

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku,

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij "Molekularne bioznanosti"

Robert Rončević

UTJECAJ KUPRIZONA NA LIPIDNI PROFIL I FUNKCIONALNE
PROMJENE U MOZGU MIŠEVA RAZLIČITE DOBI

Doktorski rad

Osijek, 2025.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij

"Molekularne bioznanosti"

Robert Rončević

UTJECAJ KUPRIZONA NA LIPIDNI PROFIL I FUNKCIONALNE
PROMJENE U MOZGU MIŠEVA RAZLIČITE DOBI

*Doktorski rad predložen je Sveučilišnom vijeću za poslijediplomske
studije u svrhu stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti na*

Poslijediplomskom interdisciplinarnom sveučilišnom studiju

Molekularne bioznanosti – modul biomedicina

Osijek, 2025.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Doktorski rad

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti

Znanstvena polja: Kemija i temeljne medicinske znanosti

Utjecaj kuprizona na lipidni profil i funkcionalne promjene u mozgu miševa različite dobi

Robert Rončević

Doktorski rad je izrađen u: Laboratoriju za neurobiologiju Medicinskog fakulteta Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera Osijek

Mentor: doc. dr. sc. Barbara Viljetić

Kratki sažetak doktorskog rada: Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj životne dobi na funkcionalne, histološke i molekularne promjene u mozgu nakon izazivanja demijelinizacije primjenom kuprizona. Pritom je analizirana povezanost motoričkih poremećaja s promjenama u mijelinu, gangliozidima i lipidnom profilu pojedinih moždanih regija.

Broj stranica: 119

Broj slika: 66

Broj tablica: 2

Broj literaturnih navoda: 140

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: mijelinska ovojnica, kuprizonski model, demijelinizacija, MALDI-TOF IMS, gangliozidi, mijelinski proteini, starosna dob

Datum javne obrane:

Povjerenstvo za javnu obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Senka Blažetić (predsjednik Povjerenstva)
2. prof. dr. sc. Martina Smolić (član Povjerenstva)
3. izv. prof. dr. sc. Silva Katušić (član Povjerenstva)
4. doc.dr.sc. Anamaria Brozović – zamjenski član

Doktorski rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruder Bošković Institute
Doctoral Study of Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Biomedicine

Scientific Fields: basic medical sciences and chemistry

The effects of cuprizone on the lipid profile and functional changes in the brain of mice of different ages

Robert Rončević

Thesis performed at: Laboratory for Neurobiology at Faculty of Medicine Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Supervisor/s: Assoc. Prof. Barbara Viljetić, PhD

Short abstract: The aim of this study was to investigate the effect of age on functional, histological, and molecular changes in the brain following cuprizone-induced demyelination. The relationship between motor impairments and alterations in myelin, gangliosides, and the lipid profile of specific brain regions was analyzed.

Number of pages: 119

Number of figures: 66

Number of tables: 2

Number of references: 140

Original in: Croatian

Key words: myelin sheath, cuprizone model, demyelination, MALDI-TOF IMS, gangliosides, myelin proteins, age

Date of the thesis defense:

Reviewers:

1. Associate Prof. Senka Blažetić, PhD
2. Prof. Martina Smolić, PhD
3. Associate Prof. Silva Katušić, PhD
4. Assistant Prof. Anamaria Brozović, PhD - substitute

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

ZAHVALE

Ocjena rada
u tisku

SADRŽAJ

1. UVOD.....	10
1.1. Struktura i funkcija mijelinske ovojnice.....	10
1.2. Gangliozi u mijelinu: više od strukturnih lipida.....	12
1.3. Eksperimentalni modeli demijelinizacije.....	15
1.4. Kuprizonski model demijelinizacije.....	17
1.5. Utjecaj starenja na demijelinizaciju.....	20
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	23
3. METODE I MATERIJALI.....	24
3.1. MATERIJALI.....	24
3.1.1. Pokusne životinje.....	24
3.1.2. Kemikalije i protutijela.....	25
3.2. METODE.....	27
3.2.1. Bihevioralni testovi.....	28
3.2.2.1. Test otiska stopala.....	28
3.2.2.2. Rotarod test.....	29
3.2.2.3. Test spontane motoričke aktivnosti.....	29
3.2.3. Žrtvovanje miševa, fiksiranje i kriptotekcija uzoraka.....	30
3.2.3. Histološko bojanje.....	30
3.2.3.1. Priprema želatiniziranih predmetnih stakalaca.....	30
3.2.3.2. Histološko bojanje metodom Luxol Fast Blue.....	31
3.2.3.3. Imunohistokemijska analiza.....	32
3.2.5. Analiza histoloških i imunohistokemijskih bojanja.....	33
3.2.6. Slikovna spektrometrija masa.....	34
3.2.7. Statističke metode.....	35
3.2.7.1. Statistička obrada bihevioralnih podataka.....	35
3.2.7.2. Statistička obrada histoloških i imunohistokemijskih podataka.....	35
3.2.7.3. Statistička obrada podataka iz IMS metode.....	36
4. REZULTATI.....	37
4.1. Bihevioralni testovi.....	37
4.1.1. Analiza otiska šapica.....	37
4.1.2. Rotarod test.....	40

4.1.3. Test motoričke aktivnosti (activity cage)	41
4.2. Histološka analiza (LFB)	45
4.3. Rezultati imunohistokemijske analize	50
4.3.1. Markeri mijelina (MAG i MBP)	50
4.3.1.1. Izražaj mijelinskih proteina u cc.....	52
4.3.1.2. Izražaj mijelinskih proteina u aca.....	54
4.3.1.3. Izražaj mijelinskih proteina u Cpu.....	56
4.3.1.4. Izražaj mijelinskih proteina u M.....	58
4.3.2. Gangliozidi.....	60
4.3.2.1. Izražaj gangliozida u cc.....	61
4.3.2.2. Izražaj gangliozida u aca.....	64
4.3.2.3. Izražaj gangliozida u CPu.....	66
4.3.2.4. Izražaj gangliozida u M.....	68
4.3.3. Neuroplastin.....	70
4.4. IMS analiza	71
4.4.1. IMS analiza cc.....	72
4.4.2. IMS analiza aca.....	76
4.4.3. IMS analiza CPu.....	80
4.4.4. IMS analiza M.....	84
4.4.5. Analiza statistički značajnih m/z signala	88
5. RASPRAVA.....	93
5.1. Bihavioralni testovi.....	94
5.2. Histološka i imunohistokemijska analiza mijelina.....	97
5.3. Imunohistokemijska analiza kompleksnih gangliozida.....	98
5.4. Rezultati MALDI-TOF IMS analize.....	102
6. ZAKLJUČAK.....	107
7. Reference.....	109
8. SAŽETAK.....	116
9. SUMMARY.....	117
10. Životopis.....	118
11. Dodatak.....	119

