radu autora Sarikaya i sur. navedeno je kako se u zadnjih 30 godina učestalost moždanog udara smanjila do 42% u razvijenim zemljama, dok je u zemljama u razvoju zabilježen porast veći od 100%. (30)

Čimbenici rizika za nastanak moždanog udara su: arterijska hipertenzija, srčane bolesti, dijabetes, povišene masnoće u krvi, ateroskleroza, promjene hematokrita, povišena razina fibrinogena te migrena tijekom koje može doći do vazokonstrikcije krvne žile. (31, 7) Povezanost migrene i ishemijskog moždanog udara dokazana je kod žena (dob ≤45 godina). (32) WHO kao čimbenike rizika navodi i životni stil: pušenje, nepravilna prehrana, alkohol, depresija i stres, niska razina tjelesne aktivnosti, pretilost, uzimanje nekih lijekova. (33) Oko 2% do 11% ishemijskih moždanih udara posljedica je neobičnih uzroka, kao što je npr. vaskulopatija, dok je njih 15 - 20% posljedica atrijske fibrilacije. (31,34)

1.3. Prevencija moždanog udara

Strategije razvoja prevencije predstavljaju vrlo važan faktor u liječenju moždanog udara. Važnu ulogu u prevenciji imaju način života i prehrana. Potrebno je smanjiti unos soli, šećera i masti. Većim unosom soli povećava se rizik za nastanak ishemijskog i hemoragijskog moždanog udara, dok se manjim unosom smanjuje dijastolički i sistolički krvni tlak. Studije pokazuju kako je smanjenje dijastoličkog krvnog tlaka povezano sa smanjenjem moždanih udara do 50%, dok je smanjenje sistoličkog krvnog tlaka za 2 mm Hg povezano sa smanjenjem moždanog udara za 25%. Poželjno je redovito jesti voće, povrće i ribu te biti umjeren pri konzumaciji alkohola. Prema istraživanjima, blagi do umjereni unos alkohola (≤2 pića dnevno za muškarce i ≤1 piće dnevno za žene) može smanjiti rizik od moždanog udara za 30%. Umjerena konzumacija također je preporučena pri unosu kave i čaja. (30)

Pušenje kao čimbenik rizika dodatno povećava rizike uslijed hormonske terapije i hipertenzije. Istraživanja pokazuju kako je godinu dana nakon prestanka pušenja rizik od moždanog udara smanjen za 50%, dok je za 25 – 30% smanjen prakticiranjem redovite tjelesne aktivnosti. (30)

Osim životnog stila, značajne koristi ima farmakološka terapija. Oralni antikoagulantni lijekovi poput varfarina i aspirina, značajno smanjuju rizik od ishemijskog moždanog udara, posebice u osoba s fibrilacijom atrija. (35, 36, 37) Snižavanjem kolesterola, učinkovitost pokazuju i statini. (38)

1.4. Terapija moždanog udara

U liječenju ishemijskog moždanog udara, kako reverzibilno oštećenje neurona ne bi prešlo u ireverzibilno oštećenje, najvažnija je pravovremena i hitna reakcija. Hitan postupak liječenja moždanog udara podrazumijeva prepoznavanje simptoma bolesti i traženje hitne medicinske pomoći, zatim brz transport i primjenu terapijskih mjera. Pravovremena primjena terapije pridonosi povoljnijem ishodu liječenja, koje bi trebalo biti u specijaliziranim jedinicama za moždani udar (engl. *Stroke units*). (39)

Trenutno, jedini registrirani lijek za liječenje akutnog moždanog udara je rekombinantni tkivni aktivator plazminogena (rtPA). Naime, budući da je za ishemijski moždani udar karakteristično stvaranje ugrušaka i prekid krvotoka, trombolitička terapija bazira se na uklanjanju tih ugrušaka i ponovnoj uspostavi krvotoka, tj. reperfuziji ishemijskog područja. U tom smislu, u terapiji se koristi rtPA, trombolitik koji otapa trombe u pulmonalnim, koronarnim pa tako i cerebralnim arterijama. Do otapanja fibrinskog ugruška dolazi tako što se alteplaza, glikoprotein veže za fibrin i aktivira pretvaranje plazminogena u plazmin. (39,40) Iako je početno mišljenje bilo kako je nužno primijeniti rtPA u prva 3 sata u cilju obnove krvotoka, American Heart Association / American Stroke Association (AHA/ASA) je 2009. godine produljila vremenski okvir za primjenu lijeka na 4,5 sata. (7,41) Iako se klinički ishodi primjenom ove terapije mijenjaju te je Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration,* FDA) odobrila primjenu rekombinantnog tkivnog aktivatora plazminogena (rtPA) u terapiji ishemijskog moždanog udara, rizik ipak postoji. Primjena rtPA može dovesti do intracerebralnog krvarenja te posljedično smrti i invalidnosti. Uz krvarenje, njegovu široku upotrebu ograničava i uski vremenski okvir. (42, 4, 43, 44)

U slučaju značajnije okluzije arterije ili ako se primjena rtPA zbog vremenskog odmaka ne preporuča, alternativna opcija je mehanička trombektomija (MT), operacija kod koje se u cilju uklanjanja ugrušaka uvodi mikrokateter. (4) Za razliku od terapije s rtPA i trombektomijom kojima je cilj otopiti/maknuti ugrušak te spasiti ugroženo tkivo kako bi se oštećenje ograničilo, tretmani oporavka ciljaju na promicanje neuralnog oporavka preživjelog živčanog tkiva. (45) Budući da se kao posljedica moždanog udara često javljaju motorička oštećenja koja ograničavaju pokretljivost te oštećenja gutanja, govora i jezika, osjeta, vida i spoznaje, rehabilitacija je neizbježna. (46) Uz reorganizaciju neurona, cilj rehabilitacije je smanjiti dodatnu invalidnost i osamostaliti bolesnika pomoću multidisciplinarnog tima stručnjaka. (47, 48, 49)

Evidentno je da su terapijske mogućnosti u liječenju moždanog udara vrlo ograničene te su stoga eksperimentalna i klinička istraživanja vezana za razvoj novih lijekova vrlo intenzivna. Npr., jedan takav lijek je „čistač“ slobodnih radikala NXY-059 koji je pokazao neuroprotektivni učinak u pretkliničkom modelu moždanog udara. Mana mu je teži prolaz krvno-moždane barijere, koja igra važnu ulogu u ishemiji/reperfuziji (I/R) jer o njoj ovisi hoće li i kako će lijek stići do ciljanog mjesta. Upravo iz tog razloga, novija istraživanja usmjerena su na primjenu nanotehnologije i nanočestica veličine 50–200 nm, koje bi prolazile krvno-moždanu barijeru i dostavljale lijek na ciljano mjesto. (4) Disfunkciju krvno moždane barijere uzrokuju oksidativna oštećenja i ekscitotoksičnost, koja nastaju nakon žarišne hipoperfuzije kojom ishemijski udar započinje. U nekim istraživanjima se pokušavalo štetu uzrokovanu hipoperfuzijom ograničiti povećanjem parcijalnog tlaka kisika u tkivu primjenom hiperbarične (HBO) i normobarske terapije kisikom (NBO). Međutim klinička ispitivanja nisu pokazala djelotvornost. (40, 41)

1.5. Ispitivanje neuroprotektivnih lijekova

Neuroprotekcija podrazumijeva prevenciju i sprječavanje patološkog gubitka neurona kod bolesti SŽS-a, a usmjerena je na sve patofiziološke kaskade koje nastaju tijekom ishemije, od ekscitotoksičnosti pa do upale i apoptoze. (50) U biomedicinskim istraživanjima neuroprotektivnih lijekova, središnju ulogu imaju životinjski modeli. Različiti životinjski modeli posljednjih se desetljeća koriste u proučavanju ishemijskih mehanizama i razvoja lijekova, a najčešće korišteni su mali glodavci (miševi i štakori). (44) Oni su jednostavni za razmnožavanje, tretman i različite genetske modifikacije. Sljedeća prednost je mogućnost korištenja sofisticiranih mjerenja neurosenzornih i motoričkih ponašanja nakon ishemije te primjena *in vivo* tehnika za biokemijske i neurokemijske analize. Postoje i druge životinjske vrste koje se mogu koristiti u eksperimentalnim istraživanjima kao npr. psi, zečevi, majmuni itd. Unatoč određenim prednostima, ovi modeli su skupi i postoji velika varijabilnost u razvoju i distribuciji ozljede, a zbog upotrebe različitih anestetičkih protokola, ishod ishemije može se znatno promijeniti. (51)

1.5.1. Eksperimentalni modeli ishemijske ozljede mozga

Najbližim ishemijskom udaru smatra se MCAO model i korišten je u više od 40% pokusa neuroprotekcije. MCAO je metoda koja podrazumijeva primjenu intraluminalnog šava u glodavaca, široko je prihvaćen i dobro standardiziran životinjski model zbog jednostavnog postupka i stabilnog volumena infarkta. (44) Ovaj model izvorno su opisali Koizumi i sur., a kasnije su ga drugi modificirali. (52, 53) Umetanjem monofilamentnog šava u unutarnju karotidnu arteriju (ICA) blokira se (trajno ili prolazno) protok krvi u MCA. Ovaj model prihvatljivim za ispitivanje neuroprotektivnih lijekova čini značajna količina tkiva koje se može oporaviti u prvih 60 – 90 minuta nakon početka. U osnovi, to je područje penumbre. Pored navedenog, opisani model je pogodan za proučavanje učinaka reperfuzije. (52,53)

Uz navedeni, postoji još nekoliko modela fokalne moždane ishemije:

- Model elektrokoagulacije
- Model Rose Bengal
- Embolijski i tromboembolijski model
- Endotelin-1 model (53)

Sličan ishemijskom moždanom udaru kod čovjeka je tromboembolijski model ishemije. Prvi put je primijenjen kod psa, ubrizgavanjem krvnih ugrušaka, a kasnije se ova metoda primijenila kod štakora. Ovakva metoda ima nekoliko nedostataka: difuzni i nehomogeni infarkt na području MCA, spontana rekanalizacija koja otežava proučavanje trombolitičkih terapija, promjenjive veličine infarkta te veličina i biološke značajke krvnog ugruška koje su presudne za ponovljivost postupka. No, ukoliko je ugrušak bogat fibrinom, inducira infarkte na teritoriju MCA slične onima koje stvara intraluminalni MCA model okluzije. Sličnost ishemijskom udaru kod čovjeka čini ga korisnim za proučavanje trombolitičke terapije. (52) Model je ponovljiv te je zabilježena niska stopa smrtnosti. (53)

Kod modela elektrokoagulacije ili dijatermije, kraniotomija se izvodi kako bi se MCA izložila na površini mozga. Ovaj model izvorno su razvili Tamura i sur. i njegova prednost je što sekcija MCA koja je izložena okluziji može varirati (distalno, proksimalno) kako bi se izazvao udar koji pogađa kortikalno ili subkortikalno područje. Nedostatak ovog modela jest nemogućnost reperfuzije budući da inducira trajni MCAO što čini model tehnički zahtjevnijim. (53)

Embolijski model podrazumijeva formiranje ugruška izvan tijela pomoću autologne krvi, koji se uvodi pomoću katetera. Ovim modelom ispituje se procjena učinaka tretmana s trombolizom (rtEP) te je zbog pojave rekanalizacije moguće ispitati nove trombolitike. Znatno viši mortalitet i varijabilnost veličine lezije uzrokovane ugruškom koji može putovati te začepiti žilu koja nije MCA, predstavljaju mane ovog modela. (53)

