

# Usporedba motoričkih sposobnosti između kemijski inducirane i kongenitalne demijelinizacije miševa

---

Plenča, Tia

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:978909>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Tia Plenča**

**USPOREDBA MOTORIČKIH  
SPOSOBNOSTI IZMEĐU KEMIJSKI  
INDUCIRANE I KONGENITALNE  
DEMIJELINIZACIJE MIŠEVA**

**Završni rad**

**Osijek, 2024.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Tia Plenča**

**USPOREDBA MOTORIČKIH  
SPOSOBNOSTI IZMEĐU KEMIJSKI  
INDUCIRANE I KONGENITALNE  
DEMIJELINIZACIJE MIŠEVA**

**Završni rad**

**Osijek, 2024.**

Rad je ostvaren u Laboratoriju za neurobiologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku.

Mentor rada: doc. dr. sc. Barbara Viljeić

Rad ima 31 list, 9 tablica i 3 slike.

## *Zahvala*

*Ovim bih se putem htjela zahvaliti mentorici doc. dr. sc. Barbari Viljeić na pristupačnosti, savjetima, neiscrpnom usmjeravanju i velikoj pomoći tijekom izrade ovog rada.*

*Veliko hvala doc. dr. sc. Vedrani Ivić na pomoći s obradom podataka.*

*Hvala mojoj obitelji, mojim F., M., i M. bez kojih studiranje u Osijeku ne bi bilo ostvarivo.*

## SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	Mijelin.....	1
1.2.	Demijelinizacija.....	2
1.3.	Motorički testovi za procjenu neurološke funkcije.....	3
1.3.1.	Rotarod.....	4
1.3.2.	Test otiska stopala.....	4
1.3.3.	Balansna greda.....	5
1.3.4.	Test plivanja.....	5
1.3.5.	Snaga stiska.....	6
1.4.	Mišji modeli neurodegenerativnih bolesti.....	6
2.	HIPOTEZA.....	9
3.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	10
4.	MATERIJALI I METODE.....	11
4.1.	Ustroj studije.....	11
4.2.	Materijali.....	11
4.2.1.	Pokusne životinje.....	11
4.3.	Metode.....	11
4.3.1.	Rotarod.....	11
4.3.2.	Test otiska stopala.....	12
4.4.	Statističke metode.....	12
5.	REZULTATI.....	13
5.1.	Rezultati Rotarod testa.....	13
5.2.	Rezultati testa otiska stopala.....	16
6.	RASPRAVA.....	22
7.	ZAKLJUČAK.....	25
8.	SAŽETAK.....	26
9.	SUMMARY.....	27
10.	LITERATURA.....	28
11.	ŽIVOTOPIS.....	31

## POPIS KRATICA

B4Galnt1	beta-1,4-N-acetil-galaktozaminiltransferaza (engl. beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyltransferase)
CNS	središnji živčani sustav (engl. <i>central nervous system</i> )
KO	engl. <i>knock out</i>
OPC	prekursorske stanice oligodendrocita (engl. <i>oligodendrocyte progenitor cell</i> )
PNS	periferni živčani sustav (engl. <i>peripheral nervous system</i> )
WT	divlji tip miša (engl. <i>wild type</i> )
WT-CUP	divlji tip miša hranjen kuprizonom

## 1. UVOD

### 1.1. Mijelin

Mijelin je ključna tvar za pravilnu funkciju živčanog sustava te jedna od složenijih tvari za uspješnu međustaničnu interakcija u živčanom sustavu, a samim time i tijelu. Obavija živčana vlakna (aksone) u središnjem (CNS) i perifernom živčanom sustavu (PNS), omogućuje brzo provođenje akcijskih potencijala duž aksona te pruža fizičku i trofičku potporu neuronima (1). Mijelin se može opisati kao specijalizirana multilamelarna membrana sastavljena od 40 ili više čvrsto omotanih lipidnih dvosloja, sadrži visoke razine lipida, a njegovo nastajanje zahtijeva sintezu lipida i unos masnih kiselina izvan stanica (1). Visoke razine lipida i proteina omogućuju čvrsto pakiranje međusobno se povezujući nekovalentnim interakcijama. Tri glavne vrste lipida u mijelinu su kolesterol, fosfolipidi (kao što su plazmalogen, lecitin i sfingomijelin) i glikolipidi (kao što je galaktozilceramid) (2). Nadalje, mijelin sadrži dinamične lipidne domene, poznate kao lipidne splavi koje su bogate kolesterolom i galaktozilceramidom, ali imaju niske razine fosfatidilkolina (3). Ove strukture igraju ključnu ulogu u formiranju i stabilizaciji mijelina te u regulaciji membranskih proteina i prijenosu signala. Tri najzastupljenija lipida u mijelinu (kolesterol, galaktozilceramid i plazmalogen) čine oko 65% ukupnih mijelinskih lipida (2). Samim time, razlike u sastavu mijelina u CNS-u i PNS-u su minimalne osim što periferni mijelin ima više fosfatidilkolina i sfingomijelina u usporedbi s mijelinom u CNS-u. U CNS-u, mijelin stvaraju oligodendrociti, dok u PNS-u ovu funkciju obavljaju Schwannove stanice (3). Oligodendrociti se razvijaju iz glijalnih progenitorskih stanica, poznatih kao prekursorske stanice oligodendrocita (OPC, engl. *oligodendrocytes progenitor cell*). Zanimljivo je da te prekursorske stanice ostaju prisutne u CNS-u tijekom cijelog života, omogućujući stvaranje novih oligodendrocita koji regeneriraju mijelin. Smanjenje mijelina u CNS-u često je rezultat neurodegenerativnih bolesti ili procesa starenja. Zbog svoje ključne uloge u sintezi mijelina, brojna se istraživanja bave proučavanjem prekursorskih stanica, još od njihovog 1980-tih godina. Veliki je naglasak na razumijevanje stanične i razvojne biologije OPC-a te je ono od velike važnosti za razumijevanje mehanizama kontrole proizvodnje i regeneracije mijelina u bolestima i ozljedama CNS-a u kojima je propadanje mijelina glavni uzrok patologije i invalidnosti (2). Postoji nekoliko značajnih razlika između sinteze mijelina u CNS-u i PNS-u. U CNS-u, mijelin djeluje kao izolator za aksone



neurona, omogućujući brži i učinkovitiji prijenos živčanih impulsa, što je ključno za brze refleksne reakcije i kompleksne kognitivne funkcije. Oligodendrociti mogu mijelinizirati više aksona odjednom što pomaže u koordinaciji složenih neuralnih mreža (4). S druge strane, u PNS-u, gdje mijelin omogućuje brzi prijenos impulsa, učinkovite motoričke reakcije i osjetne funkcije, Schwannova stanica mijelinizira samo jedan akson što je ključno za regeneraciju živaca nakon ozljede jer distalno od ozljede, započinju staničnu diferencijaciju kojom nastaju popravne Schwannove stanice, tj. Bungnerove stanice (5). Odgovor na ozljedu sastoji se od 2 komponente. Jedna od tih komponenti je reverzija mijelinske diferencijacije gdje se geni koji kodiraju ključni mijelinski faktor Egr2, enzimi sinteze kolesterola, strukturni proteini poput mijelinskog osnovnog proteina smanjuju, a molekule koje karakteriziraju premijelinizirajuće Schwannove stanice povećavaju (5). Druga komponenta uključuje aktivaciju urođenog imunološkog odgovora i kemotaktičnog proteina monocita 1, od strane Schwannovih stanica što omogućuje regrutiranje makrofaga u živac i potiče njegovu regeneraciju (5). U CNS-u, regeneracija je ograničena jer oligodendrociti ne podržavaju regeneraciju kao Schwannove stanice u PNS-u što je razlog zašto ozljede CNS-a često rezultiraju trajnim oštećenjem. Schwannove stanice aktivno sudjeluju u regeneraciji živaca stvarajući okoliš koji potiče rast i popravak aksona nakon ozljede (5).