KRATICE:

aca – prednja komisura (lat. *anterior commissure*)

cc – *corpus callosum*

CNPase – 2',3'-ciklički nukleotid-3'-fosfodiesteraza (CNPase, 2',3'-*cyclic-nucleotide-phosphodiesterase*)

CPu – strijatum (lat. *caudate putamen*)

CPZ – skupina miševa hranjena kuprizonom

CTRL – kontrolna skupina miševa

EAE – model eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa (engl. *experimental autoimmune encephalomyelitis*)

IMS – slikovna spektrometrija masa (engl. *imaging mass spectrometry*)

IGF-1 – inzulinu sličan faktora rasta 1 (eng. *insulin-like growth factor 1*)

ITO – indij-kositar oksid (eng. *indium-tin oxide*)

LFB – Luxol Fast Blue

M – motorička kora (lat. *cortex motorius*)

MAG – glikoprotein pridružen mijelinu (engl. *myelin-associated glycoprotein*)

MALDI TOF – matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija spregnuta s masenim detektorom koji mjeri vrijeme preleta (engl. *matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight*)

MBP – mijelinski bazični protein (engl. *myelin basic protein*)

MHV – mišji hepatitis virus

MOG – mijelinski oligodendrocitni protein (engl. *myelin oligodendrocyte glycoprotein*)

Np – neuroplastin

OPC – oligodendrocitne progenitorske stanice (eng. *oligodendrocyte progenitor cells*)

PA – fosfatidna kiselina (eng. *phosphatide acid*)

PBS – fosfatom puferirana fiziološka otopina (eng. *phosphate buffered saline*)

PC – fosfatidilkolin (eng. *phosphatidylcholine*)

PCA – analiza glavnih komponenti (engl. *principal component analysis*)

PDGF – trombocitni faktora rasta (eng. *platelet-derived growth factor*)

PLP – proteolipidni protein (eng. *proteolipid protein*)

PE – fosfatidiletanolamin (eng. *phosphatidylethanolamine*)ž

PG – fosfatidilglicerol (eng. *phosphatidylglycerol*)

PLS-DA – analiza djelomičnih najmanjih kvadrata diskriminantne analize (engl. *partial least-squares discriminant analysis*)

PMCA – Ca^{2+} -ATPaze stanične membrane (eng. *plasma membrane Ca^{2+} -ATPase*)

PS – fosfatidilserini (eng. *phosphatidylserine*)

PŽŠ – periferni živčani sustav

ROI – regije interesa (engl. *region of interest*)

ROS – reaktivne kisikove vrste (eng. *reactive oxygen species*)

TIC – ukupni intenzitet signala m/z kvocijenata (eng. *total ion count*)

TMEV – Theilerov murin encefalomijelitis virus

TBS – trisom puferirana fiziološka otopina (eng. *tris buffered saline*)

SOD – superoksid dismutaza (eng. *superoxide dismutase*)

SŽŠ – središnji živčani sustav

1. UVOD

1.1. Struktura i funkcija mijelinske ovojnice

Mijelinska ovojnica je specijalizirana višeslojna membrana koja obavija aksone živčanih stanica te ima ključnu ulogu u brzom i učinkovitom prijenosu živčanih impulsa između neurona (1). U središnjem živčanom sustavu (SŽS) mijelin sintetiziraju oligodendrociti i sudjeluju u održavanju njegove stabilnosti, dok u perifernom živčanom sustavu (PŽS) tu ulogu imaju Schwannove stanice. Ključna razlika između njih je kapacitet mijelinizacije: dok jedan oligodendrocit može istovremeno mijelinizirati više aksona (obično do nekoliko desetaka segmenata različitih aksona), Schwannova stanica mijelinizira samo jedan segment jednog aksona. Ova strukturna razlika odražava se i u funkcionalnim svojstvima, posebno u regeneracijskom potencijalu između PŽS i SŽS (2).

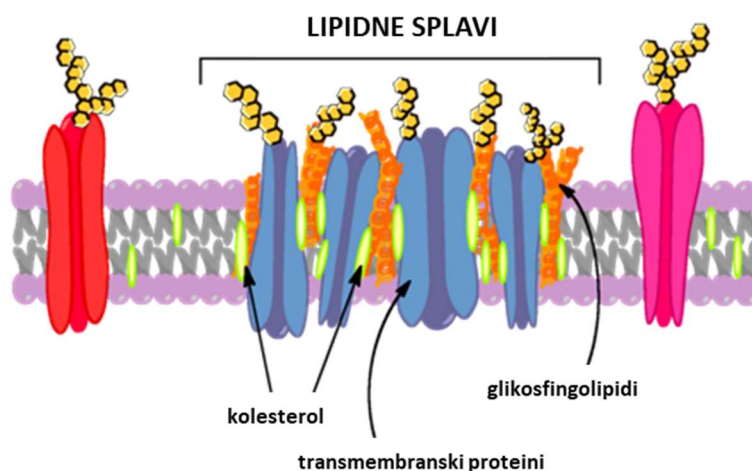
Proces mijelinizacije aksona odvija se segmentirano. Akson je u dugačkom segmentu omotan mijelinskom membranom s kratkim nemijeliniziranim područjima koja se u pravilnim razmacima pojavljuju duž aksona i poznata su kao Ranvierovi čvorovi (2). Mijelinska ovojnica djeluje kao električni izolator, čime sprječava raspršenje ionskog toka kroz membranu i omogućuje učinkovito provođenje akcijskog potencijala. Ranvierovi čvorovi omogućuju tzv. saltatornu (skokovitu) provodljivost, mehanizam kojim akcijski potencijal "preskače" s jednog čvora na drugi, čime se brzina prijenosa signala višestruko povećava u odnosu na nemijelinizirane aksonske puteve (3, 4). Ovi čvorovi imaju i važnu ulogu u organizaciji ionskih kanala i održavanju segmentacije membranskih domena, čime pridonose preciznoj koordinaciji živčanih signala.

Osim izolacije i ubrzanja prijenosa signala, mijelin ima i brojne druge funkcije: pruža strukturnu stabilnost aksonima i sudjeluje u regulaciji metabolizma neurona, homeostazi iona te štiti aksone od oksidativnog i mehaničkog oštećenja (1, 5). Funkcionalna i strukturna stabilnost mijelinske ovojnice ključna je za očuvanje funkcije neurona, a njezin gubitak dovodi do teških neuroloških poremećaja, među kojima su najpoznatiji multipla skleroza, leukodistrofije i neuropsihijatrijskih poremećaja poput šizofrenije.