Rose Bengal model fototrombotskog moždanog udara zahtjeva i.v. primjenu Rose Bengal fotosenzitivne boje, praćenu laserskim osvjetljenjem lubanje na određenom kortikalnom mjestu. Osvjetljenje rezultira aktivacijom boje koja proizvodi visoko reaktivne kisikove radikale koji uzrokuju oštećenje endotela te nastanak tromba. Prednost ovog modela je njegova jednostavnost te činjenica da su proizvedeni trombi slični onima u kliničkim uvjetima. (53)

Endotelin-1 (ET-1) je vazokonstriktorni peptid, izvorno razvijen u štakora. Početni model je podrazumijevao administraciju ET-1 na površinu MCA što je rezultiralo dugotrajnom vazokonstrikcijom s potpunom reperfuzijom. Naknadno je model modificiran te se ET-1 ubrizgavao u tkivo uz MCA. (53)

Zbog raznolikosti ove bolesti, životinjski modeli koji se koriste u pretkliničkim istraživanjima ne odražavaju u potpunosti bolest kakva se javlja kod ljudi. Upravo iz tog razloga se koriste različiti modeli ishemije. (51) Daljnja istraživanja te primjena raznih metoda imaju za cilj razviti nove tretmane koji bi se mogli davati samostalno ili u kombinaciji s postojećima. (53)

1.5.2. Eritropoetin

Eritropoetin je glikoprotein citokin koji pokreće proizvodnju crvenih krvnih stanica i izrazito je specifičan za eritroidne i progenitorne stanice. (54, 55) Vezujući se na njih, potiče njihovo preživljavanje, proliferaciju i diferencijaciju do zrelih eritrocita. (56) Njegova molekularna masa je 30kDA i čini ga slijed od 165 aminokiselina. (57) Proizvodi se kao odgovor na hipoksiju, dok hiperoksija i policitemija suzbijaju njegovu proizvodnju. (58) Tijekom fetalnog razvoja eritropoetin se proizvodi u jetri, no nakon rođenja bubrežne peritubularne stanice postaju njegovo glavno mjesto proizvodnje. Mjesta proizvodnje i lučenja u CNS-u su srednji mozak, hipokampus i kora. (59) Endogeno ga proizvode mikroglija i neuroni, astrociti i oligodendrociti te endotelne stanice. (50)

Eritropoetin karakterizira zaštitna uloga kod brojnih poremećaja poput dijabetesa, angiogeneze, ateroskleroze, neurodegenerativnih poremećaja i ishemijske ozljede. (60) Njegova antiapoptička, protuupalna, antioksidativna svojstva, kao i regulacija crvenih krvnih stanica, posredovana su putem površinskog receptora EpoR / βcR koji se nalazi u različitim tkivima. (61, 62, 50) Povećana ekspresija EPO-a i njegova receptora javlja se kao odgovor na ozljedu u glija stanicama, neuronima, stanicama neuronskih progenitora i cerebrovaskularnim endotelnim stanicama. (45) Sprječavajući apoptozu stanica, eritropoetin štiti neurone kod ishemijske ozljede te stimulira obnovu krvnih žila. (47, 63) U hipoksično-ishemijskim, traumatskim, ekscitotoksičnim i upalnim ozljedama ima ulogu neuroprotektivnog čimbenika. (64, 65, 66)

U kliničkom ispitivanju ishemije dokazan je neuroprotektivni učinak u uvjetima oksidacijskog stresa time što je eritropoetin smanjio veličinu infarkta za 30%. U MCAO modelu dokazani neuroprotektivni učinci posljedica su smanjenja edema i nekroze od 35% u odnosu na zdravu zonu. (67, 47,68)

Nakon izolacije eritropoetina, rekombinantni humani eritropoetin (rhEP) se počeo koristiti za liječenje anemije različitog porijekla. Posebice se primjenjuje kod anemije uzrokovane kemoterapijom ili radioterapijom te za liječenje anemije povezane s kroničnim zatajenjem bubrega. (1, 61, 68, 69)

Prihvatljiva terapijska širina i dobra klinička podnošljivost čine rhEP potencijalnim lijekom u terapiji moždanog udara. Međutim, potrebno je primijeniti visoku intravensku dozu (5000 IU/kg) zbog niske propusnosti krvno-moždane barijere. (50) Mnoga klinička istraživanja potvrdila su kako intravenski unos rezultira pozitivnim učincima, no potrebno je provesti

dodatna istraživanja jer točni mehanizmi njegove neuroprotekcije još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. (1, 63, 70)

Jedan od mogućih mehanizama neuroprotektivnog djelovanja eritropoetina je utjecaj na ekspresiju i funkcionalnu aktivnost SIRT 1 proteina.

1.5.3. Uloga SIRT 1

SIRT 1 (engl. *silent information regulator two protein 1*) dio je obitelji Sirtuin, odnosno histonskih deacetilaza (HDAC) klase III čija je prvenstvena uloga nadgledanje transkripcije DNA. To je proteinska deacetilaza ovisna o NAD^+ koja se izražava u cijelom tijelu, u tkivima kao što su bubrezi, mišići, jetra, srce, gušterača, slezena, masno tkivo, endotel i mozak. Njegova ekspresija u mozgu raširena je u hipokampusu, hipotalamusu, kori i malom mozgu. SIRT 1 sintetizira se u citopolazmi te importira u jezgru. (71, 72, 73, 74) Putem mitohondrija, SIRT 1 i PGC-1α reguliraju aspekte energetskog metabolizma. (71) PGC-1α je glavni regulator antioksidativnih enzima i identificiran je kao ciljni protein za SIRT 1 u modelima cerebralne ishemije. Njegova povećana ekspresija štiti neurone od oksidacijskog stresa. (75) SIRT 1 sudjeluje u nekoliko bioloških procesa kao što su oksidativni stres, genomska stabilnost, metabolizam i stanična proliferacija. (74)

U posljednjih nekoliko godina mnoga istraživanja usredotočila su se na ulogu SIRT 1 u ishemičnom moždanom udaru, smatrajući ga zaštitnim faktorom. SIRT 1 ima mogućnost modulirati ekspresiju gena i prilagoditi metabolizam stanica ishemijskom stresu. (73) On je uključen u brojne biološke procese i deacetilira brojne transkripcijske čimbenike poput FOXO (engl. *Forkhead Box O*), PARP-1 i KU70. Deacetilirajući navedene čimbenike, smanjuje transkripcijsku aktivnost i štiti stanice od apoptoze. (50) Neuroprotektivni učinak SIRT 1 dokazan je kod cerebralne ishemije / reperfuzijske ozljede (I / R). Aktivirajući se, SIRT 1 ublažava ishemiju putem nekoliko mehanizama, dok je posljedica aktivacije enzimske aktivnosti SIRT 1 smanjenje volumena infarkta. Njegova inhibicija pogoršava ishemijsku ozljedu praćenu povećanom acetilacijom p53 i NF-κB (nuklearni faktor-kappa B p65) te je tako prikazana njegova povezanost s protuupalnim i antiapoptičkim učincima na cerebralnu ishemiju. (73) Djelovanje povećane ekspresije SIRT1 na manje oštećenje hipokampusa dokazano je kod SIRT 1-Tg miševa u usporedbi s miševima divljeg tipa. (72) Ekspresiju i funkciju SIRT 1 povećava eritropoetin. (76)

2. Cilj istraživanja

Obzirom na visoku incidenciju akutnog ishemijskog moždanog udara u ljudi te ograničene terapijske mogućnosti, vrlo su intenzivna istraživanja usmjerena na bolje razumijevanje etiopatogeneze ove bolesti kao i iznalaženje učinkovitih terapijskih opcija.

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. ispitati potencijalne neuroprotektivne učinke rhEpo u korteksu i hipokampusu štakora izloženih žarišnoj ishemiji mozga u modelu MCAO
2. istražiti moguće mehanizme neuroprotektivnog djelovanja rhEpo praćenjem ekspresije i aktivnosti SIRT 1 proteina kao i markera oksidativnog stresa te pokazatelja aktivacije glija stanica u gore navedenim moždanim strukturama.

3. Materijali i metode

3.1. Eksperimentalne životinje

Eksperimentalni pokusi provedeni su na muškim štakorima Hannover–Wistar, težine 250-350g, koji su čuvani u nastambi za pokusne životinje Zavoda za farmakologiju. Štakori su čuvani u kontroliranim uvjetima s izmjenjivanjem razdoblja 12-satne svjetlosti i tame, pri temperaturi 22-24°C te vlazi 55% +/- 10% i omogućen im je pristup hrani i vodi. Svi provedeni eksperimentalni postupci na životinjama odobreni su od strane Etičkog povjerenstva fakulteta te su postupci provedeni u skladu s hrvatskim zakonima i pravilima (NN 135/06; NN 37/13; 55/13) i smjernicama utvrđenim Direktivom Vijeća Europske zajednice (2010/63 / EU). Eksperimentalni pokusi provedeni su u skladu s 3R pristupom (*Replacement* = nadomještanje životinja, *Reduction* = smanjenje broja životinja, *Refinement* = oplemenjivanje postupaka prema životinjama) kako bi se patnja životinja svela na minimum i kako bi se smanjio broj životinja korištenih u pokusu.

Za histološke analize, životinje su podijeljene u tri zasebne grupe: (1) „lažno operirane“, netretirane životinje koje čine kontrolnu skupinu, (2) životinja podvrgnute MCAO i tretirane intraperitonealno (i.p.) otapalom 3 sata nakon početka ishemije, (3) životinje izložene ishemiji mozga i tretirane i.p. s rhEpo (Eprex 2000 IU/0,5 ml, Janssen Biologics B.V., Leiden, Nizozemska) 3 sata nakon okluzije.