Tijekom razvoja živčanog sustava kralježnjaka, mijelinizacija počinje oko rođenja, prvo u perifernom živčanom sustavu zatim u leđnoj moždini i konačno u mozgu. Zanimljivo je da, iako je mijelinizacija u perifernom živčanom sustavu dovršena nedugo nakon rođenja (unutar dvije godine kod ljudi), mijelinizacija u središnjem živčanom sustavu proces je koji traje tijekom cijele odrasle dobi (1)

## **1.2. Demijelinizacija**

Demijelinizacija je proces oštećenja ili potpunog propadanja mijelina, zaštitne ovojnice oko aksona u CNS-u i PNS-u. Kako je mijelin ključna tvar za brz prijenos električnih signala duž živčanih vlakana (3), njegovo oštećenje uvelike utječe na motoričku funkciju i dovodi do raznih neuroloških problema, tj. do demijelinizacijskih bolesti koje treba razlikovati od onih u kojima dolazi do neispravnog razvoja mijelinske ovojnice, tj. dismijelinizacije (6). Demijelinizacijske bolesti odnose se na gubitak ili oštećenje postojećeg mijelina uz očuvanje aksona, a nastaju zbog

procesa koji oštećuju mijelinske ovojnice ili stanice koje ih stvaraju (4). Odnose se samo na one patologije gdje prvo dolazi do razgradnje mijelina i gdje je degeneracija aksona sekundarna.

Postoje različiti uzroci demijelinizacije. Tako razlikujemo autoimunu, upalnu, virusnu, metabolički uzrokovanu, hipoksično ishemijsku i kompresijom induciranu demijelinizaciju koja je ujedino i najrjeđa (6). Također može biti posljedica genetičkog poremećaja poput adrenoleukodistrofije ili izloženosti toksinima (7). Bolest poput multiple skleroze, koja je također najčešća upalom uzrokovana demijelinizacija, svrstava se i u kategoriju autoimunih bolesti (7). Razvojem bolesti dolazi do nastanka demijelinizacijskih plakova koji mogu zahvatiti različite regije mozga: korteks, subkortikalnu bijelu i sivu tvar, bijelu tvar malog mozga, moždano deblo i leđnu moždinu, a pritom biti različitih veličina i oblika (8). Važnu ulogu u neurodegenerativnim poremećajima imaju i mikroglije, stanični makrofagi koji se nalaze u CNS-u (8). Pronađene su u aktivnim i preaktivnim lezijama multiple skleroze što dokazuje da fagocitiraju mijelin i doprinose razvoju i progresiji bolesti (8). Razna su istraživanja usmjerena na proučavanje patogeneze bolesti i pronalazak lijeka za što služe razni eksperimentalni mišji modeli poput kuprizonskog i genetički modificiranog *B4Galnt1* modela koji će biti detaljnije opisani u nastavku rada.

Suprotno tome, remijelinizacija je prirodan i vrlo učinkovit mehanizam popravka nakon demijelinizacije (9). Međutim, kako bi razumjeli patofiziologiju remijelinizacije i razloge njenog neuspjeha te istražili faktore koji podržavaju remijelinizaciju, potrebni su nam različiti modeli za istraživanje ovih procesa.

### **1.3. Motorički testovi za procjenu neurološke funkcije**

Mnogim je istraživanjima utvrđena sličnost između mišjih modela i ljudskih neuroloških bolesti, tj. uspješno su napravljeni eksperimentalni mišji modeli koji odgovaraju bolesnom stanju (oponašaju patološko stanje u ljudi) što je od iznimne važnosti za proučavanje same patofiziologije bolesti i pronalaska adekvatne terapije. U tu se svrhu koriste razni motorički testovi koji pružaju uvid u motoričku funkciju miša ili se koriste u procjeni oporavka nakon primijenjene terapije. Postoje razni motorički testovi, ovisno na koju su domenu ispitivanja usmjereni. Možemo ih podijeliti na opće neurološke testove, testove lokomotorne aktivnosti, testove motoričke koordinacije i ravnoteže, procjena korištenja udova, akustični startle refleksi te operantne zadatke (10). S obzirom na to da se u ovom radu ispituje motorička sposobnost i koordinacija miševa, fokus će biti upravo na testovima koji to ispituju.

### 1.3.1. Rotarod

Rotarod test osmišljen je za ispitivanje motoričke koordinacije i ravnoteže kod glodavaca, ali najčešće se koristi kod procjene motorike kod miševa (11). Uređaj Rotarod sastoji se od rotirajućeg cilindra na koji se postavi miš, motora koji njime upravlja, sata za mjerenje vremena i podloge za detekciju pada. Brzina može biti konstantna ili postupno ubrzavati od 0 do 40 okretaja u minuti (rpm, prema engl. *revolutions per minute*). Test u kojem se koristi ubrzanje je brži i učinkovitiji, ali umor može imati utjecaj na motoričku koordinaciju pri različitim brzinama što može dovesti do pogrešnih rezultata. S druge strane, test s fiksnim brzinama pruža zasebne podatke za svaki raspon brzina rotacije, što ga čini osjetljivijim. Vrijeme trajanja testa iznosi 5 minuta unutar kojeg se mjeri vrijeme koje miš provede na rotirajućem cilindru. U slučaju pada, udara na podlogu ispod cilindra, a vrijeme se automatski zaustavlja i bilježi. Iako se test smatra brzim, učinkovitim i osjetljivim, neki od nedostataka testa odnose se na pojedinačne životinje koje odbijaju test i jednostavno padnu čim se postave na šipku. Na motoričku izvedbu na rotarodu osim same motoričke koordinacije, također utječu čimbenici poput učenja i kardiorespiratorne izdržljivosti (12). Uočeno je kako teški miševi postižu lošije rezultate od lakših miševa, stoga je potrebno tijekom testiranja uzeti u obzir masu miša (12).

### 1.3.2. Test otiska stopala

Test otiska stopala eksperimentalna je tehnika koja se koristi za evaluaciju hodanja, ravnoteže i motoričke sposobnosti kod miševa te je jedna od metoda korištenih u ovom istraživanju (13). U mnogim se literaturnim navodima predlaže kao pokazatelj motoričke izvedbe u kuprizonskom i drugim životinjskim modelima multiple skleroze (12).

Miševim se šape oboje bojom te se postave u dugi uski hodnik s papirnatom podlogom. Kada miš protrči tim hodnikom, na papiru ostanu zabilježeni otisci šapa koji se analiziraju. Mjeri se nekoliko parametara kao što su duljina koraka, širina koraka, kut između otisaka prednjih i stražnjih šapa, širina staze, raspon i preklapanje šapa, pogreške (engl. *paw faults*) i simetrija hoda gdje se uspoređuju otisci lijevih i desnih šapa (13). Također postoji automatizirana verzija ovog testa gdje se koriste visokobrzinske video kamere za mjerenje duljine koraka dok miš trči na pokretnoj traci (10). Iako pruža detaljan uvid u procjenu kretanja što se ručnim mjerenjem testa ne može uvidjeti, istraživanja su pokazala kako je još prerano tvrditi razinu osjetljivosti testa kao što

je na razini ručne analize (10). Unatoč automatizaciji ovog testa, o čemu se još uvijek raspravlja, od velike je važnosti u ljudskim studijama jer se koristi u detekciji neuroloških poremećaja kao što su Parkinsonova i Huntingtonova bolest. Važan je za ispitivanje učinaka raznih lijekova te za proučavanje učinaka genetskih modifikacija na motoričku sposobnost što uvelike doprinosi razumijevanju uloge određenih gena u motoričkim funkcijama (13).

### **1.3.3. Balansna greda**

Ovim se testom procjenjuje sposobnost miša da zadrži ravnotežu tijekom prelaska preko uske grede do sigurnosne podloge (10). Iako je izvorno je dizajniran za procjenu motoričkih deficita kod starijih štakora, pokazao se jednako korisnim u procjeni motoričke koordinacije i ravnoteže kod mladih i genetički izmijenjenih miševa (13). Test mjeri vrijeme potrebno za prelazak preko grede, broj pogrešaka, proklizavanja šapa i pad s grede ukoliko do njega dođe. Postoje razne verzije ovog testa koje se razlikuju po obliku i položaju grede (10). One mogu biti četvrtaste, okrugle, mogu se sužavati prema sigurnosnoj podlozi, a sama greda umjesto horizontalnog položaja može biti nagnuta jer miševi prirodno teže trčanju uzbrdo kako bi pobjegli. Ove prilagodbe utječu na povećanje osjetljivosti testa što je vrlo korisno u ranom otkrivanju motoričkih deficita u mišjim modelima Huntingtonove bolesti. Nedostatak testa najčešće se odnosi na potrebnu motivaciju miša kako bi prešao gredu što može utjecati na samu izvedbu (10).