Na molekularnoj razini, mijelinska ovojnica ima specifičan sastav: 70 – 80 % ukupne mase čine lipidi, a 20 – 30 % proteini. (5, 6) Lipidna komponenta, koju čine kolesterol, sfingolipidi i fosfolipidi, osigurava čvrstoću, izolacijska svojstva i pravilnu organizaciju membrane. (7) Proteinska komponenta mijelina uključuje niz strukturnih i signalnih proteina koji sudjeluju u

formiranju, stabilizaciji i održavanju mijelinske ovojnice. (8, 9, 10) Najzastupljeniji je proteolipidni protein (PLP, eng. *proteolipid protein*), ključan za stabilnost kompaktne mijelinske strukture u SŽS-u. 2',3'-ciklički nukleotid-3'-fosfodiesteraza (CNPase, 2',3'-*cyclic-nucleotide-phosphodiesterase*) lokalizirana je u nekompaktnim područjima i sudjeluje u održavanju metabolizma i integriteta mijelina, dok je mijelinski oligodendrocitni glikoprotein (MOG, engl. *myelin oligodendrocyte glycoprotein*) uključen u kasne faze mijelinizacije i ima važnu imunološku ulogu. Među brojnim mijelinskim proteinima posebno mjesto zauzimaju mijelinski bazični protein (MBP, eng. *myelin basic protein*), koji stabilizira unutarnje slojeve mijelina, i mijelinu pridruženi glikoprotein (MAG, *myelin-associated glycoprotein*), koji se nalazi na periaksonalnoj membrani te sudjeluje u uspostavljanju i održavanju veza između aksona i glija stanica.

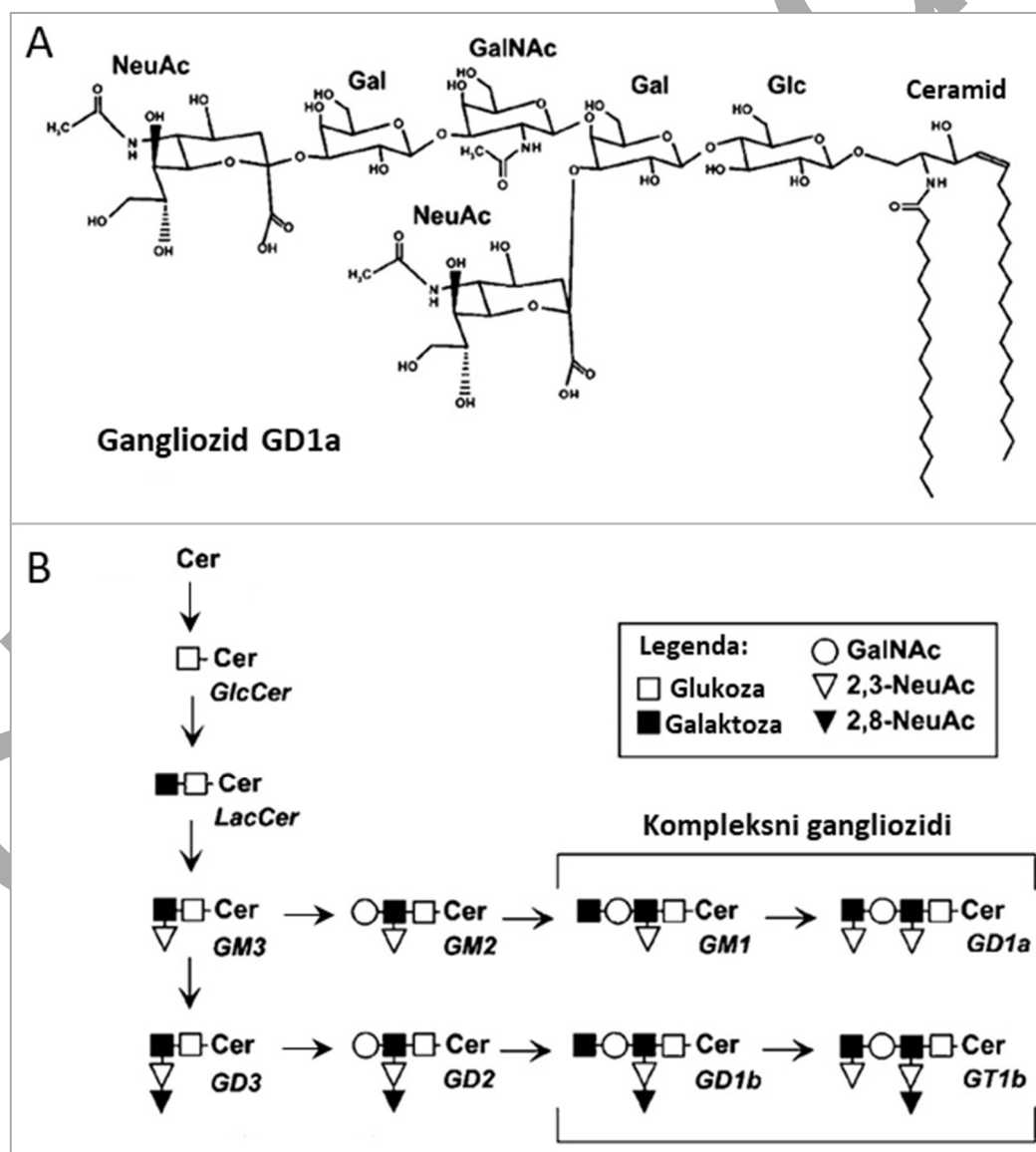
Lipidi i proteini u mijelinu nisu raspoređeni homogeno već su organizirani u mikrodomene koje su bogate kolesterolom i sfingolipidima, tzv. lipidne splavi (Slika 1.1). One služe kao platforme za signalizaciju i interakcije između membranskih komponenti. Stabilnost tih struktura od ključne je važnosti za pravilno pozicioniranje proteina poput MBP-a i MAG-a, kao i za očuvanje arhitekture Ranvierovih čvorova (11). Promjene u lipidnom sastavu, bilo zbog toksičnih, upalnih ili metaboličkih čimbenika, mogu poremetiti organizaciju lipidnih splavi i time destabilizirati cijelu mijelinsku strukturu. S obzirom na to da lipidne splavi u velikoj mjeri čine kolesterol, sfingolipidi i gangliozi, promjene u njihovom sastavu mogu imati izravan učinak na stabilnost mijelinskih proteina i arhitekturu Ranvierovih čvorova.



Slika 1.1. Shematski prikaz strukture lipidnih splavi. (izvor Wikimedia Commons, javna domena)

1.2. Gangliozi u mijelinu

Gangliozi su kompleksni glikosfingolipidi koji u svojoj strukturi sadrže jednu ili više sialinskih kiselina, zbog čega nose negativan naboj pri fiziološkom pH. Ovaj naboj, u kombinaciji s razgranatim glikanskim lancima, omogućuje selektivne interakcije s proteinima (npr. lektinima, i mijelinskim glikoproteinima poput MAG-a) i lipidima u lipidnim splavima (12, 13). Gangliozi se u velikim količinama nalaze u živčanom tkivu, osobito u plazmatskim membranama neurona i glija stanica gdje čine do 10 % ukupnih lipida membrane (14).