3.2. Okluzija srednje moždane arterije (MCAO)

Štakori su anesteziranі s 350 mg/kg kloral hidrata primijenjenog intraperitonealno (i.p.). Zahvat je obavljen na štakoru fiksiranom na operacijskom stolu, te se pomoću rektalne sonde tijekom cijelog zahvata i kod postupka reperfuzije mjerila temperatura. Kao što su opisali Belayev i sur. (77) i Longa i sur. (78), prilikom izvedbe MCAO zahvata koristio se najlonski konac te se uvodio intraluminalno u navedenu arteriju. Anestezirana i fiksirana životinja operirana je pod operacijskim mikroskopom tako što je desna zajednička moždana arterija prvim rezom ogoljena i izolirana od okolne fascije i živaca. Okcipitalne arterijske grane vanjske karotidne arterije su izolirane i koagulirane. Vanjska karotidna arterija je potom distalno secirana i koagulirana zajedno s lingvalnom i maksilarnom arterijskom granom. Izolirana i pažljivo odvojena od susjednog vagalnog živca je unutarnja karotidna arterija, dok je pterigopalatina arterija podvezana 5-0 najlonskim koncem blizu svojeg mjesta nastajanja. Oko mobiliziranog batrljka vanjske karotidne arterije je labavo zavezan najlonski konac veličine 4-0, dok je 4 cm dugačak 3-0 monofilamentni najlonski konac umetnut kroz proksimalni dio vanjske cerebralne arterije u unutarnju cerebralnu arteriju i potom u Willisovu petlju čime se učinkovito uzrokovala okluzija MCA. Prije umetanja u arteriju, monofilamentni najlonski konac pripremljen je tako da je vrh konca koji je ulazio u arteriju prethodno bio zagrijan uz plamen kako bi se zatupio te kako ne bi uzrokovao štetu na unutarnjoj strani arterije. Konac je umetnut 18–20 mm od mjesta grananja zajedničke karotidne arterije. Kako bi se spriječilo daljnje krvarenje stegnut je 4-0 najlonski konac oko batrljka i umetnutog 3-0 monofilamentnog najlonskog konca. Prethodno napravljeni rez na koži i potkožju vrata životinje je zatvoren. Prosječno trajanje zahvata je 25-30 minuta te se tjelesna temperatura štakora tijekom zahvata održavala na 37+/-0.5°C uz pomoć grijaćeg kirurškog stola. Životinja je reanestezirana istim anestetikom upotrijebljenim na početku zahvata, jedan sat nakon izazvane MCAO. Na vratu je ponovno otvoren rez i pažljivo je izvučen dio umetnutog najlonskog konca kako bi se uspostavio protok krvi kroz blokiranu arteriju. Lažno operirane životinje, korištene za histološke analize, predstavljale su životinje kontrolne skupine. Lažno operiranim životinjama, tzv. kontrolnoj skupini, izolirana je unutarnja karotidna arterija, ali nije napravljena okluzija MCA. Nakon zahvata reperfuzije, sve životinje su probuđene iz anestezije i vraćene su u svoje kaveze gdje su imale pristup hrani i vodi. Neposredno prije druge anestezije i reperfuzije, na svakoj životinji s MCAO uočen je motorički deficit. Životinje su žrtvovane 24 sata nakon izazvane okluzije MCA.

3.3. Priprema tkiva

Za histološka i imunohistokemijska bojanja uzorci su pripremljeni tako da su životinje podvrgnute postupku perfuzije, a anestezirane su natrijevim tiopentalom (40 mg/kg). Postupak perfuzije izvodi se transkranijalno s 0.1 M fosfatnim puferom, pH 7.4 (engl. *phosphate buffer saline*, PBS) oko 15-20 minuta te nakon toga slijedi dodatnih 15-20 minuta perfuzije krvotoka s 4% paraformaldehidom otopljenim u 0.1 M PBS-u, sve u cilju ispiranja mozga od krvi. Mozak se po završetku perfuzije izvadi iz lubanje životinje i dodatno fiksira 24 sata u 4% paraformaldehidu/0.1M PBS na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja 2 sata pod mlazom tekuće vode, tkivo mozga se prebacuje u aparat za dehidraciju i parafinizaciju. Dehidracija se provodi kako bi se i najmanji dio zaostale vode iz tkiva uklonio, budući da voda sprječava prodiranje parafina. Parafin u histološkim laboratorijima služi kako bi se u potpunosti očuvala morfologija tkiva. To je mješavina smole i voska te je odličan medij za uklapanje jer se na povišenoj temperaturi rastapa u tekuće stanje i hlađenjem se stisne u čvrsto stanje kako bi se parafinski blok mogao narezati. Nakon uklapanja i hlađenja, tkivo je izrezano kao blok na mikrotomu na tanke rezove debljine 3 μm. Tako izrezani parafinski listići su naneseni na silanizirana predmetna stakla, osušeni i pripremljeni za histološke metode.

3.4. Imunohistokemijske i imunofluorescencijske analize

Na parafinskim rezovima debljine 3-4 μm učinjena je imunohistokemijska detekcija stanica mikroglije. Imunohistokemijska detekcija u hipokampusu učinjena je pomoću protutijela ionizirane kalcij-vezujuće adaptorske molekule 1 (engl. *Ionized calcium binding adaptor molecule 1*, Iba1) za mikrogliju. Silanizirana predmetna stakla sa presjecima mozga su prvo uronjena u ksilol, a nakon toga su dehidrirana padajućim koncentracijama alkohola (100% do 70%) te zatim uronjena u destiliranu vodu s ciljem uklanjanja parafina i pripreme tkiva za analizu. Zatim su predmetna stakalca s uzorcima uronjena u prethodno zagrijani citratni pufer (10mM, pH 6,0) te stavljena na zagrijavanje u vodenu kupelj na 98°C/20min. Nakon zagrijavanja, stakalca s uzorcima su hlađena na sobnoj temperaturi. Nakon učinjene permeabilizacije s Tris [hidroksimetil] aminometanom puferiranom fiziološkom otopinom (engl. *Tris [hydroxymethyl] aminomethylene-based saline,* TBS) uz dodatak deterdženta Tritona x (Tx) završne koncentracije 0,025% (TBSTx), nespecifična mjesta vezanja su blokirana s 5% normalnim kozjim serumom i 1% albuminom goveđeg seruma (engl. *Bovine*

serum albumin, BSA) s 0,025% Triton X u TBS-u. Zatim su uzorci inkubirani u vlažnoj komori s primarnim protutijelima preko noći na 4°C.

Slijedeći dan, nakon ispiranja s TBS-om, uzorci su inkubirani 1 h s otopinom streptavidina konjugiranog s fluorokromom (Dylight 594, Pierce Biotechnology, Rockford, SAD) (1:200)/TBS-u/30 minuta. Vizualizacija jezgara učinjena je petominutnom primjenom 1 μg/mL 4', 6'-*diamino*-2-fenilindol dihidroklorid (engl. *4',6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride*, DAPI) (Molecular Probes, Eugene, OR, SAD) pri sobnoj temperaturi. Sve fotografije uzoraka učinjene su pomoću Olympus IX73 mikroskopa i Olympus XM10 digitalne kamere (Olympus, Tokio, Japan). Za kvantifikaciju broja i udjela Iba1 pozitivnih stanica mikroglije korištene su mikrofotografije učinjene pri povećanju od ×400.

3.5. Imunoprecipitacija

U postupku imunoprecipitacije korištene su SureBeads magnetne kuglice na koje je bilo vezano primarno protutijelo FOXO1 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, SAD) (1:2000) u količini 4 μL po uzorku s ciljem izdvajanja proteina od interesa. Nakon učinjene magnetizacije, supernatant se odstranjuje te se kuglice ispiru s puferiranom fiziološkom otopinom (engl. *Phosphate Buffered Saline*) s dodatkom 0,1% Tween-20 (T). Zatim se dodaje lizat s antigenom, te se uzorci rotiraju 1h na sobnoj temperaturi. Nakon rotacije, kuglice se ponovno magnetiziraju, te se odstranjuje supernatant i kuglice se ispiru s PBS-T. Zatim se dodaje 40 μL 2x Laemmli pufera i inkubira se 10 min na 70 °C. Nakon toga se kuglice magnetiziraju i supernatant se uzima za daljnju analizu pomoću metode western blot.

3.6. Western blot analiza

Pomoću Western blota u uzorcima hipokampusa i korteksa mjerena je ekspresija proteina od interesa.

Uzorci su stavljeni na SDS-PAGE gel, te je elektroforeza provedena tijekom 40 min na 200 V u sustavu Mini-PROTEAN® Tetra (Bio-Rad Laboratories Inc., SAD). Zatim su uzroci transferirani na nitrocelulozu membranu u sustavu za prijenos Trans-Blot® Turbo ™ (Bio-Rad Laboratories Inc., SAD). Nakon toga, membrane su inkubirane 1 sat s 5% mlijeka ili 5% goveđeg serumskog albumina (engl. *bovine serum albumine*, BSA) u TBS-T, zatim su inkubirane preko noći s primarnim protutijelima pri 4 °C. Korištena primarna protutijela su navedena u Tablici 1.

Tablica 1. Popis protutijela korištenih za western blot analize

Primarno protutijelo	Razrjeđenje	Proizvođač
SIRT1	1:500	Abcam, Cambridge, UK
FOXO1	1:2000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, SAD
acetil lizin	1:2000	Abcam, Cambridge, UK
zečje anti-iNOS	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
zečje anti-GFAP	1:2000	Abcam, Cambridge, UK

Skraćenice: iNOS, inducibilna oksidaze dušikovog oksida (engl. *inducible nitric oxide synthase*), GFAP (engl. *glial fibrillary acidic protein*)

Idući dan membrane su inkubirane odgovarajućim sekundarnim protutijelima 1 h. Upotrijebljena sekundarna antitijela su: anti zečje (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, SAD) i anti mišje (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, SAD), oba konjugirana s biotinom. Nakon inkubacije, membrane su ponovno isprane TBST-om, a zatim inkubirane s Streptavidin konjugatom hrenove peroksidaze 30 minuta. Nakon dodavanja kemiluminiscentnog supstrata SuperSignal ™ West Pico PLUS (Thermo Fisher Scientific, USA) vizualizacija je izvedena pomoću Kodak Image Station 440, a izražaj proteina je analiziran u programu Kodak 1D (v.3.6.5, Kodak Scientific Imaging Systems, SAD).

3.7. Kvantifikacija proteina

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

3.8. Prikupljanje podataka i statističke analize

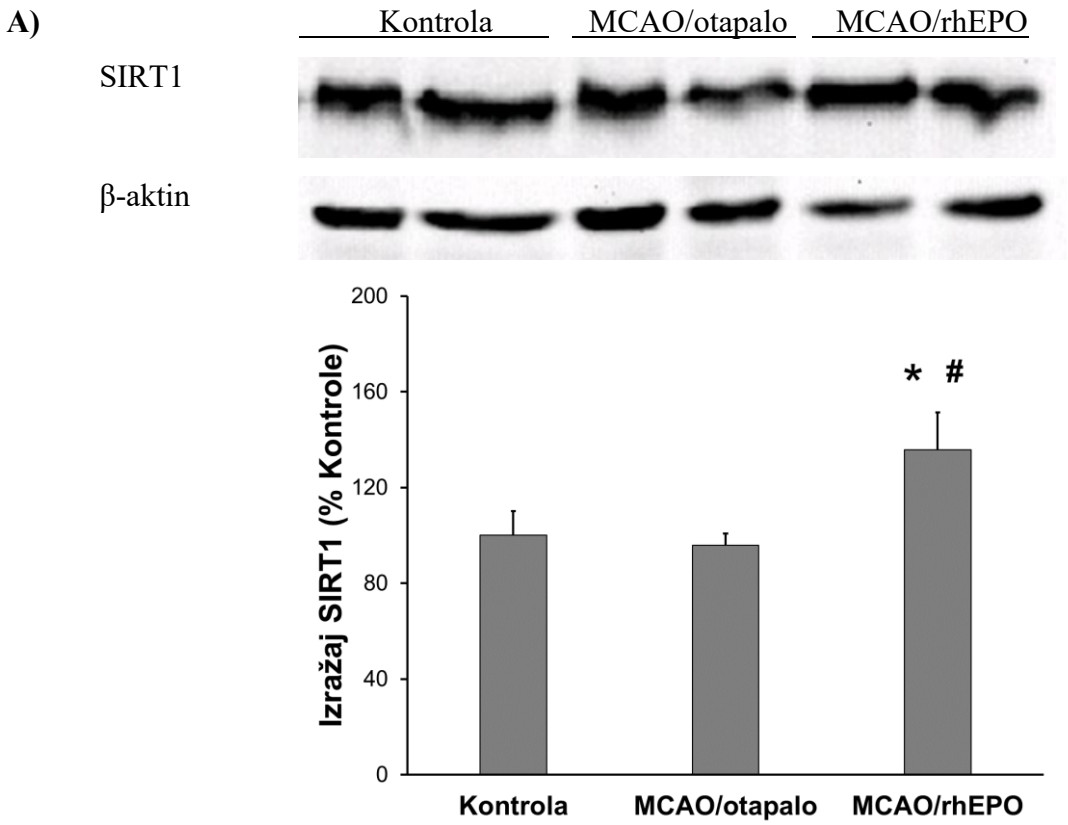
Za pohranu podataka te izradu grafičkih prikaza korišten je program Microsoft Office Excell® (Microsoft Corp., Redmond, WA, SAD). Za analizu mikrofotografija korišten je ImageJ program (NIH, Bethesda, MD, SAD). Vrijednosti koje su dobivene izražene su kao mjera središnjice i raspršenja. Za statističku obradu podataka korišteni su parametrijski postupci statističke raščlambe, jednosmjerna (*one-way*) analiza varijance (ANOVA) s Duncan Multiple