### **1.3.4. Test plivanja**

Tijekom testa plivanja proučava se koordinirana uporaba udova kod miševa. Miševi se puste u prozirni akvarij od pleksiglasa s ciljem da preplivaju udaljenost od jednog kraja akvarija do sigurnosne platforme koja se nalazi na drugom kraju. Plivanje se snima video kamerom, zatim se te snimke analiziraju. Bilježe se broj udaraca lijevom i desnom prednjom i stražnjom šapom, brzina plivanja, vrijeme potrebno za prelazak akvarija, a u obzir se uzima svaka neusklađenost pokreta (10). Ovaj se test pokazao iznimno osjetljivim kod normalnih i genetički modificiranih miševa. Unatoč svojoj jednostavnosti i osjetljivosti treba oprezno postupati s miševima koji imaju uznapredovali stadij bolesti jer može doći do utapanja, a sama video analiza zahtjeva nešto više vremena za obradu podataka (10).

### 1.3.5. Snaga stiska

Test snage stiska vrlo je specifična metoda usmjerena na neuromuskularnu funkciju u kojoj se mjeri maksimalna snaga mišića prednjih udova te kombinirana snaga prednjih i stražnjih udova (14). Može se provesti na tri načina (10). Prvo, testira se sposobnost miša da se u visećem položaju drži na žičanoj mreži ili poklopcu kaveza, obično do 1 minute. Drugo, ispituje se vrijeme koje miš može visjeti na žici držeći se samo prednjim šapama i treće, mjeri se sila potrebna da se miš povuče s uske šipke za koju se drži. Ovaj se test koristi za mjerenje tolerancije miševa na lijekove, poput etanola (koji inducira miorelaksaciju) te za procjenu progresije bolesti kod genetički modificiranih miševa kojima je utišan gen za kompleksin 1 ili cerebelarnim Lurcher miševima (15). Cerebelarni Lurcher miševi genetički su modificirani s mutacijom u genu *Grid2* koji kodira glutamatni receptor delta 2. Navedena mutacija dovodi do degeneracije specifičnih neurona u malom mozgu što dovodi do motoričkih poremećaja. Odrasli su miševi ataksični i sklони padanju prilikom pokušaja hodanja što je rezultat potpunog gubitka *Lc/+* Purkinjeovih stanica u malom mozgu koji počinje tijekom prvih nekoliko postnatalnih tjedana nakon čeka slijedi postupni gubitak granuliranih stanica (15).

Iako je test vrlo specifičan, ima nekoliko nedostataka. Metoda s obrnutom mrežom ovisi o ujednačenosti mase miševa unutar ispitivane skupine, što također utječe na metodu vješanja na žici. Kod mehaničkih mjerača snage može doći do odbijanja miševa da se drže za šipke, no to se može djelomično riješiti zamjenom šipke metalnom žicom što omogućava naj snažnijim životinjama da ostvare tako dobar hvat da mogu podići više od svoje tjelesne težine (10, 13). Kako bi se nadišli ovi problemi i povećala osjetljivost testa, jedan od pokušaja uključuje dodavanje različitog tereta na mrežu za koju se miš drži dok je obješen za rep.

## 1.4. Mišji modeli neurodegenerativnih bolesti

Multipla skleroza je autoimuna upalna bolest koja uzrokuje gubitak mijelina i primarno zahvaća CNS (8). Različite faze bolesti karakteriziraju specifični stanični mehanizmi i upalni procesi koji ovise o imunološkim stanicama CNS-a, poput mikroglije, te infiltraciji perifernih imunoloških stanica, poput T i B stanica. Istraživanje bolesti, zbog različitih stadija, često uključuje više od jednog eksperimentalnog životinjskog modela stoga je ključno odrediti koji model najbolje predstavlja stanje bolesti ili je najprikladniji za istraživanje specifičnog terapijskog pristupa.

*B4Galnt1* i kuprizonski modeli miša često se koriste za istraživanje neurodegenerativnih poremećaja zbog njihove sličnosti s bolestima poput multiple skleroze. Navedeni su modeli korišteni u ovom istraživanju stoga će biti detaljnije opisani.

U *B4Galnt1* modelu, gen *B4Galnt1* odgovoran za sintezu složenih gangliozida, je utišan. U procesu biosinteze gangliozida, beta-1,4-N-acetil-galaktozaminiltransferaza 1 (*B4Galnt1*) djeluje kao GD2/GM2 sintetaza, što je ključni enzim koji prenosi N-acetilgalaktozamin (*GalNAc*) na GD3/GM3 i tvori GD2/GM2 (16). Odsutnost tog gena onemogućuje sintezu četiri glavna složena gangliozida u sisavaca: GD1a, GD1b, GT1b i GM1 uključujući i GM2 i GD2 (17). Gangliozidi su glikosfingolipidi uključeni u diferencijaciju, rast stanica, staničnu signalizaciju i međustaničnu komunikaciju te igraju ključne uloge u regeneraciji neurona, formiranju memorije, sinaptičkom prijenosu i neurogenezi (17). Sastavni su dio membrana svih stanica kralježnjaka, a četiri kompleksna gangliozida nalaze se samo u mozgu. Građeni su od dugolančanih masnih kiselina i oligosaharidnih lanaca što omogućuje interakciju s proteinima i receptorima na staničnim membranama, a njihovu strukturu, u usporedbi s drugim sfingomijelinima, karakterizira prisutnost sijalinske kiseline (1). Heterogenost i raznolikost struktura u njihovim ugljikohidratnim lancima karakteristične su oznake ovih lipida jer je do sada je identificirano 188 gangliozida s različitim ugljikohidratnim strukturama kod kralježnjaka (18). Iako njihova funkcija nije potpuno razjašnjena, poznato je da kompleksni gangliozidi služe kao markeri sinaptogeneze, rane mijelinizacije i zrelosti neurona. Zbog toga, utišavanje navedenog gena rezultira demijelinizacijom živčanih vlakana i poremećajem motoričke koordinacije. Ovakva demijelinizacija fenotipski odgovara multiploj sklerozi što ovaj model čini izuzetno značajnim za terapijska istraživanja bolje razumijevanje bolesti. Promjene u razinama gangliozida identificirane su kod poremećaja poput Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti, Huntingtonove bolesti, amiotrofične lateralne skleroze (ALS) i nasljedne spastične paraplegije (HSP, engl. *hereditary spastic paraplegia*).

Demijelinizacija može biti izazvana i kemijskim tvarima poput kuprizona. Kuprizon, (bis(cikloheksilidin hidrazid)), organski je spoj koji djeluje kao kelator bakra. Uzrokuje poremećaj metabolizma bakra što dovodi do apoptoze oligodendrocita i narušavanja sinteze mijelina (9). Očituje se demijelinizacijom i posljedičnim neurološkim deficitima, uključujući smanjenom motoričkom funkcijom i koordinacijom. Istraživanje je pokazalo da je toksičnost kuprizona jedan od rijetkih modela multiple skleroze koji proizvodi demijelinizaciju sive tvari, posebno u korteksu, hipokampusu i dubokim jezgrama sive tvari (7). Intoksikacija kuprizonom dovodi do gubitka

mijelina i selektivne smrti oligodendrocita u nekoliko regija mozga, kao što su *corpus callosum* i hipokampus, pokazujući sličnosti s lezijama u progresivnim stadijima multiple skleroze (6). Istraživanje provedeno na kuprizonskom modelu pokazalo je dva različita, ali međusobno povezana mehanizma koji uzrokuju demijelinizaciju kuprizonom: unutarnja i vanjska stanična oštećenja (2). Unutarnja oštećenja odnose se na ona unutar oligodendrocita koja nastaju zbog mitohondrijske disfunkcije ili smanjene sinteze mijelinskih proteina i nazivaju se intrinzičnim staničnim oštećenjima. S druge strane, vanjska stanična oštećenja uključuju ona koja su izazvana astrocitima i mikroglijom te perifernim imunološkim stanicama kao što su neutrofil i T-stanice. Ta se oštećenja nazivaju ekstrinzičnim staničnim oštećenjima.

Razumijevanje dvaju glavnih mehanizama djelovanja kuprizona, primarne oligodendrogliopatije i primarne imunocitopatije, ključno je za korištenje ovog modela u predkliničkim studijama za identifikaciju novih terapija za multiplu sklerozu (2).

## 2. HIPOTEZA

Demijelinizacija uzrokovana kuprizonom i genetičkim modifikacijama gena za sintezu kompleksnih gangliozida *B4Galnt1* dovodi do smanjenja motoričke sposobnosti i koordinacije miševa kroz različite patofiziološke mehanizme.



### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- ispitati motoričku sposobnost i koordinaciju genetički modificiranih *B4Galnt1* miševa
- ispitati motoričku sposobnost i koordinaciju miševa hranjenih kuprizonom
- ispitati razlike u motoričkoj sposobnosti i koordinaciji genetički izmijenjenih miševa, miševa hranjenih kuprizonom i kontrolnih miševa divljeg tipa

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Ustroj studije

Studija je ustrojena kao eksperimentalno istraživanje slučajeva i kontrola.