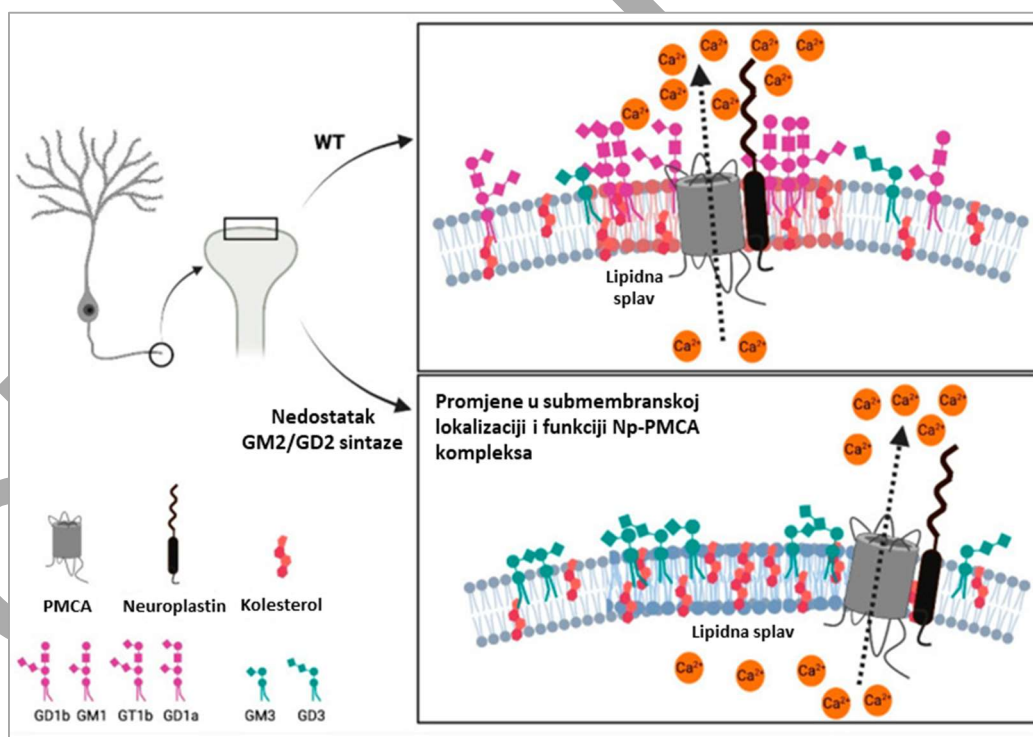
Slika 1.2. A) Struktura ganglioziida GD1a. B) Biosintetski put sinteze ganglioziida. Ganglioziidi se sintetiziraju postupnim dodavanjem šećera na ceramid specifičnim glikoziltransferazama. NeuAc – N-acetilneuraminska kiselina, Glc – glukoza, Gal – galaktoza, GalNAc – N-acetilgalaktozamin, Cer – ceramid, GlcCer – Galaktozilceramid, LacCer – Laktozilceramid. Preuzeto i prilagođeno prema (15).

Strukturno se sastoje od hidrofobnog ceramidnog dijela koji je uronjen u membranu, te polarne oligosaharidne glave koja je usmjerena prema ekstracelularnom prostoru i sudjeluje u međustaničnim interakcijama i signalizaciji (16). Njihova raspodjela nije ravnomjerna, dominantno se nalaze u lipidnim splavima gdje sudjeluju u prijenosu signala, staničnoj adheziji te procesima neuralnog oporavka i rasta (17). Prema broju sijalinskih kiselina gangliozidi se dijele u nekoliko serija, a u mijelinu središnjeg živčanog sustava najzastupljeniji su GM1, GD1a, GD1b i GT1b, koji pripadaju tzv. a- i b-seriji gangliozida (Slika 1.2) (16, 18). Ovi gangliozidi smješteni su gotovo isključivo u vanjskom sloju lipidnog dvosloja u lipidnim splavima koje u mijelinu imaju ključnu ulogu u prostornoj organizaciji molekula na akso-glijalnom spoju i paranodalnim regijama.

Gangliozidi istovremeno sudjeluju u stabilizaciji membranske organizacije i u međusobnim interakcijama mijelinskih stanica i aksona. Posebice je važna njihova uloga u povezivanju s MAG-om, koji prepoznaje specifične gangliozide poput GD1a i GT1b na površini aksona, čime se održava komunikacija između aksona i glijne koja je ključna za dugoročno očuvanje mijelinske ovojnice i funkcionalnost živčanih veza (19, 20). U genetički modificiranih miševa koji ne sintetiziraju GD1a i GT1b dolazi do gubitka stabilnosti paranodalnih regija i poremećaja u organizaciji nodalnih proteina što potvrđuje njihovu strukturnu važnost (21). Osim toga, gangliozidi doprinose pravilnoj funkciji i funkciju MBP-a koji se nalazi na unutarnjoj strani mijelinske membrane i odgovoran je za zbijanje susjednih slojeva mijelina. Budući da MBP djeluje unutar izrazito kompaktnog i lipidima bogatog okruženja, stabilnost lipidnih splavi i njihova pravilna organizacija pridonose njegovoj pravilnoj lokalizaciji i funkciji (22).

Osim uloge u organizaciji membranske strukture, gangliozidi također imaju važnu regulacijsku funkciju u brojnim biološkim signalnim mrežama: utječu na preživljavanje stanica, diferencijaciju glijne-stanica i sinaptičku plastičnost. Kroz sudjelovanje u formiranju lipidnih splavi, omogućuju smještaj i stabilnu lokalizaciju molekula poput neuroplastina, proteina uključenog u regulaciju homeostaze kalcija i stabilnost sinaptičkih spojeva. (23) Neuroplastin je transmembranski glikoprotein iz imunoglobulinske superobitelji adhezijskih molekula koji, osim svoje dobro poznate uloge u sinaptičkoj plastičnosti, sve je više dokaza da neuroplastin ima važnu, ali još uvijek nedovoljno razjašnjenu funkciju i u mijelinu. Nalazi se i u oligodendrocitima, gdje je smješten unutar lipidnih splavi što upućuje na njegovu ulogu u održavanju stabilnosti mijelinske membrane i akso-glijalnih interakcija (23, 24). Pretpostavlja

se da neuroplastin u mijelinu doprinosi regulaciji ionske homeostaze, podršci membranskoj arhitekturi i signalnim interakcijama s drugim membranskim proteinima, uključujući one koji se vežu za ganglioze (25). Budući da je prisutnost neuroplastina u mijelinu usko povezana s lipidnim okruženjem, promjene u sastavu ganglioze, osobito u uvjetima demijelinizacije, mogu dovesti do njegove dislokacije iz lipidnih domena i posljedične destabilizacije mijelinske strukture (Slika 1.3) (12). Promjene u sastavu ganglioze rezultiraju poremećajem distribucije ključnih proteina, čime se narušava cjelokupna funkcionalna organizacija mijelinske membrane (14, 26). Patološke promjene u sastavu ganglioze zabilježene su u brojnim neurološkim poremećajima, uključujući multiplu sklerozu, Alzheimerovu bolest, Parkinsonovu bolest, te nasljedne ganglioze (27).