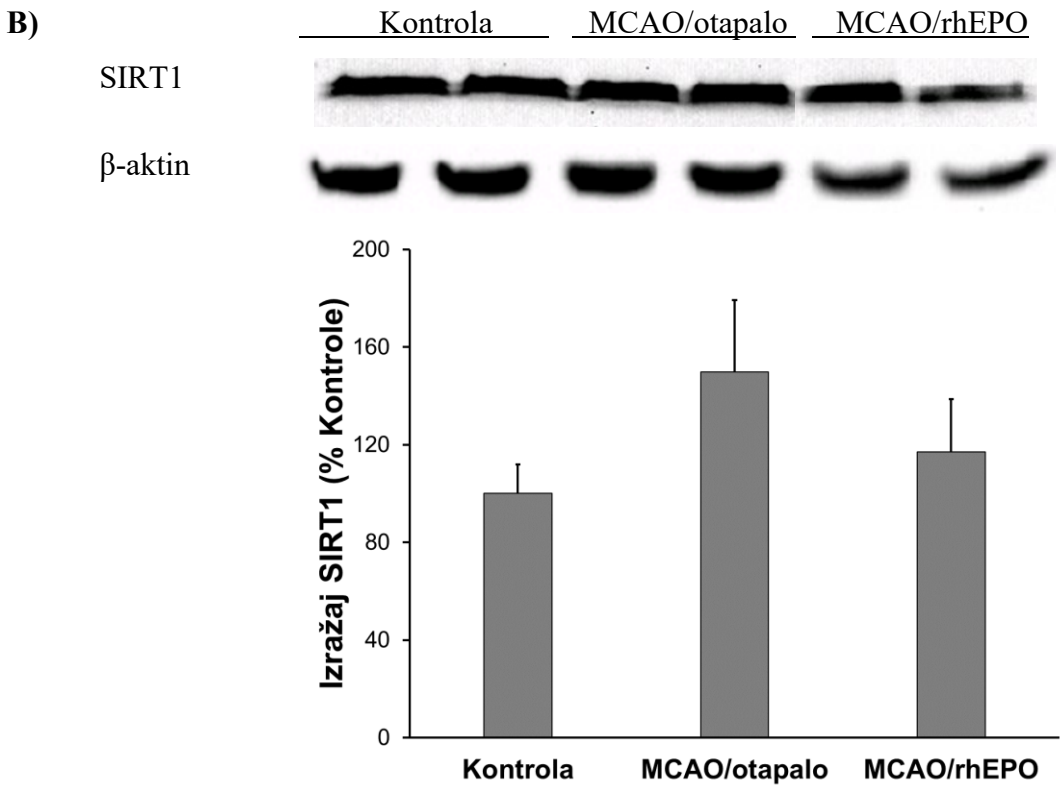
Range post-hoc testom. Razina od $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom. Postupci statističke raščlambe učinjeni su pomoću računalne programske potpore STATISTICA® inačica 13 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD).

4. Rezultati

4.1. Utjecaj rhEpo na ekspresiju i aktivnost SIRT 1 proteina u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon žarišne ishemije mozga

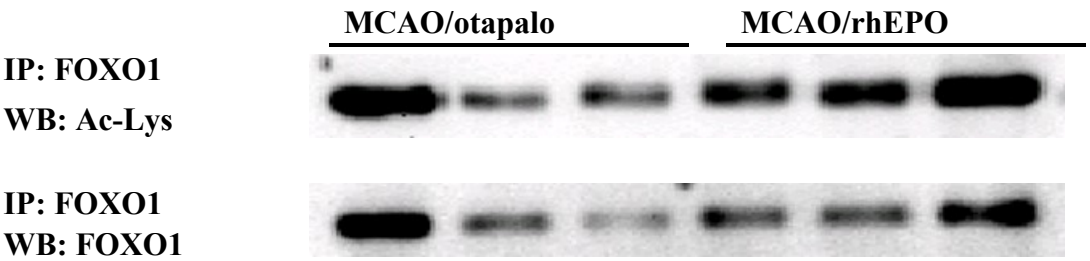
U opisanom eksperimentalnom modelu istraživana je razina ekspresije i aktivnosti SIRT 1 proteina u parijetalnom korteksu i CA1 regiji hipokampusa štakora. Iz rezultata prikazanih na Slici 1. A vidljivo je da u parijetalnom korteksu ishemijskih životinja nije došlo do statistički značajnog porasta vrijednosti ekspresije SIRT 1 proteina u usporedbi s kontrolnom skupinom životinja. Primjena rhEpo, 1 h nakon indukcije MCAO dovela je do statistički značajnog porasta ekspresije SIRT1 [(F2;12) = 3,920; p = 0,049]. Suprotno navedenom, ispitivanja razine ekspresije SIRT 1 proteina u CA1 regiji hipokampusa životinja izloženih ishemiji kao niti primjena rhEpo nije dovela do značajnih razlika u rezultatima u usporedbi s kontrolnim životinjama [(F2;12) = 1,291; p = 0,311].





Slika 1. Učinak rhEpo na ekspresiju SIRT1 u parijetalnom korteksu (A) i CA1 regiji hipokampusa (B) štakora 24 sata nakon MCAO procedure. Prikazani su reprezentativni uzorci blotova štakora eksperimentalnih skupina i pripadajuće denzitometrijske analize blotova SIRT1, korigiranih za vrijednosti β-aktina i prikazanih kao udio Kontrole (%). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti ± SEM (n=5). Životinje kontrolne skupine (Kontrola), štakori izloženi ishemiji i tretirani otapalom (MCAO/otapalo) ili s rhEpo (MCAO/rhEpo).
*p<0,05 različito od Kontrole; #p<0,05 različito od MCAO/otapalo

Praćenje aktivnosti SIRT 1 proteina u parijetalnom korteksu (Slika 2.) pokazalo je da nije došlo do statistički značajne promjene razine aktivnosti SIRT 1 proteina u ishemijskih životinja tretiranih s rhEpo. Naime, pratili smo deacetilira li SIRT1 FOXO1. Stanični ekstrakti imunoprecipitirani su antitijelima na Flag i imunoblotirani antitijelima na acetil-lizin. Primjena rhEpo povećala je količinu acetiliranog FOXO1 u stanicama korteksa.

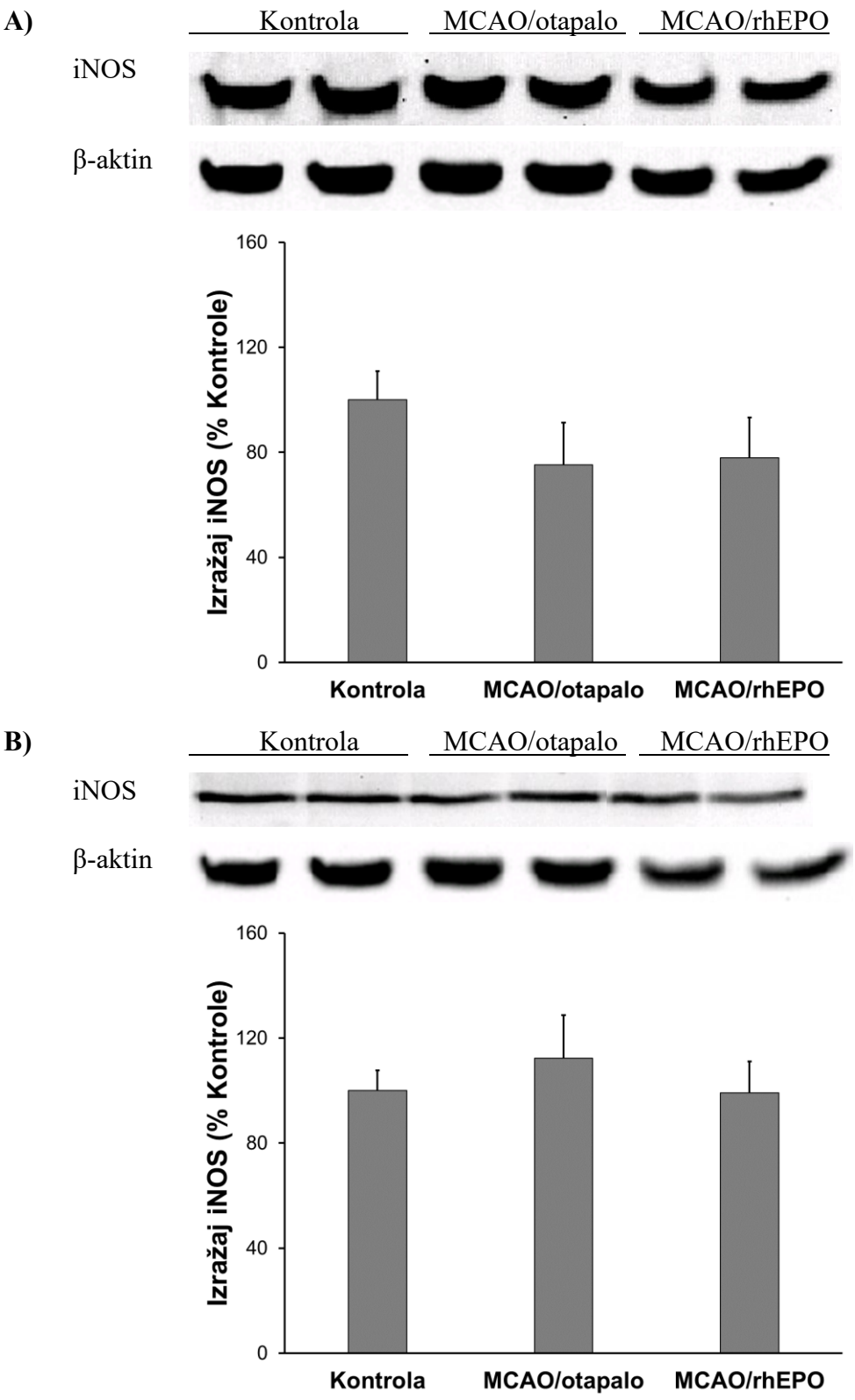


Slika 2. Učinak rhEpo na aktivnost SIRT1 u parijetalnom korteksu štakora 24 sata nakon MCAO procedure. FOXO1 je imunoprecipitiran (IP) iz lizata cijelih stanica. Proteini su eluirani s magnetnih kuglica obilježenih anti-FOXO1 protutijelom, a razina acetilacije FOXO1 analizirana je western blotom (WB) pomoću protutijela protiv acetiliranog lizina (Ac-Lys). Prikazani su reprezentativni uzorci blotova štakora eksperimentalnih skupina (n=5). Štakori izloženi ishemiji i tretirani otapalom (MCAO/otapalo) ili s rhEpo (MCAO/rhEpo).