### 4.2. Materijali

#### 4.2.1. Pokusne životinje

Istraživanje je provedeno na tri tipa miša. Prva skupina uključuje genetički modificirane miševe (KO, engl. *knock out*) s utišanim *B4Galnt1* genom koji je odgovoran za sintezu složenih gangliozida. Drugu skupinu čine miševi divljeg tipa C57Bl/6 hranjeni 21 dan hranom u koju je umiješan 0,2% kuprizon, organski spoj koji djeluje kao kelator bakra. Treću skupinu čine miševi divljeg tipa (WT, engl. *wild type*) koji služe kao kontrolna skupina.

U istraživanje je uključeno ukupno 30 miševa. Ispitano je šest WT miševa starosti 3 mjeseca, šest WT miševa starosti 6 mjeseci, šest WT miševa hranjenih kuprizonom starosti 3 mjeseca, šest WT miševa hranjenih kuprizonom starosti 3 mjeseca te dvije skupine po tri KO miša (*B4Galnt1* KO) starosti 3 i 6 mjeseci.

Za ovo je istraživanje dobivena dozvola Etičkog povjerenstva Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku Medicinskog fakulteta Osijek.

### 4.3. Metode

#### 4.3.1. Rotarod

U ovom je istraživanju proveden Rotarod test za procjenu motoričke sposobnosti miševa. Uređaj Rotarod (Rota-Rod, Ugo Basile, Varese, Italy) koji se koristio sastoji se od pet cilindara promjera 3 cm, motora, sata i platforme za detekciju pada. Test je proveden na način da je miš bio postavljen na cilindar te se mjerilo koliko će se dugo zadržati na cilindru prije nego što padne. Miševi su bili trenirani na rotirajućem cilindru prije glavnog ispitivanja, ne duže od 3 minute. Maksimalno vrijeme koje se mjerilo tijekom testiranja iznosilo je 5 minuta, odnosno 300 sekundi. Nakon 5 minuta, test se prekidao. Vrijeme latencije, tj. vrijeme koje je miš proveo na cilindru prije pada, mjerilo se kao pokazatelj njihove koordinacije pokreta i ravnoteže. Mjerenje je ponovljeno 3 puta u razmaku od 2 tjedna. Ova je metoda omogućila preciznu procjenu motoričkih sposobnosti miševa, s naglaskom na njihovu sposobnost održavanja ravnoteže i koordinaciju pokreta.

### 4.3.2. Test otiska stopala

Miševima su netoksičnom bojom obojane prednje i zadnje šape, zatim su postavljeni u uski hodnik gdje su hodali po papiru. Dok su miševi hodali, na papiru su ostajali otisci njihovih šapa koji su se potom analizirali. Mjerila se udaljenost od sredine otiska prednje šape do sredine otiska zadnje šape, zasebno za lijeva i desna strana, kako bi se procijenila udaljenost između koraka. Također se u obzir uzimala simetriju hodanja uspoređujući otiske lijeve i desne strane, tražeći moguću asimetriju koja bi mogla ukazivati na motoričke i neurološke poremećaje.

Promjene u koordinaciji pokreta, stabilnosti i simetriji koraka mogu se vizualno primijetiti na temelju oblika i rasporeda otisaka stopala. Ovim se vizualni pristupom brzo i učinkovito može ocijeniti motorička funkcija i identifikacija potencijalnih promjena uzrokovanih demijelinizacijom.

### 4.4. Statističke metode

Za statističku obradu podataka u ovome se radu koristio program IBM SPSS Statistics v29 (Quest Software Inc., Aliso Viejo, CA, SAD). Normalnost distribucije prikupljenih podataka testirana je Shapiro-Wilk testom. Za usporedbu više nezavisnih uzoraka kao što su skupine miševa različitih tretmana i starosti, razlika je bila ispitana neparametrijskim testom Kruskal-Wallis s post hoc Dunn testovima. Kako bi se ispitao utjecaj starosti i tretmana na motoričku sposobnost različitih skupina miševa, tj. dviju različitih nezavisnih varijabli na jednu zavisnu varijablu, kao i za ispitivanje postoji li interakcija između tih nezavisnih varijabli koristio se Two-way ANOVA test. Za ispitivanje statističke značajnosti između više skupina koje prate normalnu distribuciju, korišten je One-way ANOVA s post hoc testovima, Tukey's multiple comparison test. Statistička značajnost ( $p$ ) iznosi  $< 0,05$ . Deskriptivna je statistika numeričkih podataka prikazana medianom, minimumom (min), maksimumom (max), prvim i trećim kvartilom (Q1 i Q3) te interkvartilnim rasponom (IQR).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Rezultati Rotarod testa

Ispitana je motorička sposobnost *B4Galnt1* KO miševa, miševa hranjenih kuprizonom i miševa divljeg tipa (starosti 3 i 6 mjeseci) trima mjerenjima na rotarodu u razmaku od 2 tjedna. Postojanje statistički značajne razlike među skupinama ispitano je za svako mjerenje.

**Tablica 1.** Deskriptivna statistika skupina po mjerenju.

		1. mjerenje	2. mjerenje	3. mjerenje
<b>KO (3mj)</b>	<b>N</b>	3	3	3
	<b>median</b>	230	300	300
	<b>min</b>	26	4	18
	<b>Q1</b>	128	152	159
	<b>IQR</b>	137	148	141
	<b>Q3</b>	265	300	300
	<b>max</b>	300	300	300
<b>KO (6mj)</b>	<b>N</b>	3	3	3
	<b>median</b>	215	289	300
	<b>min</b>	189	221	140
	<b>Q1</b>	202	255	220
	<b>IQR</b>	15	39,5	80
	<b>Q3</b>	217	294,5	300
	<b>max</b>	219	300	300
<b>WT (3mj)</b>	<b>N</b>	6	6	6
	<b>median</b>	155,5	300	300
	<b>min</b>	55	165	131
	<b>Q1</b>	83,5	266,25	257,75
	<b>IQR</b>	172,25	33,75	42,25
	<b>Q3</b>	255,75	300	300
	<b>max</b>	300	300	300
<b>WT (6mj)</b>	<b>N</b>	6	6	6
	<b>median</b>	300	300	300
	<b>min</b>	55	62	102
	<b>Q1</b>	238,75	240,5	250,5
	<b>IQR</b>	61,25	59,5	49,5
	<b>Q3</b>	300	300	300
	<b>max</b>	300	300	300
<b>WT - CUP (3mj)</b>	<b>N</b>	6	6	6
	<b>median</b>	278,5	300	300