Slika 1.3. Shematski prikaz posljedica promjena u sastavu ganglioze na submembranskoj razini na kompleks PMCA-neuroplastin i regulaciju kalcija. PMCA – Ca^{2+} -ATPaza stanične membrane, Np – neuroplastin, WT – divlji tip. Preuzeto i prilagođeno prema (23).

Sastav ganglioze u mijelinu nije stalan nego se mijenja tijekom razvoja i starenja. U ranom postnatalnom razvoju prevladavaju jednostavniji gangliozi (npr. GM3 i GD3), dok tijekom sazrijevanja i mijelinizacije raste udio kompleksnijih oblika poput GD1b i GT1b (28).

Tijekom starenja dolazi do promjena u relativnim omjerima gangliozida, često uz smanjenje udjela GD1b i GT1b, što može pridonijeti smanjenoj stabilnosti mijelina i povećanoj osjetljivosti na oštećenja. Promjene u sastavu gangliozida mogu imati dugoročne posljedice na stabilnost i funkcionalnost mijelinske ovojnice. Destabilizacija lipidnih splavi i poremećaj interakcija s mijelinskim proteinima, osobito s MAG-om, mogu rezultirati gubitkom organizacije paranodalnih regija i narušenom komunikacijom između aksona i glije (21, 29, 30). Takvi poremećaji pridonose razvoju demijelinizacijskih procesa i funkcionalnim posljedicama u živčanom sustavu.

1.3. Eksperimentalni modeli demijelinizacije

Razvoj pouzdanih eksperimentalnih modela demijelinizacije ključan je za dublje razumijevanje čimbenika koji narušavaju strukturu i stabilnost mijelinske ovojnice, moduliraju interakcije glije i neurona te oblikuju kapacitet SŽS-a za regeneraciju. Osim toga, takvi modeli omogućuju precizno testiranje novih terapijskih pristupa u kontroliranim uvjetima. Dosad su razvijeni različiti modeli koji reproduciraju specifične aspekte demijelinizacijskih bolesti, osobito multiple skleroze, no nijedan model ne obuhvaća sve elemente patofiziologije u cijelosti (31). Ovisno o mehanizmu nastanka demijelinizacije, eksperimentalni modeli mogu se podijeliti u četiri glavne skupine: autoimune, virusne, genetičke i toksinom inducirane modele (32).

Autoimuni modeli, među kojima je najpoznatiji model eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa (EAE), temelje se na induciranju imunološke reakcije protiv mijelinskih antigena. Induciraju se imunizacijom životinja ubrizgavanjem mijelinskih proteina poput MOG35-55 u prisutnosti adjuvansa što dovodi do aktivacije CD4⁺ T-limfocita, aktivacije upalnih stanica u SŽS i demijelinizacije koja je često praćena i kliničkim simptomima paralize (33, 34). Zbog izražene imunološke komponente ovaj model najbolje oponaša patofiziologiju bolesti poput multiple skleroze. Međutim, demijelinizacija nije selektivna ni lokalizirana, već je posljedica generalizirane upalne reakcije i autoimunog napada, što otežava izolirano proučavanje izravnih mehanizama oštećenja mijelina i uloge pojedinih molekularnih čimbenika unutar glijalnih stanica (31).

Virusni modeli temelje se na infekciji neurotrofnim virusima poput Theilerovog murinog encefalomijelitisa virusa (TMEV) ili mišjeg hepatitis virusa (MHV). Ovi virusi uzrokuju kroničnu infekciju koja rezultira imunološkim odgovorom i demijelinizacijom, što

omogućuje proučavanje interakcija između infekcije, imunološkog sustava i mijelina. Nakon infekcije, virusi se zadržavaju unutar živčanog sustava, izazivajući progresivni gubitak mijelina, infiltraciju imunoloških stanica i dugotrajnu aktivaciju mikroglije i astrocita. Ovi modeli vjerno oponašaju određene aspekte humanih bolesti poput multiple skleroze, osobito u pogledu kroničnog tijeka, fokalne demijelinizacije i prisutne upale (35, 36). Unatoč translacijskoj vrijednosti, virusni modeli imaju niz ograničenja poput varijabilnosti ovisno o genetičkom profilu životinja, spolu i dobi. Dodatno, nije moguće jasno razgraničiti izravne posljedice virusne citotoksičnosti od sekundarnih imunoloških i glijalnih odgovora, što dodatno otežava analizu molekularnih promjena specifičnih za mijelin (37).

Genetički modeli uključuju genetički modificirane ili transgenične miševe kod kojih ciljano promijenjena ekspresija gena važnih za sintezu i održavanje mijelina i koriste se za proučavanje kongenitalnih poremećaja mijelinizacije. Primjeri uključuju *shiverer* miševe (koji imaju potpuni nedostatak MBP-a) i *jimpy* miševa (s mutacijom u genu za PLP). Ove životinje pokazuju teške deficite u sintezi i održavanju mijelinske ovojnice, što se očituje u poremećajima kretanja, neurološkim simptomima i, u većini slučajeva, ranoj smrtnosti (38, 39). Zbog toga su korisne za istraživanje osnovnih mehanizama nastanka mijelina tijekom razvoja i uloge pojedinih mijelinskih proteina u njegovoj stabilnosti. Međutim, imaju ograničenu primjenjivost za istraživanja stečenih demijelinizacijskih procesa karakterističnih za bolesti odrasle dobi, poput multiple skleroze ili toksičnih oštećenja. S obzirom na kongenitalne i trajne poremećaje mijelina u ovim modelima, proučavanje progresivnog gubitka mijelinske ovojnice u inače razvijenom živčanom sustavu, i procesa remijelinizacije nakon akutnog oštećenja nije moguće. Osim toga, zbog visoke smrtnosti i težine fenotipa, eksperimentalna manipulacija i longitudinalno praćenje u ovim modelima znatno su otežani (40, 41).