4.2. Utjecaj rhEpo na ekspresiju pokazatelja oksidativnog stresa i razine GFAP-a u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon žarišne ishemije mozga

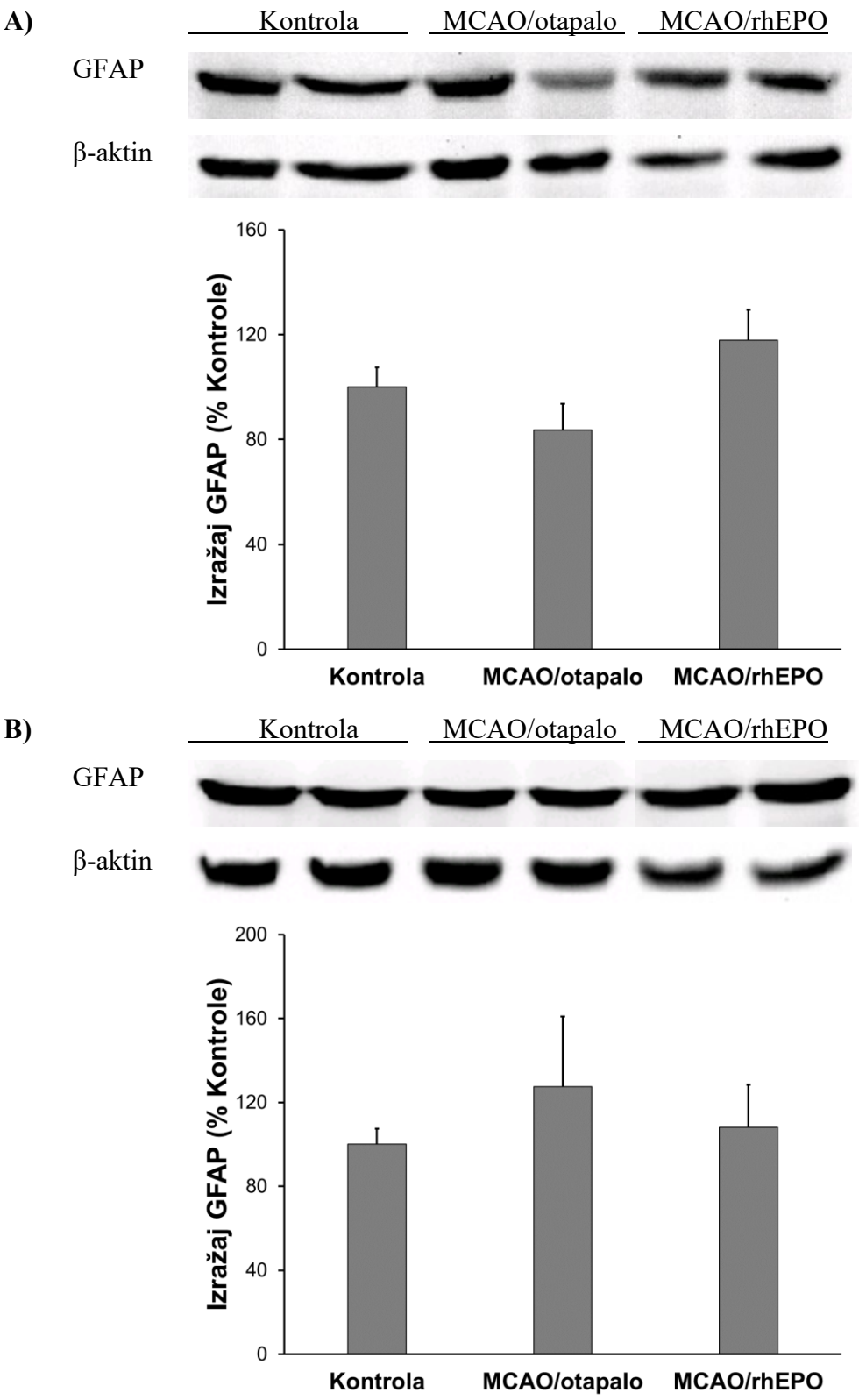
Iz rezultata prikazanih na Slici 3. evidentno je da ANOVA analiza nije pokazala statistički značajan utjecaj rhEpo na ekspresiju iNOS-a u parijetalnom korteksu (Slika 3.A) [$F(2;12) = 0,574$; $p = 0,578$] i hipokampusu (Slika 3.B) [$F(2;12) = 0,348$; $p = 0,713$] štakora nakon ishemijske ozljede.

Slični rezultati prikazani su na Slici 4. gdje je vidljivo da vrijednosti ekspresije GFAP-a nisu statistički značajne za područje parijetalnog korteksa (Slika 4.A) [$(F2;12) = 3,013$; $p = 0,087$] i hipokampusa (Slika 4.B) [$(F2;12) = 0,381$; $p = 0,691$].



Slika 3. Učinak rhEpo na ekspresiju iNOS-a u parijetalnom korteksu (A) i hipokampusu (B) štakora 24 sata nakon MCAO procedure. Prikazani su reprezentativni uzorci blotova štakora eksperimentalnih skupina i pripadajuće denzitometrijske analize blotova iNOS, korigiranih za

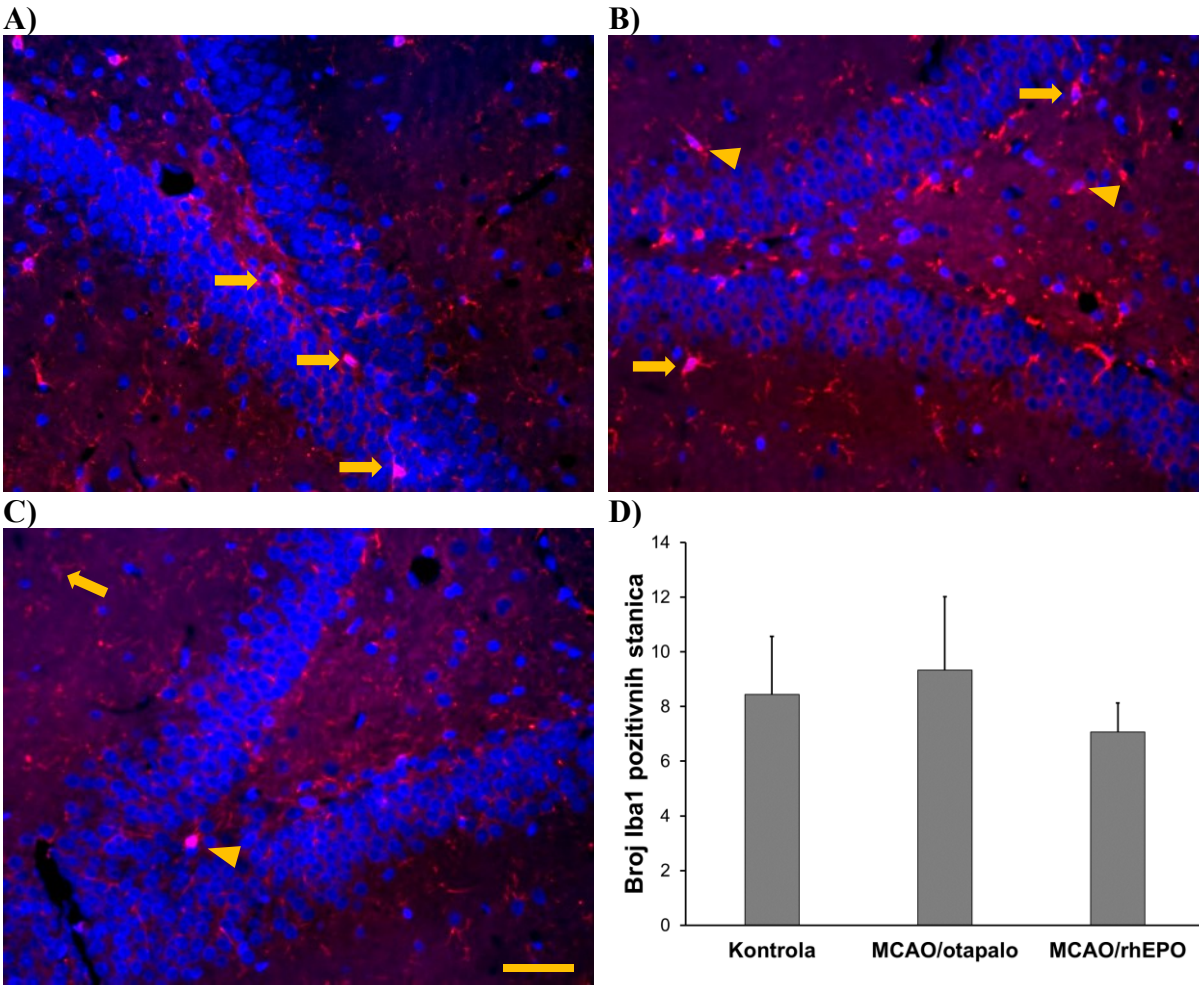
vrijednosti β-aktina i prikazanih kao udio Kontrole (%). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti ± SEM (n=5). Životinje kontrolne skupine (Kontrola), štakori izloženi ishemiji i tretirani otapalom (MCAO/otapalo) ili s rhEpo (MCAO/rhEpo).



Slika 4. Učinak rhEpo na ekspresiju GFAP-a u parijetalnom korteksu (A) i hipokampusu (B) štakora 24 sata nakon MCAO procedure. Prikazani su reprezentativni uzorci blotova štakora eksperimentalnih skupina i pripadajuće denzitometrijske analize blotova GFAP, korigiranih za vrijednosti β-aktina i prikazanih kao udio Kontrole (%). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti ± SEM (n=5). Životinje kontrolne skupine (Kontrola), štakori izloženi ishemiji i tretirani otapalom (MCAO/otapalo) ili s rhEpo (MCAO/rhEpo).