Nastavak **tablice br. 1**

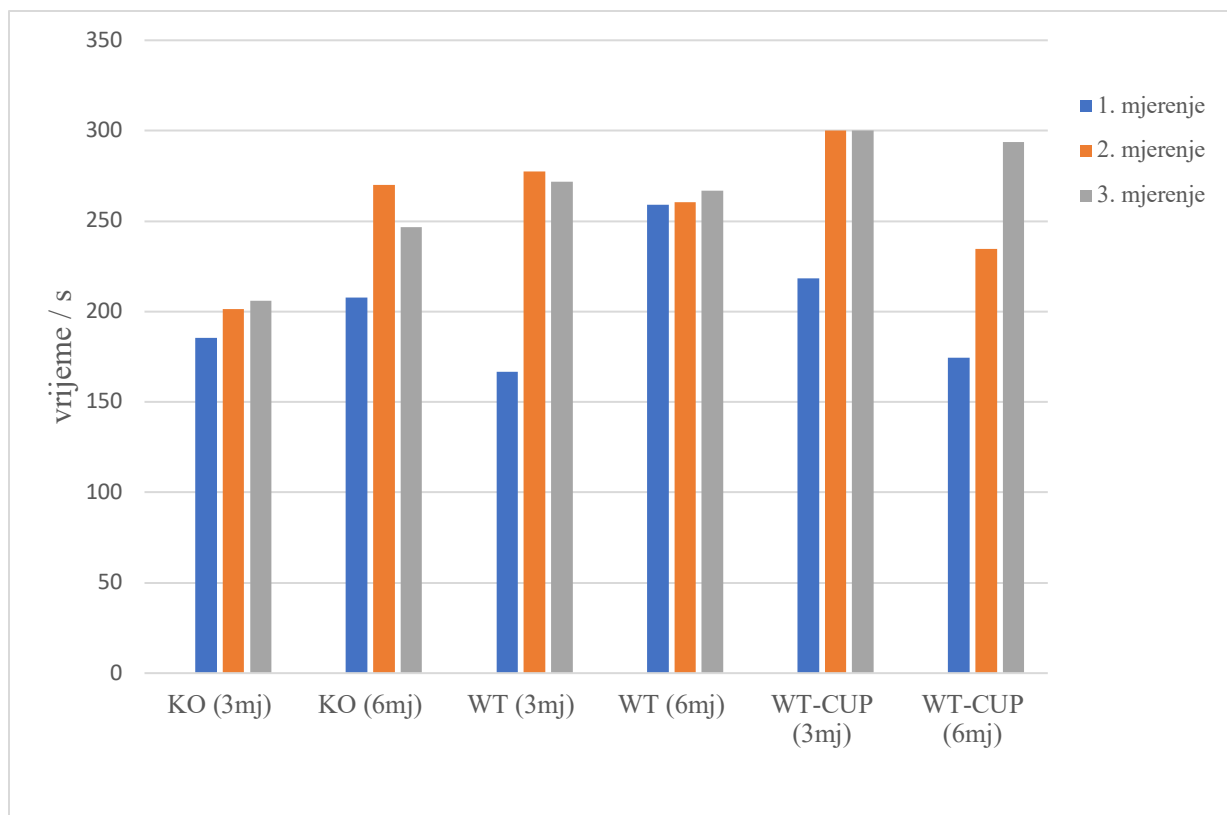
<b>WT - CUP (3mj)</b>	<b>median</b>	278,5	300	300
	<b>min</b>	64	300	300
	<b>Q1</b>	83,5	300	300
	<b>IQR</b>	216,5	0	0
	<b>Q3</b>	300	300	300
	<b>max</b>	300	300	300
<b>WT - CUP (6mj)</b>	<b>N</b>	6	6	6
	<b>median</b>	165	262,5	300
	<b>min</b>	27	115	263
	<b>Q1</b>	73,5	154,75	290,75
	<b>IQR</b>	226,5	145,25	9,25
	<b>Q3</b>	300	300	300
	<b>max</b>	300	300	300

Distribucija podataka ispitana je Shapiro-Wilk testom. S obzirom na to da neke skupine nisu imale normalnu distribuciju te da je broj replikanata unutar nekih skupina malen, analiza je nastavljena s neparametrijskim testom, u ovom slučaju Kruskal-Wallis testom, kako bi se utvrdilo postoji li značajna razlika među skupinama. U tablici 2. na temelju dobivenih p vrijednosti vidimo da ne postoji značajna razlika te da post hoc test nije bio potreban.

**Tablica 2.** Prikaz p vrijednosti dobivenih Kruskal-Wallis testom.

<b>Test</b>	<b>Kruskall-Wallis</b>		
<b>mjerenje</b>	1.	2.	3.
<b>p</b>	0,5001	0,3805	0,7727

Usporedbom skupina po tretmanu i starosti te značajnosti interakcija među navedenim varijablama, podaci su analizirani Two-way ANOVA testom. S obzirom na to da su sve dobivene p vrijednosti veće od 0,05, utjecaj tretmana i starosti na skupinu nije značajan.



**Slika 1.** Grafički prikaz usporedbe rezultata rotaroda.

## 5.2. Rezultati testa otiska stopala

Ispitana je motorička sposobnost *B4Galnt1* KO miševa, miševa hranjenih kuprizonom i miševa divljeg tipa (starosti 3 i 6 mjeseci) trima mjerenjima u razmaku od nekoliko dana.

**Tablica 3.** Prikaz deskriptivne statistike rezultat prvog mjerenja desnih šapa.

<i>šape - 1R</i>	KO (3mj)	KO (6mj)	WT (3mj)	WT (6mj)	WT-CUP (3mj)	WT-CUP (6mj)
<b>N</b>	3	3	6	6	6	6
<b>min</b>	8,672	9,5063	7,285	7,947	7,18	9,288
<b>Q1</b>	8,672	9,5569	8,142	8,381	7,856	9,593
<b>median</b>	8,912	10,1641	8,699	9,744	8,475	9,796
<b>Q3</b>	9,425	10,895	9,021	10,96	9,496	10,11
<b>max</b>	9,425	10,53	9,102	11,61	9,59	10,17
<b>IQR</b>	0,753	1,3381	0,879	2,579	1,64	0,517

**Tablica 4.** Prikaz deskriptivne statistike rezultata prvog mjerenja lijevih šapa.

<i>šape - 1L</i>	KO (3mj)	KO (6mj)	WT (3mj)	WT (6mj)	WT-CUP (3mj)	WT-CUP (6mj)
<b>N</b>	3	3	6	6	6	6
<b>min</b>	9,472	10,31	7,8	9,556	9,275	8,469
<b>Q1</b>	9,472	10,31	8,465	9,819	9,547	9,718
<b>median</b>	11,73	10,45	9,581	10,01	9,988	10,98
<b>Q3</b>	12,94	10,53	10,11	10,6	10,8	11,32
<b>max</b>	12,94	10,53	10,65	11,23	11,08	11,67
<b>IQR</b>	3,468	0,22	1,645	0,781	1,253	1,602

**Tablica 5.** Prikaz deskriptivne statistike rezultata drugog mjerenja desnih šapa.

<i>šape - 2R</i>	KO (3mj)	KO (6mj)	WT (3mj)	WT (6mj)	WT-CUP (3mj)	WT-CUP (6mj)
<b>N</b>	3	3	6	6	6	6
<b>min</b>	9,026	8,171	8,248	7,962	9,193	10,01
<b>Q1</b>	9,026	8,171	8,494	8,318	9,435	10,24
<b>median</b>	10,82	8,299	8,979	8,969	10,08	10,89
<b>Q3</b>	11,22	8,325	9,441	10,19	10,6	11,34
<b>max</b>	11,22	8,325	10,28	11,09	11,13	12,08
<b>IQR</b>	2,194	0,154	0,947	1,872	1,165	1,1

**Tablica 6.** Prikaz deskriptivne statistike rezultata drugog mjerenja lijevih šapa.

<i>šape - 2L</i>	KO (3mj)	KO (6mj)	WT (3mj)	WT (6mj)	WT-CUP (3mj)	WT-CUP (6mj)
<b>N</b>	3	3	6	6	6	6
<b>min</b>	8,817	11,6	7,243	8,643	7,076	9,481
<b>Q1</b>	8,817	11,6	7,612	9,094	7,408	9,687
<b>median</b>	8,987	12,07	8,962	9,997	8,368	10,3
<b>Q3</b>	9,078	12,35	9,703	10,84	9,126	10,5
<b>max</b>	9,078	12,35	9,875	11,22	9,85	10,85
<b>IQR</b>	0,261	0,75	2,091	1,746	1,718	0,813



**Tablica 7.** Prikaz deskriptivne statistike rezultata trećeg mjerenja desnih šapa.

<i>šape - 3R</i>	<b>KO (3mj)</b>	<b>KO (6mj)</b>	<b>WT (3mj)</b>	<b>WT (6mj)</b>	<b>WT-CUP (3mj)</b>	<b>WT-CUP (6mj)</b>
<b>N</b>	3	3	6	6	6	6
<b>min</b>	9,651	10,6	8,025	9,118	9,081	8,305
<b>Q1</b>	9,651	10,6	8,319	9,447	9,658	9,677
<b>median</b>	11,95	10,61	9,203	10,07	10,75	11,06
<b>Q3</b>	12,48	10,87	9,686	10,74	11,16	11,57
<b>max</b>	12,48	10,87	10,16	11,86	11,21	12,34
<b>IQR</b>	2,829	0,27	1,367	1,293	1,502	1,893