Toksični modeli demijelinizacije zasnivaju se na primjeni kemijskih spojeva koji selektivno oštećuju mijelin ili oligodendrocite. Njihova ključna prednost je vremenska kontrola demijelinizacije i mogućnost fokusiranja na primarne promjene u mijelinskoj ovojnici, uz minimalno sudjelovanje imunoloških mehanizama (42). Najčešće korišteni toksični agensi su kuprizon, lizolecitin i etidij bromid, svaki sa specifičnim mehanizmom djelovanja i eksperimentalnom primjenom. Za razliku od kuprizona, koji se sistemski primjenjuje putem prehrane, lizolecitin i etidij bromid primjenjuju se lokalno, najčešće stereotaksijskim injekcijama u bijelu tvar, poput *corpus callosum* (cc) ili leđne moždine, što uzrokuje nastanak fokalnih demijelinizacijskih lezija (43, 44). Ipak, ovi modeli pokrivaju vrlo ograničene regije

tkiva, tehnički su zahtjevni i nisu prikladni za ispitivanje sistemskih ili difuznih promjena u mijelinu.

S obzirom na ciljeve istraživanja koji uključuju analizu promjena lipidnog sastava i membranskih proteina mijelinske ovojnice, modeli koji se oslanjaju na snažan imunološki odgovor, poput EAE, ili virusnih modela, nisu metodološki prikladni. U tim modelima teško je razgraničiti izravne učinke na mijelin od sekundarnih posljedica sistemske upale, citotoksičnosti ili heterogenosti samog kliničkog tijeka. Genetički modeli, iako korisni za razumijevanje razvoja mijelina, ne odražavaju stečene demijelinizacijske procese odrasle dobi, a njihova visoka smrtnost i kongenitalni defekti ograničavaju mogućnost kontroliranih intervencija. Zbog toga se toksični modeli, koji omogućuju neimunološku, selektivnu i često reverzibilnu demijelinizaciju, nameću kao najprikladniji za ispitivanje specifičnih molekularnih mehanizama destabilizacije mijelina. Među njima se kuprizonski model ističe posebno se ističe jednostavnošću provođenja, reproduktivnošću i dobro okarakteriziranim vremenskim tijekom promjena što ga čini prikladnim za detaljnu analizu mijelinskih lipida, proteina i gangliosida (42, 45).

1.4. Kuprizonski model demijelinizacije

Kuprizonski model demijelinizacije predstavlja jedan od najčešće korištenih eksperimentalnih sustava za proučavanje molekularnih i staničnih mehanizama demijelinizacije u SŽS. Omogućuje istraživanja usmjerena na neupalne mehanizme oštećenja mijelina, identifikaciju potencijalnih molekularnih biomarkera te ispitivanje mogućnosti remijelinizacije i neuroglijalne regeneracije unutar jasno definiranog vremenskog okvira (42, 46). Za razliku od autoimunih ili virusnih modela, kuprizonski model uzrokuje selektivnu i reverzibilnu demijelinizaciju bez izraženog perifernog imunološkog odgovora, što ga čini iznimno prikladnim za izolirano proučavanje mijelinskih promjena (47).

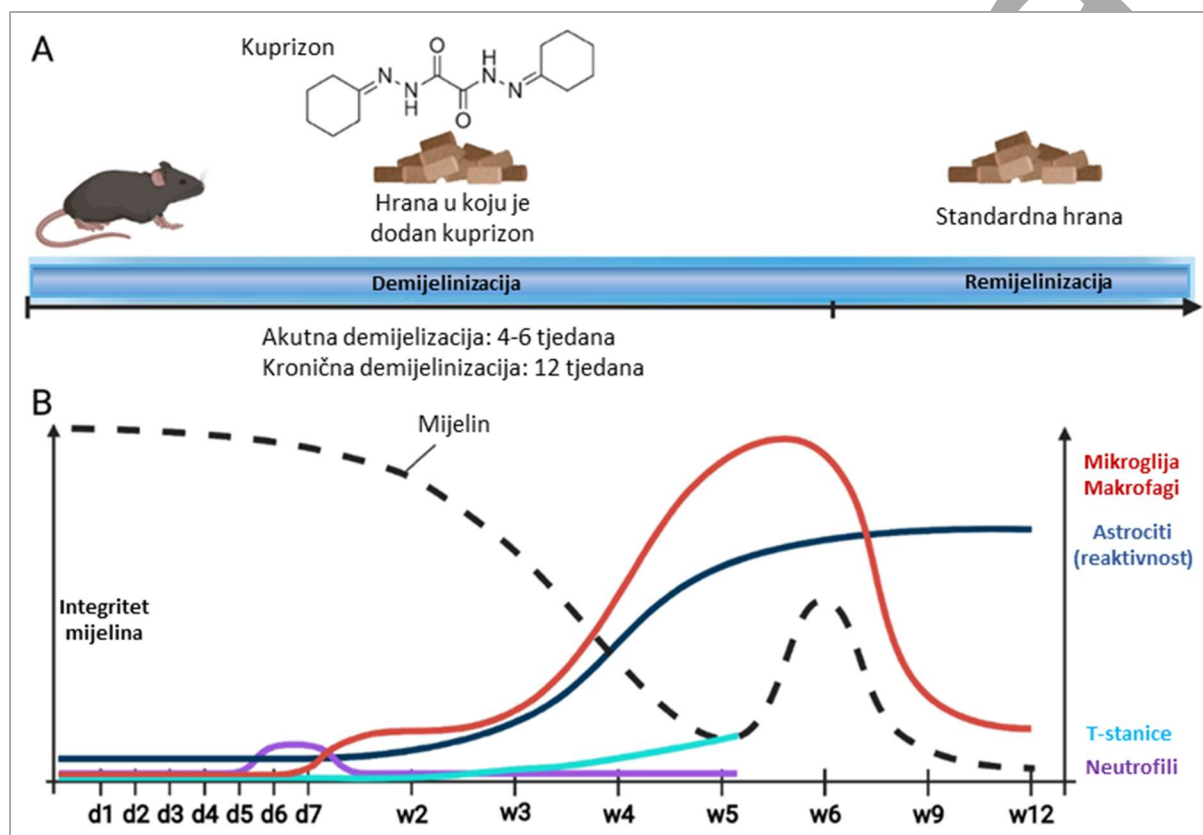
Kuprizon je organski spoj (prema IUPAC-u: N,N'-bis(cikloheksilidenamino)oksamid) koji djeluje kao kelator bakra i time remeti unutarstanične procese ovisne o bakru, osobito u oligodendrocitima. (48, 49) Njegovo djelovanje inducira specifično i reverzibilno oštećenje oligodendrocita, bez značajnije infiltracije perifernih imunoloških stanica. Mehanizam njegova djelovanja temelji se na poremećaju homeostaze bakra, pri čemu ne dolazi do globalnog smanjenja ukupne količine bakra u mozgu, nego do lokalnih promjena u njegovoj raspodjeli i

funkcionalnoj dostupnosti unutar stanica (50). Time se inhibira aktivnost enzima ovisnih o bakru, uključujući citokrom c oksidazu i superoksid-dismutazu (SOD, eng. *superoxide dismutase*) koji su ključni za mitohondrijsku funkciju i detoksikaciju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, eng. *reactive oxygen species*) (51, 52). Oligodendrociti, zbog svoje uloge u sintezi mijelina, imaju osobito visoke metaboličke potrebe i osjetljivi su na poremećaje u homeostazi bakra. Nedostatak dostupnog bakra uslijed kelacije kuprizonom dovodi do smanjene aktivnosti SOD-a, nakupljanja ROS-a i posljedičnog oksidativnog oštećenja proteina i lipida, što u konačnici dovodi do smrti oligodendrocita i gubitka mijelina (53, 54, 55). U ovoj fazi ne dolazi do izravnog oštećenja neurona, već do sekundarnog gubitka potpore koju im pružaju funkcionalni oligodendrociti.