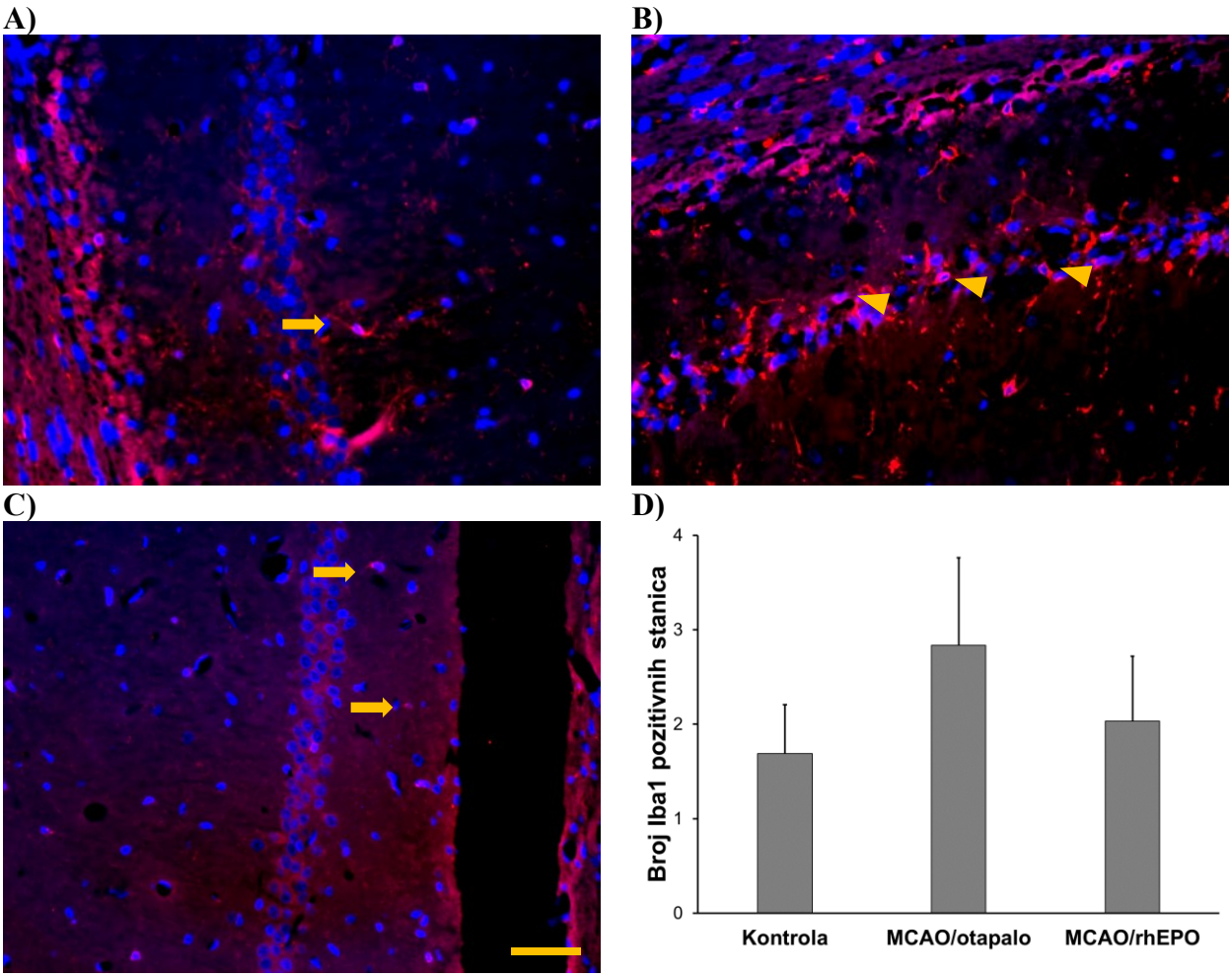
4.3. Utjecaj rhEpo na reakciju mikroglije u girus dentatusu i CA1 regiji hipokampusa štakora nakon žarišne ishemije mozga

Prateći morfološke promjene mikroglija stanica pomoću Iba1 imunofluorescencije u kombinaciji s DAPI bojanjem, prikazali smo reakciju mikroglije u girus dentatusu i CA1 regiji hipokampusa štakora nakon ishemijske ozljede mozga. Uz navedeno, kvantificirali smo broj Iba1 pozitivnih stanica. Stanice mikroglije vidljive su u području girus dentatusa (Slika 5.) i CA1 regije hipokampusa (Slika 6.).



Slika 5. Učinak rhEpo na reakciju mikroglije u girus dentatusu štakora s ishemijskom ozljedom mozga. Prikazane su mikrofotografije prereza mozgova životinja kontrolne skupine (Kontrola) te ozlijeđenih štakora tretiranih otapalom (MCAO/otapalo) ili rhEpo na kojima su crvenim fluorescentnim bojanjem označene stanice imunoreaktivne na mikroglija/makrofagni marker Iba1 uz kontrabojanje 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 ameboidne ili šipkaste morfologije. Linija skale: 50 μm.

U uzorcima kontrolne skupine životinja prisutne stanice mikroglije su s malim staničnim tijelima i tankim razgranatim nastavcima, dok su u grupi ozlijeđenih štakora tretiranih otapalom promijenjenog oblika, tj. karakteristične hipertrofične, ameboidne ili šipkaste morfologije. U grupi ozlijeđenih životinja prisutan je veći broj Iba1 pozitivnih stanica.



Slika 6. Učinak rhEpo na reakciju mikroglije u CA1 regiji hipokampusa štakora s ishemijskom ozljedom mozga. Prikazane su mikrofotografije prereza mozgova životinja kontrolne skupine (Kontrola), te ozlijeđenih štakora tretiranih otapalom (MCAO/otapalo) ili rhEpo na kojima su crvenim fluorescentnim bojanjem označene stanice imunoreaktivne na mikroglija/makrofagni marker Iba1 uz kontrabojanje 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 ameboidne ili šipkaste morfologije. Linija skale: 50 μm.

Već je od prije poznato kako je hipokampus jedan od najosjetljivijih dijelova mozga prema ishemijskom oštećenju. Kvantifikacija Iba1 pozitivnih stanica (Slika 5. i 6.) pokazala je da je došlo do porasta reakcije mikroglije uslijed MCAO procedure te da je primjena rhEpo izazvala smanjenje reaktivnosti. Statistička značajnost nije zabilježena niti u girus dentatusu [$F(2;8) = 0,389$; $p = 0,690$] niti CA1 regiji hipokampusa [$F(2;8) = 0,714$; $p = 0,518$].

5. Rasprava

5.1. Utjecaj rhEpo na ekspresiju i aktivnost SIRT 1 proteina u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon žarišne ishemije mozga

U istraživanju Xu J. i sur. dokazano je neuroprotektivno djelovanje SIRT1 proteina kod ishemijske ozljede mozga. U MCAO modelu na miševima dokazano je povećanje ekspresije SIRT1 za kojeg se smatra da štiti mozak prilikom ishemije. Farmakološkom blokadom SIRT1 od strane SIRT1 inhibitora sirtinola, volumen infarkta se povećao. (79) U spomenutom radu, kao i u radu Della-Morte D. i sur., kao SIRT1 aktivator primijenjen je resveratol. To je prvi i najčešće proučavan prirodni polifenol koji se najčešće nalazi u vinu te je povezan sa zaštitnim učincima kod kardiovaskularnih bolesti. Ovakav model podrazumijeva primjenu 10 ili 50 mg/kg i.p. resveratola koji je pokazao zaštitno djelovanje u CA1 regiji hipokampusa kod ishemije mozga. (80)

Rezultati prikazani u ovom istraživanju pokazali su da je u parijetalnom korteksu ishemičnih životinja tretiranih s rhEpo došlo do statistički značajnog porasta razine ekspresije SIRT 1 proteina, iako u navedenom vremenskom razdoblju nismo zabilježili statistički značajnu promjenu aktivnosti navedenog proteina. SIRT 1 deacetilira FOXO1 te deacetilirani FOXO1 povećava staničnu otpornost na oksidativni stres u stanicama. (81) U radu Gilley J. i sur. prikazano je kako FOXO1 potiče neuronsku apoptozu nakon prekomjerne ekspresije, što ga čini prikladnim kandidatom za daljnja istraživanja kako bi se bolje razjasnila uloga SIRT1 na aktivnost FOXO1. (82) Poznat transkripcijski faktor je i p53, protein supresor tumora koji regulira stanični ciklus. (83) Iako u ovom radu nije prikazano kako SIRT1 djeluje na njegovu aktivnost, od prije je poznato kako deacetilirajući ga, smanjuje njegovu transkripcijsku aktivnost, što predstavlja jedan od mogućih mehanizama SIRT1 posredovane neuroprotekcije. (81) Rezultati istraživanja podupiru postojanje ovakvih transkripcijskih čimbenika, te sugeriraju na njihovu važnu ulogu u odgovoru mozga na ishemiju. (83)

Dobiveni rezultati upućuju na potencijalno neuroprotektivno djelovanje lijeka upravo putem modulacije razine ekspresije i aktivnosti SIRT1 proteina. Rezultati u hipokampusu nisu pokazali statistički značajnu promjenu u ekspresiji navedenog proteina. Dobiveni rezultati u skladu su s prethodnim istraživanjima od Xu J. i sur. i Della-Morte D. i sur., iako je u ovom modelu korišten rekombinantni humani eritropoetin kao aktivator SIRT 1, uz primjenu 5000 IU / kg, i.p. rhEp, 1h nakon indukcije MCAO.

5.2. Utjecaj rhEpo na ekspresiju pokazatelja oksidativnog stresa i razine GFAP-a u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora nakon žarišne ishemije mozga

NOS je izoforma sintaze dušikova oksida (engl. *nitric oxide synthase,* NOS) koja nije stalno prisutna u stanicama, već se izražava nakon indukcije ili stimulacije stanice proupalnim citokinima i/ili bakterijama. (84) iNOS je početno pročišćen iz mišjih makrofaga, no nešto kasnije se utvrdilo kako različiti tipovi stanice poput hepatocita, glatkih mišićnih stanica, glija stanica, neurona itd., induciraju iNOS nakon stimulacije. U ljudskim stanicama, indukcija iNOS-a je ograničena i njegova prva uspješna indukcija bila je u hepatocitima. U usporedbi s glijalnim stanicama, njegova ekspresija u neuronima je ograničena i može se pojaviti nakon ishemije. (84) Dokazano je kako povećana ekspresija iNOS-a povećava proizvodnju NO-a za kojeg je poznato da smanjuje staničnu smrt posredovanu propusnošću mitohondrija. (85) Stvarajući značajne količine NO, pomaže u obrani od napada invazivnih patogena te upravo zaštita od napadajućih patogena i čini njegovu primarnu ulogu u ljudskoj fiziologiji. (84) Međutim, prekomjerna ekspresija iNOS-a rezultira pretjerano visokim koncentracijama NO-a, što može stvoriti toksični učinak povezan s raznim bolestima. (84) Nakon dulje ishemije dolazi do njegove pretjerane proizvodnje koja ima štetne učinke. (85) Utjecaj rhEpo opisan je i u radu Squadrito F. i sur., ali na drugom modelu ozljede mozga (engl. *Splanchnic artery occlusion shock*, SAO). Ovakav model rezultirao je značajnim povećanjem iNOS-a u torakalnim aortama i primjena rhEpo nije dovela do značajne promjene aktivnosti iNOS-a. (86)

Rezultati ovog istraživanja pokazuju kako ishemijska ozljeda mozga nije imala značajan utjecaj na ekspresiju iNOS-a u korteksu i hipokampusu štakora. Nadalje, utjecaj rekombinantnog humanog eritropoetina na ekspresiju iNOS-a u hipokampusu i korteksu štakora nakon ishemijske ozljede nije bio značajan.

Glialni fibrilarni kiseli protein (GFAP) je protein koji se primarno eksprimira u astrocitima. Njegova ekspresija pokazatelj je glioze ili relativno sporo razvijajućeg neuralnog oštećenja. Rezultati dobiveni praćenjem ekspresije GFAP-a, pokazuju kako u navedenom modelu nije došlo do značajnijeg razvoja oksidativnog stresa, odnosno aktivacije astrocita unutar prva 24 h od indukcije ishemije.