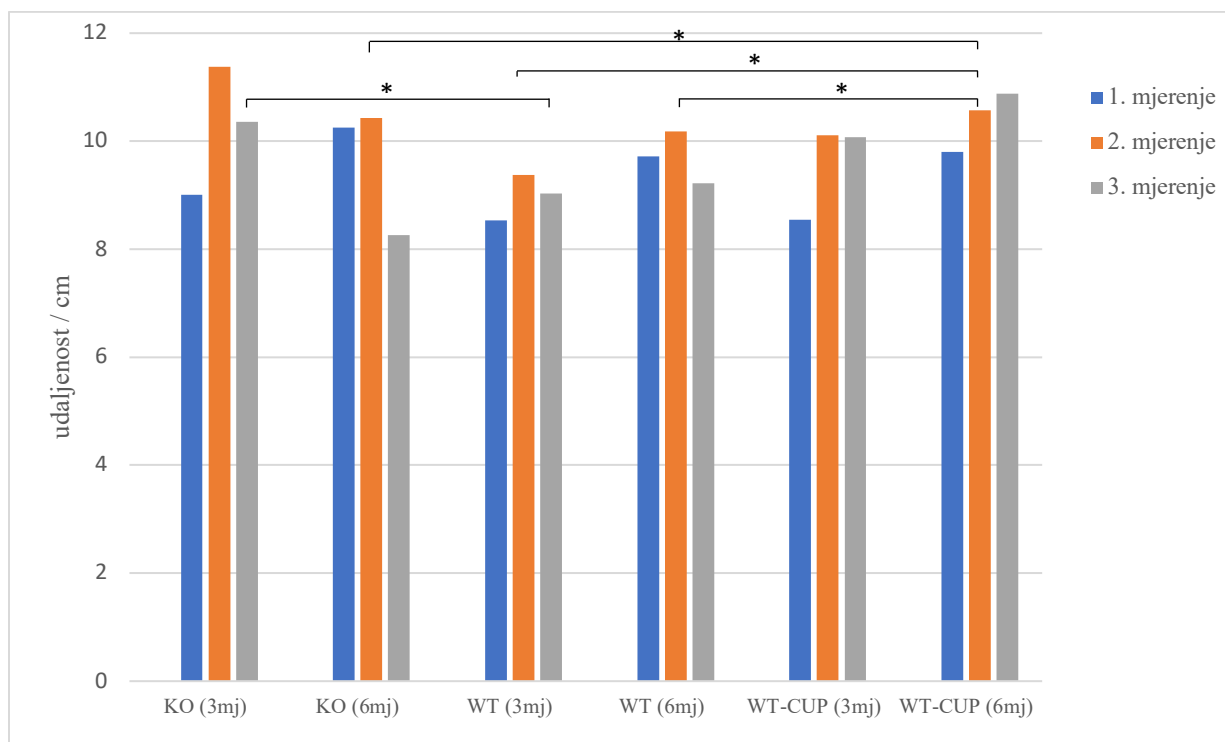
**Tablica 8.** Grafički prikaz deskriptivne statistike rezultata trećeg mjerenja lijevih šapa.

<i>šape - 3L</i>	<b>KO (3mj)</b>	<b>KO (6mj)</b>	<b>WT (3mj)</b>	<b>WT (6mj)</b>	<b>WT-CUP (3mj)</b>	<b>WT-CUP (6mj)</b>
<b>N</b>	3	3	6	6	6	6
<b>min</b>	9,066	7,819	8,511	8,04	8,936	9,954
<b>Q1</b>	9,066	7,819	8,587	8,111	9,415	9,981
<b>median</b>	9,633	7,853	8,868	8,735	10,12	10,85
<b>Q3</b>	10,83	8,156	10,65	9,596	10,37	11,19
<b>max</b>	10,83	8,156	10,9	10,07	10,41	11,2
<b>IQR</b>	1,764	0,337	2,063	1,485	0,955	1,209

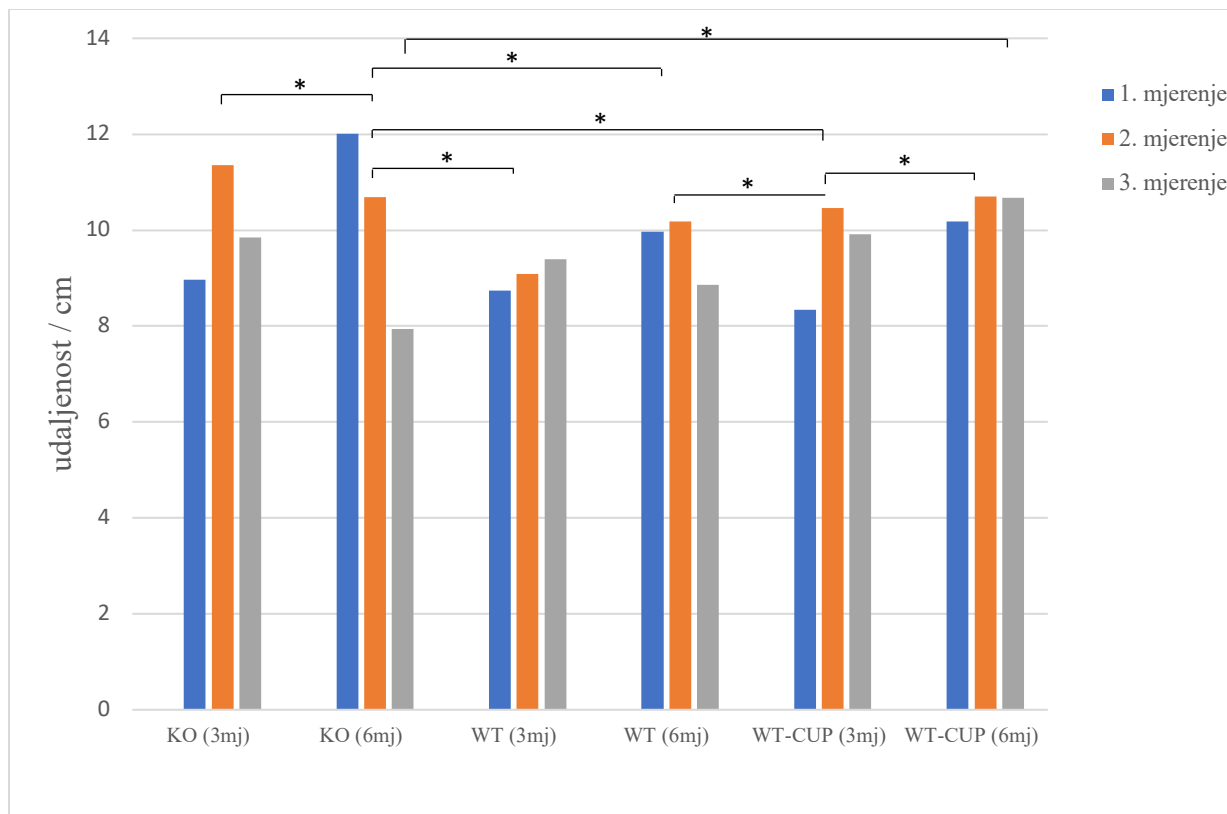
**Tablica 9.** Grafički prikaz deskriptivne statistike rezultata trećeg mjerenja lijevih šapa.

<i>šape - 3L</i>	<b>KO (3mj)</b>	<b>KO (6mj)</b>	<b>WT (3mj)</b>	<b>WT (6mj)</b>	<b>WT-CUP (3mj)</b>	<b>WT-CUP (6mj)</b>
<b>N</b>	3	3	6	6	6	6
<b>min</b>	9,066	7,819	8,511	8,04	8,936	9,954
<b>Q1</b>	9,066	7,819	8,587	8,111	9,415	9,981
<b>median</b>	9,633	7,853	8,868	8,735	10,12	10,85
<b>Q3</b>	10,83	8,156	10,65	9,596	10,37	11,19
<b>max</b>	10,83	8,156	10,9	10,07	10,41	11,2
<b>IQR</b>	1,764	0,337	2,063	1,485	0,955	1,209

Distribucija podataka dobivenih testom otiska stopala ispitana je Shapiro-Wilk testom. Podaci koji su slijedili normalnu distribuciju podvrgnuti su testu One-way ANOVA s post hoc Tukey's multiple comparison test dok su podaci, čija je p vrijednost bila niža od zadane, ispitani Kruskal-Walis testom s post hoc Dunn's multiple comparison testom kako bi se utvrdilo koje se skupine međusobno značajno razlikuju. Rezultati su grafički prikazani na slikama 2 i 3.



**Slika 2.** Grafički prikaz prosječne udaljenosti između desnih šapa. Zvezdicom je naznačena statistički značajna razlika među skupinama ukoliko je ima. (One-way ANOVA test, post hoc Tukey's multiple comparison test)



**Slika 3.** Grafički prikaz prosječne udaljenosti između lijevih šapa. Zvezdicom je naznačena statistički značajna razlika među skupinama ukoliko je ima. (One-way ANOVA test, post hoc Tukey's multiple comparison test)

## 6. RASPRAVA

Demijelinizacijske bolesti i dalje predstavljaju veliki problem u modernom svijetu. Usprkos brojnim istraživanjima, neki mehanizmi neurodegenerativnih bolesti i dalje su nepoznati. Kako bismo bolje razumjeli ove bolesti i dobili bolji uvid u njihovu patofiziologiju u svrhu pronalaska adekvatne terapije, ključni su mišji eksperimentalni modeli. Njihova važnost leži u činjenici da pokazuju veliku sličnost s patološkim stanjem kod pacijenata s neurodegenerativnim bolestima što pruža uvid u mehanizme ovih stanja kod ljudi te pomažu u razvoju potencijalnih terapijskih pristupa.