Kuprizon osim izravnog djelovanja na oligodendrocite posredno aktivira i druge stanične populacije, osobito mikrogliju i astrocite. Mikroglija se aktivira i migrira prema mjestima oštećenja gdje fagocitira ostatke mijelina, dok astrociti pridonose održavanju lokalne homeostaze i potencijalno reguliraju proces remijelinizacije. Aktivacija ovih glijalnih populacija ne prati tipičan imunološki obrazac kao kod autoimunih modela, već se radi o lokaliziranom i moduliranom neuroinflamatornom odgovoru koji je prostorno i vremenski ograničen (56).

Standardni eksperimentalni protokol uključuje oralnu primjenu kuprizona hranom, najčešće u koncentraciji od 0,2 – 0,3 % tijekom perioda od 3 do 6 tjedana, ovisno o istraživačkom cilju. Demijelinizacija započinje već nakon 2 tjedna kada se pojavljuju prvi znakovi degeneracije oligodendrocita i gubitka mijelinskih proteina, dok se maksimalna demijelinizacija postiže između 4. i 6. tjedna. Nakon prekida primjene toksina tijekom sljedećih tjedana slijedi spontana remijelinizacija koja je izraženija u mladim životinjama i u početnim fazama oporavka (56, 57). Što omogućuje dinamičko praćenje procesa regeneracije mijelina unutar istog eksperimentalnog okvira (58, 59). Vremenski tijek demijelinizacije, aktivacije glijalnih stanica i remijelinizacije prikazan je shematski na Slici 1.4 koja prikazuje glavne stanične i molekularne u različitim fazama modela. Najizraženije promjene u ovom modelu javljaju se u cc, koji je najosjetljivija regija na kuprizon i najčešće se koristi kao referentna struktura za histološke i biokemijske analize. cc je najveći snop mijeliniziranih aksona koji povezuje lijevu i desnu hemisferu mozga te omogućuje prijenos informacija i koordinaciju funkcija između hemisfera. Osim u cc, promjene se mogu zabilježiti i u hipokampusu, moždanom deblu, cerebelumu i bazalnim ganglijima, ovisno o dozi, trajanju izlaganja i dobi

životinja (60). Regionalna osjetljivost povezana je s razlikama u metaboličkoj aktivnosti, opskrbi krvlju i gustoći oligodendrocita.



Slika 1.4. Shematski prikaz najčešće korištenog protokola izlaganja kuprizonu i glavnih staničnih odgovora u *corpus callosumu* (cc). (A) Glodavci se hrane standardnim hranom s dodatkom 0,2 – 0,3 % kuprizona tijekom 4 – 6 tjedana radi proučavanja akutne demijelinizacije, odnosno do 12 tjedana radi kronične demijelinizacije. Nakon toga slijedi povlačenje kuprizona i prelazak na standardnu prehranu, čime se potiče remijelinizacija. (B) Vremenski tijek kuprizonske intoksikacije prikazuje promjene u integritetu mijelina (isprekidana crna linija), aktivaciju mikroglije/makrofaga (crveno) i astrocita (plavo), uz prikaz prisutnosti T-stanica (tirkizno) i neutrofila (ljubičasto). Preuzeto i prilagođeno prema (61).

Na molekularnoj razini kuprizon izaziva promjene u lipidnom i proteinskom sastavu mijelina, uključujući smanjenu ekspresiju MBP-a i MAG-a, promjene u distribuciji gangliosida i reorganizaciju membranskih domena (62, 63). Ove promjene prate i funkcionalni deficiti, prvenstveno u motoričkoj koordinaciji i ravnoteži, koji se mogu kvantitativno pratiti

bihevioralnim testovima (npr. rotarod, test otiska šapica, *activity cage*). Povlačenjem kuprizona i tijekom remijelinizacije ti se funkcionalni deficiti djelomično ili potpuno povlače, osobito u mlađih životinja.

Jedna od ključnih prednosti kuprizonskog modela je njegova jednostavna primjena jer se kuprizon unosi oralno putem hrane, čime se izbjegavaju invazivni zahvati i smanjuje eksperimentalna varijabilnost (64). Model omogućuje selektivno proučavanje gubitka mijelina u središnjem živčanom sustavu uz očuvanu neuronsku arhitekturu i bez aktivacije adaptivnog imunološkog sustava (42, 65). Dodatna prednost modela je njegova reverzibilnost: prekidom primjene toksina dolazi do spontane remijelinizacije, što omogućuje proučavanje i degenerativnih i regenerativnih faza unutar istog eksperimentalnog okvira (66, 67). Zahvaljujući reproducibilnosti, vremenskoj predvidljivosti i regionalno specifičnim promjenama, kuprizonski model omogućuje precizno mapiranje vremenskog slijeda događaja - od početne disfunkcije oligodendrocita, preko gubitka mijelina, do aktivacije mikroglije i procesa remijelinizacije. Unatoč brojnim prednostima, kuprizonski model ima i određena ograničenja. Demijelinizacija nije difuzna, već je najizraženija u cc i nekoliko drugih regija (hipokampus, moždano deblo, cerebelum), dok su ostale strukture relativno pošteđene (68, 69). Iako model ne uključuje adaptivni imunološki odgovor, dolazi do aktivacije mikroglije i astrocita, što može utjecati na lokalnu signalizaciju i interpretaciju nalaza, osobito u kasnijim fazama (70). Mehanizam djelovanja kuprizona temelji se na toksičnom stresu, a ne na patofiziološkim procesima karakterističnim za bolesti poput multiple skleroze, što donekle ograničava njegovu translacijsku vrijednost (42). Dodatno, osjetljivost na kuprizon varira ovisno o soju, spolu i dobi životinja, što zahtijeva pažljivu standardizaciju protokola (71, 72). Unatoč navedenim ograničenjima, kuprizonski model ostaje jedan od najvažnijih neimunoloških modela demijelinizacije, posebno prikladan za istraživanja fokusirana na lipidni sastav mijelina, interakcije s membranskim proteinima te molekularne mehanizme destabilizacije i regeneracije mijelina.