5.3. Utjecaj rhEpo na reakciju mikroglije u girus dentatusu i CA1 regiji hipokampusa štakora nakon žarišne ishemije mozga

Mikroglija stanice su stanice koje pokreću imunološki odgovor proizvodeći prouplane medijatore i medijatore oksidativnog stresa poput iNOS-a koji je bitan čimbenik u patogenezi neurodegenerativnih bolesti. U radu Qin C. i sur. navedeno je kako migrirajući prema mjestu lezije, mikroglije mogu i pogoršavati ozljedu tkiva stvaranjem upalnih citokina i toksičnih tvari. (87)

Aktivacija mikroglija stanica kod ishemijskog moždanog udara događa se u raznim fazama neuroinflamacije. U istraživanju Kim Youl J. i sur. navedeno je kako se aktivirana mikroglija može otkriti u lezijama 2 sata ili do tjedan dana nakon ishemijske ozljede mozga.
U ovom radu uočen je porast Iba1 pozitivnih stanica u girus dentatusu i CA1 regiji hipokampusa štakora nakon ishemijske ozljede mozga. Kod kontrolne grupe štakora morfologija stanica mikroglije u obje regije hipokampusa izražena je u vidu malih staničnih tijela, s tankim i razgranatim nastavcima. Uspoređujući kontrolnu skupinu sa skupinom ozlijeđenih štakora koji su primili otapalo vidljivo je kako su stanice mikroglije promijenile svoj oblik, tj. došlo je do pojave hipertrofične, ameboidne ili šipkaste morfologije. Dobiveni rezultati su u skladu s navodima Kim Youl J. i sur. koji su već prije opisali morfološku transformaciju mikroglije. (88) Rezultati ovog rada prikazuju i smanjenje Iba 1 pozitivnih stanica primjenom rekombinantnog humanog eritropoetina, što je u skladu s rezultatima Lan KM. i sur. gdje je također dokazano smanjenje aktivacije Iba1 pozitivnih stanica primjenom rhEpo. (89)

Svi gore navedeni rezultati su obzirom na broj uzoraka preliminarni te predstavljaju podlogu za dodatna ispitivanja.

6. Zaključak

Dobiveni rezultati pokazuju:

1. Primjena rhEpo izazvala je statistički značajan porast ekspresije SIRT1 proteina u parijetalnom korteksu ishemičnih životinja u usporedbi s kontrolnim skupinama.
2. Nije zabilježena značajna promjena razine ekspresije iNOS-a i GFAP-a u ispitivanim regijama mozga.
3. U girus dentatusu i CA1 regiji hipokampusa ishemičnih životinja zabilježeno je smanjenje broja aktiviranih mikroglija stanica uslijed primjene rhEpo, no dobiveni podaci nisu statistički značajni.

7. Literatura

1. Mršić-Pelčić J, Pilipović K, Pelčić G, Vitezić D, Župan G. Decrease in Oxidative Stress Parameters after Post-Ischaemic Recombinant Human Erythropoietin Administration in the Hippocampus of Rats Exposed to Focal Cerebral Ischaemia. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. (2017);121(6), 453–464. https://doi.org/10.1111/bcpt.12833
2. American Stroke Association [Internet]. About Stroke. Pristupljeno: 20.05.2021. Dostupno na: https://www.stroke.org/en/about-stroke
3. Gutierrez J, Esenwa C. Secondary stroke prevention: challenges and solutions. Vascular Health and Risk Management. (2015);437. https://doi.org/10.2147/VHRM.S63791
4. Dong X, Gao J, Su Y, Wang Z. Nanomedicine for Ischemic Stroke. Int J Mol Sci. 2020;21(20):7600. https://doi.org/10.3390/ijms21207600
5. Kim YJ, Lee J, Kang H, Jeon JY. Neurorestorative effect of erythropoietin and environmental enrichment in the early stage of stroke recovery. Animal Cells and Systems. (2016);20(3), 165–173.
6. Kampić K, Bonifačić D. Važnost ljestvica za zbrinjavanje moždanog udara. Medicina Fluminensis [Internet]. 2018 [pristupljeno 12.05.2021.];54(4):366-372. https://doi.org/10.21860/medflum2018_207348
7. Antončić I, Dunatov S, Tuškan-Mohar L, Bonifačić D, Perković O, Sošić M. Sistemska tromboliza u liječenju akutnog ishemijskog moždanog udara. Medicina Fluminensis [Internet]. 2013 [pristupljeno 11.05.2021.];49(4):454-462. Dostupno na: https://hrcak.srce.hr/112538
8. Kuriakose D, Xiao Z. Pathophysiology and Treatment of Stroke: Present Status and Future Perspectives. International Journal of Molecular Sciences. 2020;21(20), 7609. https://doi.org/10.3390/ijms21207609
9. Boursin P, Paternotte S, Dercy B, Sabben C, Maïer B. Sémantique, épidémiologie et sémiologie des accidents vasculaires cérébraux. Soins. 2018;63(828), 24–27.
10. Parmar P. Stroke: classification and diagnosis. The Pharmaceutical Journal. 2018 [pristupljeno 11.05.2021.] Dostupno na:https://pharmaceutical-journal.com/article/ld/stroke-classification-and-diagnosis
11. Gamulin S, Marušić M, Kovač Z. i sur. Patofiziologija. Sedmo, obnovljeno i izmijenjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 1991.

12. Li MZ, Zhan Y, Yang L, Feng XF, Zou HY, Lei JF, et al. MRI Evaluation of Axonal Remodeling After Combination Treatment With Xiaoshuan Enteric-Coated Capsule and Enriched Environment in Rats After Ischemic Stroke. Frontiers in Physiology. 2019;10.
13. Kawabori M, Shichinohe H, Kuroda S, Houkin K. Clinical Trials of Stem Cell Therapy for Cerebral Ischemic Stroke. International Journal of Molecular Sciences. 2020;21(19), 7380.
14. Uchiyama N. Anomalies of the Middle Cerebral Artery. Neurologia Medico-Chirurgica. 2017;57(6), 261–266.
15. Chang SJ, Cherng JH, Wang DH, Yu SP, Liou NH, Hsu ML. Transneuronal Degeneration of Thalamic Nuclei following Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. BioMed Research International. 2016;1–9.
16. Yew KS, Cheng EM. (2015). Diagnosis of acute stroke. American family physician. 2015;91(8), 528–536.
17. Jerath NU, Reddy C, Freeman WD, Jerath AU, Brown RD. Gender Differences in Presenting Signs and Symptoms of Acute Ischemic Stroke: A Population-Based Study. Gender Medicine. 2011;8(5), 312–319.
18. Coutts SB. Diagnosis and Management of Transient Ischemic Attack. CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology. 2017;23(1), 82–92.
19. Aguzzi A, Barres BA, Bennett ML. Microglia: Scapegoat, Saboteur, or Something Else? Science. 2013;339(6116), 156–161.
20. Xu S, Lu J, Shao A, Zhang JH, Zhang J. Glial Cells: Role of the Immune Response in Ischemic Stroke. Frontiers in Immunology. 2020;11.
21. Maida CD, Norrito RL, Daidone M, Tuttolomondo A, Pinto A. Neuroinflammatory Mechanisms in Ischemic Stroke: Focus on Cardioembolic Stroke, Background, and Therapeutic Approaches. International Journal of Molecular Sciences. 2020;21(18), 6454.
22. Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew MV. Astrocyte roles in traumatic brain injury. Experimental Neurology. 2016;275, 305–315.
23. Demarin V. Moždani udar - rastući medicinski i socijalno ekonomski problem. Acta clinica Croatica [Internet]. 2004 [pristupljeno 06.05.2021.];43(3 - Supplement 1):9-13. Dostupno na: https://hrcak.srce.hr/15226)
24. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Svjetski dan moždanog udara- #NeBudiTaj. [Internet]. 2020 [pristupljeno: 07.05.2021.] Dostupno na: https://www.hzjz.hr/aktualnosti/svjetski-dan-mozdan-udara-nebuditaj-2/

25. Eurostat. Heart diseases 2016. 2016 [pristupljeno: 11.05.2021.] Dostupno na: https://ec.europa.eu/eurostat/web/main/news/themes-in-the-spotlight/heart-diseases-2016
26. Barthels D, Das H. Current advances in ischemic stroke research and therapies. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. 2020;1866(4), 165260. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.09.012
27. Reeves MJ, Bushnell CD, Howard G, Gargano JW, Duncan PW, Lynch G, et al. Sex differences in stroke: epidemiology, clinical presentation, medical care, and outcomes. The Lancet Neurology. 2008;7(10), 915–926. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70193-5
28. Katan M, Luft A. Global Burden of Stroke. Seminars in Neurology. 2018;38(02), 208–211. https://doi.org/10.1055/s-0038-1649503
29. Niklasson A, Herlitz J, Jood K. Socioeconomic disparities in prehospital stroke care. Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine. 2019;27(1).
30. Sarikaya H, Ferro J, Arnold M. (2015). Stroke Prevention - Medical and Lifestyle Measures. European Neurology. 2015;73(3–4), 150–157. https://doi.org/10.1159/000367652
31. Dikanović M. Stres i moždani udar. Acta clinica Croatica [Internet]. 2002 [pristupljeno 14.05.2021.];41(3 Supplement 3):24-25. Dostupno na: https://hrcak.srce.hr/15320
32. Zhang Y, Parikh A, Qian S. Migraine and stroke. Stroke and Vascular Neurology. 2017;2(3), 160–167. https://doi.org/10.1136/svn-2017-000077
33. World Health Organization. Stroke: a global response is needed. 2017; [pristupljeno: 11.05.2021.] Dostupno na: https://www.who.int/bulletin/volumes/94/9/16-181636/en/
34. Knight-Greenfield A, Nario JJQ, Gupta A. Causes of Acute Stroke. Radiologic Clinics of North America. 2019;57(6), 1093–1108. https://doi.org/10.1016/j.rcl.2019.07.007
35. Budinčević H. MOŽDANI UDAR - MOŽEMO LI GA SPRIJEČITI?. Hrana u zdravlju i bolesti [Internet]. 2018 [pristupljeno 15.05.2021.];Specijalno izdanje(10. Štamparovi dani):26-26. Dostupno na: https://hrcak.srce.hr/218601
36. Lee CH, Jung KH, Cho DJ, Jeong SK. Effect of warfarin versus aspirin on blood viscosity in cardioembolic stroke with atrial fibrillation: a prospective clinical trial. BMC Neurol. 2019 May 1;19(1):82. https://doi.org/10.1186/s12883-019-1315-5
37. Hankey GJ. Stroke. The Lancet. 2017;389(10069), 641–654. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30962-X