U ovom radu uključena su dva mišja modela: *B4Galnt1* genetički modificirani miševi i miševi tretirani kuprizonom. Njihova motorička sposobnost ispitana je rotarod testom i testom otiska stopala. Cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj demijelinizacije različitog uzroka, utišavanjem *B4Galnt1* gena odgovornog za sintezu složenih gangliozida i kuprizonom koji kao kelator bakra dovodi do propadanja oligodendrocita i ometa sintezu mijelina, na motoričku sposobnost i koordinaciju te ih međusobno usporediti. U istraživanje je bilo uključeno 30 miševa: šest WT miševa starosti 6 mjeseci, šest WT miševa starosti 3 mjeseca, šest WT miševa hranjenih kuprizonom starosti 6 mjeseci, šest WT miševa hranjenih kuprizonom starosti 3 mjeseca, te dvije skupine po tri KO miša (*B4Galnt1* KO) starosti 3 i 6 mjeseci. Genetički modificirane *B4Galnt1* KO miševе teško je uzgojiti (19). Legla su im mala, svega 2 ili 3 miša, a ženka nakon okota često ugiba zbog čega je samo 6 *B4Galnt1* KO miševa sudjelovalo u istraživanju.

Statističkom obradom podataka dobivenih rotarod testom utvrđeno je da među skupinama nema statistički značajne razlike što nije bilo očekivano. Ograničavajući faktor ovog istraživanja je mali uzorak koji može značajno utjecati na rezultate. Mali uzorci imaju nižu statističku snagu što smanjuje vjerojatnost otkrivanja stvarne razlike među skupinama. Prilikom ispitivanja motoričke funkcije testovima poput rotaroda, snage stiska i balansirajuće grede, treba uzeti u obzir suradljivost miševa i njihovu sposobnost snalaženja tijekom testa. Neki su miševi imali poteškoća pri izvedbi rotarod testa. Jedan od KO miševa bio je vrlo nespretno što se potvrdilo kraćim vremenom provedenim na rotarodu. Drugi je miš, tretiran kuprizonom, na prvom mjerenju bio vrlo hiperaktivan što je utjecalo na njegovu izvedbu, dok je na trećem mjerenju pokazivao dobru koordinaciju usprkos okretanju na rotarodu.

Statističkom obradom podataka dobivenih testom otiska stopala utvrđena je značajna razlika među skupinama tijekom drugog i trećeg mjerenja. Bilo je za očekivati da će najznačajnija

razlika biti između genetički modificiranih miševa starosti 6 mjeseci i miševa divljeg tipa starosti 3 mjeseca, što je potvrđeno drugim mjerenjem. Iznenadjujući rezultati odnose se na miševa hranjene kuprizonom starosti 6 mjeseci koji su pokazali bolju motoričku sposobnost u usporedbi s miševima starosti 3 mjeseca. Na temelju rezultata moglo bi se zaključiti da postoji mogućnost pozitivnog učinka kuprizona s godinama, što nije u skladu s poznatim utjecajem kuprizona na demijelinizaciju pogotovo kod miševa starosti 6 mjeseci (20). Provedeno je istraživanje gdje su miševi C57BL6 stari 6 mjeseci hranjeni različitim koncentracijama kuprizona (0,2 - 0,6 %) tijekom 5 - 6,5 tjedana. 0,4 % kuprizon tijekom 6,5 tjedana rezultirao je najboljim i najpouzdanijim režimom s gotovo potpunom demijelinizacijom *corpus callosum* popraćeno snažnom akumulacijom mikroglije i gotovo potpunim gubitkom zrelih oligodendrocita (9). Nadalje, usporedba rezultata između genetički modificiranih i kuprizonom hranjenih miševa pokazala je da kongenitalna demijelinizacija ima znatniji učinak na smanjenje motoričke sposobnosti u odnosu na kemijski inducirano što dodatno potvrđuje pojava remijelinizacije nakon što se životinjama prestane davati kuprizon što kod genetički modificiranih životinja nije slučaj.

Ovim je radom potvrđena važnost gangliozida u sintezi mijelina i direktan utjecaj na motoričku sposobnost kako kod životinjskih eksperimentalnih modela, tako kod ljudi. Provedeno je istraživanje koje je pokazalo sustavni nedostatak gangliozida GM1 u tkivima zaraženim Parkinsonovom bolesti što je prisutno i kod *B4Galnt1* KO miša (21). Ta je studija istražila terapijski pristup zamjenom GM1 prvo na animalnim modelima Parkinsonove bolesti zatim je otvoreno petogodišnje kliničko istraživanje u kojem je GM1, podrijetlom iz goveđeg mozga, primijenjen 2 puta dnevno, a rezultiralo je smanjenjem invalidnosti nakon 5 godina (21). Iako su rezultati bili obećavajući, daljnje se istraživanje prekinulo zbog nedovoljnih financijskih sredstava. Još je jedna studija potvrdila poboljšanje motoričkih sposobnosti nakon 4-tjednog tretmana *B4Galnt1* KO miševa gangliozidom GM1 kojima se motorička sposobnost, nakon primjenjene terapije, vrlo brzo vratila te su svojim sposobnostima mogli parirati miševima divljeg tipa (22). Važna uloga gangliozida također je prepoznata i u tumorogenezi. Istraživanje je pokazalo da specifični gangliozidi, uključujući GD2 i GM2, potiču angiogenezu i rast tumora te da je ekspresija gena *B4Galnt1* značajno povezana sa šest tipova infiltriranih imunih stanica u različitim vrstama karcinoma (16). Te stanice uključuju B stanice, CD8+ T stanice, CD4+ T stanice, makrofage, neutrofile i dendritičke stanice (16). Ovi nalazi uvelike proširuju područje istraživanja i proučavanja uloge gangliozida i gena *B4Galnt1*.

Mnoga su istraživanja danas usmjerena pronalasku potencijalne terapije za neurodegenerativna oboljenja jer usprkos svim dosadašnjim saznanjima, lijeka nema. Prvi je korak pronalazak odgovarajućeg životinjskog modela i testa kojim će biti ispitani. Puno je ključnih faktora koji se uzimaju u obzir uključujući procjenu je li ponašanje životinje slično ljudskom te predviđaju li učinci tretmana na životinjama njihove učinke na ljudima (6). Sve je to dovelo do visoke razine podudarnosti između životinjskih modela i bolesnika što postavlja temelj za daljnja istraživanja potencijalnih terapijskih pristupa za liječenje demijelinizacijskih bolesti.

## 7. ZAKLJUČAK

- Temeljem statističke obrade podataka dobivenih rotarod testom može se zaključiti da među skupinama nema statistički značajne razlike.
- Statističkom obradom podataka dobivenih testom otiska stopala možemo zaključiti da genetski modificirani miševi imaju značajno smanjenu motoričku sposobnost u usporedbi s WT miševima, posebno u starijoj dobi (6 mjeseci). Genetički modificirani miševi starosti 6 mjeseci također pokazuju značajno smanjenu motoričku sposobnost u usporedbi s miševima starosti 3 mjeseca. Također je uočena statistički značajna razlika između miševa divljeg tipa i miševa hranjenih kuprizonom gdje miševi tretirani kuprizonom pokazuju značajno smanjenu motoričku sposobnost u odnosu na miševe divljeg tipa.
- Kongenitalna, u odnosu na kemijski induciranu demijelinizaciju, uzrokuje znatnije smanjenje motoričke sposobnosti i koordinacije s naglaskom na stariju dob miša.



## 8. SAŽETAK

**Uvod:** Mijelin je ključna tvar za pravilnu funkciju živčanog sustava. Obavija živčana vlakna i omogućuje brzo provođenje akcijskog potencijala. Oligodendrociti stvaraju mijelin u CNS-u te mogu mijelinizirati više aksona dok Schwannove stanice to čine u PNS-u mijelinizirajući jedan akson što omogućuje regeneraciju živaca u PNS-u.