38. Zhao SP, Zhao W, Xiao ZJ. The Benefits and Risks of Statin Therapy in Ischemic Stroke: A Review of the Literature. Neurology India. 2019;67(4), 983.
39. Gašparić I. PREDNOSTI LIJEČENJA MOŽDANOG UDARA INTRAVENSKOM SISTEMSKOM TROMBOLIZOM. Medicina familiaris Croatica [Internet]. 2015 [pristupljeno 15.05.2021.];23(1):61-66. Dostupno na: https://hrcak.srce.hr/138061
40. Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. Journal of Translational Medicine. 2009;7(1).
41. Singhal AB. Oxygen Therapy in Stroke: Past, Present, and Future. International Journal of Stroke. 2006;1(4), 191–200.
42. Smith WS. Endovascular Stroke Therapy. Neurotherapeutics, 2019;16(2), 360–368.
43. Brott T, Bogousslavsky J. Treatment of Acute Ischemic Stroke. New England Journal of Medicine. 2000;343(10), 710–722.
44. Ma R, Xie Q, Li Y, Chen Z, Ren M, Chen H, et al. Animal models of cerebral ischemia: A review. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2020;131, 110686.
45. Lin DJ, Finklestein SP, Cramer SC. New Directions in Treatments Targeting Stroke Recovery. Stroke. 2018;49(12), 3107–3114.
46. Langhorne P, Bernhardt J, Kwakkel G. Stroke rehabilitation. The Lancet. 2011;377(9778), 1693–1702.
47. Kim YJ, Lee J, Kang H, Jeon JY. Neurorestorative effect of erythropoietin and environmental enrichment in the early stage of stroke recovery. Animal Cells and Systems. 2016;20(3), 165–173.
48. Dubravica M. Rehabilitacija nakon moždanog udara. Medicus [Internet]. 2001 [pristupljeno 16.05.2021.];10(1_Moždani udar):107-110. Dostupno na: https://hrcak.srce.hr/19336
49. Vargek-Solter V. Terapija akutnog moždanog udara. Acta clinica Croatica [Internet]. 2002 [pristupljeno 16.05.2021.];41(3 Supplement 3):38-38. Dostupno na: https://hrcak.srce.hr/15328
50. Juenemann M, Braun T, Schleicher N, Yeniguen M, Schramm P, Gerriets T, et al. Neuroprotective mechanisms of erythropoietin in a rat stroke model. Translational Neuroscience. 2020;11(1), 48–59.
51. Traystman RJ. Animal Models of Focal and Global Cerebral Ischemia, ILAR Journal. 2003;Volume 44, Issue 2, Pages 85–95
52. Sicard KM, Fisher M. Animal models of focal brain ischemia. Experimental & Translational Stroke Medicine. 2009;1(1).

53. McCabe C, Arroja MM, Reid E, Macrae IM. Animal models of ischaemic stroke and characterisation of the ischaemic penumbra. Neuropharmacology. 2018;134, 169–177. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.09.02
54. Donnelly S. Why is erythropoietin made in the kidney? The kidney functions as a critmeter. American Journal of Kidney Diseases. 2001;38(2), 415–425. https://doi.org/10.1053/ajkd.2001.26111
55. Krantz Sanford B. Erythropoietin. The Journal of The American Society of Hematology. 1991; 419-434.
56. Suresh S, Rajvanshi PK, Noguchi CT. The Many Facets of Erythropoietin Physiologic and Metabolic Response. Frontiers in Physiology. 2020;10. https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01534
57. Jelkmann W. Biology of erythropoietin. The Clinical Investigator. 1994;72(6 Suppl):S3-10
58. Ridley DM, Dawkins F, Perlin E. Erythropoietin: a review. J Natl Med Assoc. 1994 Feb;86(2):129-35.
59. Rey F, Balsari A, Giallongo T, Ottolenghi S, Di Giulio AM, Samaja M, & Carelli S. Erythropoietin as a Neuroprotective Molecule: An Overview of Its Therapeutic Potential in Neurodegenerative Diseases. ASN Neuro. 2019;11, 175909141987142. DOI:10.1177/1759091419871420
60. Hou J, Wang S, Chen Shang Y, Zhong Chong Z, Maiese K. Erythropoietin Employs Cell Longevity Pathways of SIRT1 to Foster Endothelial Vascular Integrity During Oxidant Stress. Current Neurovascular Research. 2011;8(3), 220–235. https://doi.org/10.2174/156720211796558069
61. Gilboa D, Haim-Ohana Y, Deshet-Unger N, Ben-Califa N, Hiram-Bab S, Reuveni D, et al. Erythropoietin enhances Kupffer cell number and activity in the challenged liver. Scientific Reports. 2017;7(1). https://doi.org/10.1038/s41598-017-11082-7
62. Guneli E, Cavdar Z, Islekel H, Sarioglu S, Erbayraktar S, Kiray M, et al. Erythropoietin Protects the Intestine Against Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. Molecular Medicine. 2007;13(9–10), 509–517. https://doi.org/10.2119/2007-00032
63. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. Mol Med. 2002 Aug;8(8):495-505.

64. Brines M, Cerami A. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. Nature Reviews Neuroscience. 2005;6(6), 484–494. https://doi.org/10.1038/nrn1687
65. Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S, Akhisaroglu M, Konakc S, Ulukus C, et al. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002;99(4), 2258–2263. https://doi.org/10.1073/pnas.042693799
66. Hwang CH. Targeted Delivery of Erythropoietin Hybridized with Magnetic Nanocarriers for the Treatment of Central Nervous System Injury: A Literature Review. International Journal of Nanomedicine. 2020;Volume 15, 9683–9701. https://doi.org/10.2147/IJN.S287456
67. Fuentealba J, Hernández C, Burgos C, Gajardo A, Silva-Grecchi T, Gavilan J, Toledo J. Neuroprotective effects of erythropoietin on neurodegenerative and ischemic brain diseases: the role of erythropoietin receptor. Neural Regeneration Research. 2017;12(9), 1381. https://doi.org/10.4103/1673-5374.215240
68. Simon F, Floros N, Ibing W, Schelzig H, Knapsis A. Neurotherapeutic potential of erythropoietin after ischemic injury of the central nervous system. Neural Regeneration Research. 2019;14(8), 1309. https://doi.org/10.4103/1673-5374.253507
69. Wakhloo D, Scharkowski F, Curto Y, Javed Butt U, Bansal V, Steixner-Kumar AA, et al. Functional hypoxia drives neuroplasticity and neurogenesis via brain erythropoietin. Nature Communications. 2020;11(1). https://doi.org/10.1038/s41467-020-15041-1
70. Tsai TH, Lu CH, Wallace CG, Chang WN, Chen SF, Huang CR, et al. Erythropoietin improves long-term neurological outcome in acute ischemic stroke patients: a randomized, prospective, placebo-controlled clinical trial. Critical Care. 2015;19(1). https://doi.org/10.1186/s13054-015-0761-8
71. Tang BL. Sirt1 and the Mitochondria. Molecules and cells. 2016;39(2), 87–95. https://doi.org/10.14348/molcells.2016.2318
72. Perez-Pinzon M, Koronowski K. Sirt1 in cerebral ischemia. Brain Circulation. 2015;1(1), 69. https://doi.org/10.4103/2394-8108.162532
73. Zhang JF, Zhang YL, Wu YC. The Role of Sirt1 in Ischemic Stroke: Pathogenesis and Therapeutic Strategies. Frontiers in neuroscience, 2018;12, 833. https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00833

74. Chong ZZ, Shang YC, Wang S, Maiese K. SIRT1: new avenues of discovery for disorders of oxidative stress. Expert Opinion on Therapeutic Targets. 2012;16(2), 167–178.
75. Yang Y, Duan W, Li Y, Yan J, Yi W, Liang Z, et al. New role of silent information regulator 1 in cerebral ischemia. Neurobiology of Aging. 2013;34(12), 2879–2888. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.06.008
76. Wu H, Wang H, Zhang W, Wei X, Zhao J, Yan P, et al. rhEPO affects apoptosis in hippocampus of aging rats by upregulating SIRT1. Int J Clin Exp Pathol. 2015;8(6):6870-80.
77. Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat by Intraluminal Suture. Stroke. 1996;27(9), 1616–1623. https://doi.org/10.1161/01.str.27.9.1616
78. Longa EZ, Weinstein P. R., Carlson S., Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke. 1989;20(1), 84–91. https://doi.org/10.1161/01.str.20.1.84
79. Xu J, Jackson CW, Khoury N, Escobar I, Perez-Pinzon MA. Brain SIRT1 Mediates Metabolic Homeostasis and Neuroprotection. *Frontiers in endocrinology*. 2018;*9*, 702. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00702
80. Della-Morte D, Dave KR, DeFazio RA, Bao YC, Raval AP, Perez-Pinzon MA. Resveratrol pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via a sirtuin 1-uncoupling protein 2 pathway. Neuroscience. 2009; 159(3), 993–1002. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.01.017
81. Zhang F, Wang S, Gan L, Vosler PS, Gao Y, Zigmond MJ, Chen J. Protective effects and mechanisms of sirtuins in the nervous system. Progress in Neurobiology. 2011; 95(3), 373–395.
82. Gilley J, Coffer PJ, Ham J. FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. J Cell Biol. 2003 Aug 18;162(4):613-22. doi: 10.1083/jcb.200303026. Epub 2003 Aug 11. PMID: 12913110; PMCID: PMC2173804.
83. Arumugam TV, Baik SH, Balaganapathy P, Sobey CG, Mattson MP, Jo DG. Notch signaling and neuronal death in stroke. Progress in neurobiology. 2018; 165-167, 103–116. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.03.002

84. Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. Medicinal research reviews. 2020; 40(1), 158–189. https://doi.org/10.1002/med.21599
85. Kontis E, Pantiora E, Melemeni A, Tsaroucha A, Karvouni E, Polydorou A, Vezakis A, Fragulidis GP. Ischemic postconditioning decreases iNOS gene expression but ischemic preconditioning ameliorates histological injury in a swine model of extended liver resection. Translational gastroenterology and hepatology. 2019; 4, 5. https://doi.org/10.21037/tgh.2019.01.04
86. Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Campo GM, Arlotta M, Quartarone C, Saitta A, Caputi AP. Recombinant human erythropoietin inhibits iNOS activity and reverts vascular dysfunction in splanchnic artery occlusion shock. British journal of pharmacology. (1999); 127(2), 482–488. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702521
87. Qin C, Zhou LQ, Ma XT, Hu ZW, Yang S, Chen M, Bosco DB, Wu LJ, Tian DS. Dual Functions of Microglia in Ischemic Stroke. Neuroscience bulletin. 2019; 35(5), 921–933. https://doi.org/10.1007/s12264-019-00388-3
88. Kim JY, Park J, Chang JY, Kim SH, Lee JE. Inflammation after Ischemic Stroke: The Role of Leukocytes and Glial Cells. Experimental neurobiology. 2016; 25(5), 241–251. https://doi.org/10.5607/en.2016.25.5.241
89. Lan KM, Tien LT, Cai Z, Lin S, Pang Y, Tanaka S, Rhodes PG, Bhatt AJ, Savich RD, Fan LW. Erythropoietin Ameliorates Neonatal Hypoxia-Ischemia-Induced Neurobehavioral Deficits, Neuroinflammation, and Hippocampal Injury in the Juvenile Rat. International journal of molecular sciences. 2016;17(3), 289. https://doi.org/10.3390/ijms17030289

Životopis

LUCIJA DAUTOVIĆ

Lucija Dautović rođena je 14. studenog, 1997. u Novoj Gradišci. Osnovnoškolsko obrazovanje završava u Novoj Gradišci, 2012. godine. Srednjoškolsko obrazovanje završava 2016. godine na Zdravstvenom učilištu u Zagrebu, gdje stiče zvanje farmaceutskog tehničara. Iduće godine upisuje Zdravstveno veleučilište Zagreb, gdje 2019. 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.

Tijekom diplomskog studija volontirala je na Kliničkom zavodu za kliničku mikrobiologiju u KBC Rijeka te je radila studentski posao epidemiološkog anketiranja na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Primorsko – goranske županije.