Demijelinizacija je proces gubitka mijelina. Najčešće se javlja kao posljedica neurodegenerativne bolesti poput multiple skleroze. S obzirom na to da postoje eksperimentalni mišji modeli koji oponašaju patološko stanje u ljudi, na njima se provode motorički testovi za ispitivanje motoričke sposobnosti miša i za procjenu oporavku nakon primijenjene terapije što pruža uvid u potencijalne terapijske pristupe kod ljudi. *B4Galnt1* KO i kuprizonski modeli jedni su od češće korištenih zbog sličnosti s neurodegenerativnim bolestima.

**Ciljevi:** Ispitati motoričku sposobnost i koordinaciju genetički modificiranih *B4Galnt1* miševa i miševa hranjenih kuprizonom te ih usporediti s miševima divljeg tipa

**Materijali i metode:** Istraživanje je provedeno na tri tipa miša: KO, WT i WT-CUP starosti 3 i 6 mjeseci. Motorička je sposobnost ispitana pomoću rotarod testa i testa otiska stopala.

**Rezultati:** Obradom podataka prikupljenih rotarod testom nije utvrđena značajna razlika u motoričkoj sposobnosti među skupinama. Obradom podataka testa otiska stopala, u drugom je mjerenju utvrđena smanjena motorička sposobnost genetički modificiranih i kuprizonom tretiranih miševa u usporedbi s miševim divljeg tipa.

**Zaključak:** Kongenitalna, u odnosu na kemijski induciranu demijelinizaciju, uzrokuje znatnije smanjenje motoričke sposobnosti i koordinacije. Oba modela pokazuju smanjenje motoričke sposobnosti u usporedbi s miševima divljeg tipa.

**Ključne riječi:** *B4Galnt1*; demijelinizacija; kuprizon; motorička sposobnost; rotarod; test otiska stopala

## 9. SUMMARY

### **Evaluation of motor abilities in chemically induced and congenital demyelination of mice**

**Introduction:** Myelin is a crucial substance for the proper functioning of the nervous system. It envelops nerve fibers and enables the rapid conduction of action potentials. Oligodendrocytes produce myelin in the CNS and can myelinate multiple axons, while Schwann cells perform this function in the PNS by myelinating a single axon, allowing for nerve regeneration in the PNS. Demyelination is the process of myelin loss. It most commonly occurs as a result of neurodegenerative diseases such as multiple sclerosis. Experimental mouse models that mimic human pathological conditions are used to conduct motor tests to assess the motor abilities of mice and evaluate their recovery after applied therapies, providing insights into potential therapeutic approaches for humans. B4Galnt1 KO and cuprizone models are among the more frequently used due to their similarity to neurodegenerative diseases.

**Objectives:** To examine the motor ability and coordination of genetically modified B4Galnt1 mice and cuprizone-fed mice and compare them with wild-type mice.

**Materials and methods:** The study was conducted on three types of mice: KO, WT, and WT-CUP, aged 3 and 6 months. Motor ability was assessed using the rotarod test and the footprint test.

**Results:** The analysis of the rotarod test data did not reveal a significant difference in motor ability among the groups. In contrast, the analysis of the footprint test data in the second measurement showed reduced motor ability in genetically modified and cuprizone-treated mice compared to wild-type mice.

**Conclusion:** Congenital demyelination, compared to chemically induced demyelination, causes a more significant reduction in motor ability and coordination. Both models exhibit reduced motor ability compared to the wild-type.

**Keywords:** B4Galnt1; cuprizone; demyelination; footprint test; motor ability; rotarod;

**10. LITERATURA**

1. Poitelon Y, Kopec AM, Belin S. Myelin Fat Facts: An Overview of Lipids and Fatty Acid Metabolism. *Cells*. 2020 Apr 1;9(4):812.  
Dostupno na: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/4/812>  
Datum pristupa: 20. 6. 2024.
2. Zirngibl M, Assinck P, Sizov A, Caprariello AV, Plemel JR. Oligodendrocyte death and myelin loss in the cuprizone model: an updated overview of the intrinsic and extrinsic causes of cuprizone demyelination. *Molecular Neurodegeneration*. 2022 May 7;17(1).
3. Simons M, Krämer EM, Thiele C, Stoffel W, Trotter J. Assembly of Myelin by Association of Proteolipid Protein with Cholesterol- and Galactosylceramide-Rich Membrane Domains. *The Journal of Cell Biology* 151(1):143–54. 2000 Oct 2;151(1):143–54.  
Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2189802/>  
Datum pristupa: 27. 6. 2024.
4. Simons M, Nave KA. Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2019;8(1):a020479
5. Jessen KR, Mirsky R. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *The Journal of Physiology*. 2016 Mar 21;594(13):3521–31.
6. Love S. Demyelinating diseases. *Journal of Clinical Pathology* 2006 May 5;59(11):1151–9. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1860500/>. Datum pristupa: 21. 6. 2024.
7. Bradl M, Lington C. Animal Models of Demyelination. *Brain Pathology*. 1996 Jul;6(3):303–11.
8. Marzan DE, Brügger-Verdon V, West BL, Liddel S, Samanta J, Salzer JL. Activated microglia drive demyelination via CSF1R signaling. *Glia*. 2021 Feb 23.
9. Gingele S, Henkel F, Heckers S, Moellenkamp TM, Hümmert MW, Skripuletz T, et al. Delayed Demyelination and Impaired Remyelination in Aged Mice in the Cuprizone Model. *Cells*. 2020 Apr 11;9(4):945.
10. Brooks SP, Dunnett SB. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nature Reviews Neuroscience*. 2009 Jun 10;10(7):519–29.

11. Shiotsuki H. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *Journal of Neuroscience Methods* 2010 Jun 15;189(2):180–5.  
Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165027010001603>  
Datum pristupa: 24. 6. 2024.
12. Lubrich C, Giesler P, Kipp M. Motor Behavioral Deficits in the Cuprizone Model: Validity of the Rotarod Test Paradigm. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022 Sep 26;23(19):11342.
13. Deacon RMJ. Measuring Motor Coordination in Mice. *Journal of Visualized Experiments*. 2013 May 29;(75).
14. Grip Strength Protocol - IMPReSS | International Mouse Phenotyping Resource of Standardised Screens. Dostupno na:  
<https://www.mousephenotype.org/impress/ProcedureInfo?action=list&procID=11>  
30. Datum pristupa: 28. 6. 2024.
15. Cheng S, Heintz N. Massive Loss of Mid- and Hindbrain Neurons during Embryonic Development of Homozygous Lurcher Mice. 1997 Apr 1;17(7):2400–7.
16. Yi H, Lin Y, Li Y, Guo Y, Yuan L, Mao Y. Pan-Cancer Analysis of B4GALNT1 as a Potential Prognostic and Immunological Biomarker. Zhan C, editor. *Journal of Immunology Research*. 2022 Jul 28;2022:1–28.
17. Branko Dobrović, Goran Ćurić, Zdravko Petanjek, Heffer M. Dendritic morphology and spine density is not altered in motor cortex and dentate granular cells in mice lacking the ganglioside biosynthetic gene B4galnt1 - A quantitative Golgi cox study. *PubMed*. 2011 Jan 1;35 Suppl 1:25–30.
18. Yu RK, Tsai YT, Ariga T, Yanagisawa M. Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides--an overview. *Journal of oleo science*. 2011;60(10):537–44. Dostupno na :  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3684167/>. Datum pristupa: 28. 6 .2024.
19. National Human Genome Research Institute. Knockout Mice Fact Sheet. *Genome.gov*. 2015. Dostupno na: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Knockout-Mice-Fact-Sheet>. Datum pristupa: 28.6.2024.

20. Gudi V, Gingele S, Skripuletz T, Stangel M. Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2014 Mar 13;8.
21. Chowdhury S, Ledeen R. The Key Role of GM1 Ganglioside in Parkinson's Disease. *Biomolecules*. 2022 Jan 21;12(2):173.
22. Chiricozzi E, Mauri L, Lunghi G, Di Biase E, Fazzari M, Maggioni M, et al. Parkinson's disease recovery by GM1 oligosaccharide treatment in the B4galnt1<sup>+/-</sup> mouse model. *Scientific Reports*. 2019 Dec;9(1).

## 11. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:** Tia Plenča

**Datum i mjesto rođenja:** 17. 5. 2001., Zagreb

**E-mail:** [tiaplenca@gmail.com](mailto:tiaplenca@gmail.com)

**Obrazovanje:**

- 2021. – 2024. – Sveučilište u Osijeku, Medicinski fakultet, Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika
- 2016. – 2020. – Klasična gimnazija Zagreb

**Izvanastavna aktivnost:** Sudjelovanje na radionici „Pametni laboratorij“ na festivalu znanosti (22.-26. travnja 2024.)