1.5. Utjecaj starenja na mijelin i regeneraciju nakon demijelinizacije

Starenje je složen biološki proces koji utječe na gotovo sve sustave u organizmu, uključujući i SŽS. Na staničnoj i molekularnoj razini ono je povezano s kumulativnim staničnim i molekularnim oštećenjima, promjenama u signalnim putevima, smanjenom regenerativnom

sposobnošću te povećanim metaboličkim i oksidativnim stresom stanica (73, 74). Posebno je osjetljiv mijelin čije održavanje zahtijeva stalnu sintezu lipida i proteina te preciznu koordinaciju između oligodendrocita i aksona. S dobi dolazi do progresivnih strukturnih i funkcionalnih promjena, uključujući fragmentaciju mijelina, povećanje područja s defektnom mijelinizacijom i smanjenje učinkovitosti remijelinizacijskih mehanizama (75, 76). Na razini stanične membrane zabilježene su promjene u lipidnoj komponenti mijelina ovisne o dobi, osobito pad razine kolesterola, promjene u omjerima zasićenih i nezasićenih fosfolipida te smanjenje koncentracije određenih gangliozida (77, 78). Takve promjene utječu na fluidnost membrane, destabiliziraju lipidne splavi i otežavaju pravilnu lokalizaciju membranskih proteina što mijelin čini osjetljivim na stresne podražaje. Gubitak organizacije lipidnih mikrodomena može poremetiti komunikaciju između aksona i glija stanica te ugroziti stabilnost i cjelovitost mijelinske ovojnice.

Uz promjene u lipidima, starenje je povezano i sa smanjenjem regenerativnog potencijala oligodendrocitnih progenitorskih stanica (OPC, eng. *oligodendrocyte progenitor cells*), koje u mladom organizmu omogućuju učinkovitu remijelinizaciju. U starijih životinja te stanice pokazuju slabiju proliferaciju i diferencijaciju te smanjeni odgovor na remijelinizacijske signale (79). Uz epigenetičke promjene, smanjena osjetljivost na signalne molekule poput trombocitnog faktora rasta (PDGF, eng. *platelet-derived growth factor*) i inzulinu sličnog faktora rasta 1 (IGF-1, eng. *insulin-like growth factor 1*), kao i promjene u sastavu izvanstaničnog matriksa, dodatno ograničavaju regenerativni potencijal. Toksični modeli demijelinizacije, poput onog induciranog kuprizonom, omogućuju ispitivanje razlika u kontroliranim eksperimentalnim uvjetima u različitim starostima. Neka istraživanja pokazuju da starije životinje pokazuju izraženiju osjetljivost na demijelinizaciju i sporiju remijelinizaciju nakon prestanka izlaganja toksinu, što se pripisuje kombinaciji promijenjene lipidne arhitekture i smanjene sposobnosti regeneracije glija-stanica (80).

Razlike povezane s dobi ne očituju se samo u sastavu mijelina i regeneracijskom potencijalu, nego i u dinamici staničnih i molekularnih procesa koji prate demijelinizaciju i oporavak. Mladi organizmi nakon izlaganja kuprizonu pokreću regenerativne mehanizme brže i koordiniranije, uključujući aktivaciju i diferencijaciju OPC-ova te sintezu nove mijelinske ovojnice (81, 82). U starijih životinja, ti su procesi sporiji i prostorno ograničeniji, što rezultira nepotpunom remijelinizacijom ranjivih regija bijele tvari, poput cc (47, 83). Osim toga, uočene su i dobno uvjetovane razlike u glijalnom odgovoru. Mikroglia u mladim životinjama učinkovito uklanja ostatke mijelina i pridonosi stvaranju povoljne mikrookoline za obnovu, dok u starijih

često pokazuje produljenu aktivaciju i pro-upalni fenotip koji može ometati diferencijaciju OPC-ova (84, 85). Reaktivna astrocitoza također varira s dobi — dok u mladim prevladava regulacijska i potporna funkcija, u starijih može doprinijeti disregulaciji ionske i metaboličke homeostaze (70, 86). U kombinaciji s izraženijom apoptozom zrelih oligodendrocita i promijenjenom sustavnom mikrookolinom, obilježenom oksidativnim stresom, povišenim razinama upalnih citokina i smanjenom dostupnošću metaboličkih resursa, ove promjene rezultiraju slabijim regeneracijskim ishodima u starijih životinja (75).

Upravo zato je istraživanje dobno uvjetovanih odgovora na demijelinizaciju relevantno u kontekstu usporedbe miševa 3 i 6 mjeseci starosti. Ovo razvojno razdoblje obuhvaća prijelaz iz mladog odraslog u ranu zrelu dob, kada postaju uočljive molekularne i stanične promjene u mijelinu koje utječu na njegovu ranjivost i sposobnost regeneracije. Sustavno ispitivanje tih razlika važno je za razumijevanje patofizioloških mehanizama demijelinizacijskih bolesti koje se češće javljaju u starijoj životnoj dobi (61).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Opći cilj:

Cilj ovog istraživanja je ispitati utjecaj kuprizona na lipidni sastav specifičnih regija mozga povezanih s motoričkom funkcijom miševa različite starosne dobi.

Specifični ciljevi:

1. Ispitati utjecaj kuprizona na motoričku aktivnost i koordinaciju bihevioralnim testovima.
2. Odrediti stupanj demijelinizacije u mozgovima miševa tretiranih kuprizonom histološkim bojanjem Luxol Fast Blue te imunohistokemijski korištenjem specifičnih markera mijelina MBP i MAG.
3. Ispitati distribuciju kompleksnih gangliozida i neuroplastina u mozgovima miševa tretiranih kuprizonom.
4. Analizirati promjene u lipidnom molekulskom profilu u mozgovima miševa tretiranih kuprizonom koristeći IMS (engl. *Imaging Mass Spectrometry*).
5. Istražiti povezanost molekularnih promjena s funkcionalnim testovima te ispitati utjecaj životne dobi na učinke demijelinizacije izazvane kuprizonom.

Iz navedenih ciljeva rada proizašla je sljedeća hipoteza istraživanja: kuprizon uzrokuje promjene u lipidnom profilu, distribuciji kompleksnih gangliozida i stabilnosti mijelinskih membrana koje ovise o životnoj dobi, što rezultira funkcionalnim deficitima u motoričkoj aktivnosti i koordinaciji.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Pokusne životinje

Eksperimentalno istraživanje provedeno je na ukupno 48 mužjaka miševa soja C57Bl/6. Životinje su uzgajane u Vivariju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku, broj odobrenja HR-POK-005. Životni uvjeti uzgoja definirani su ciklusima dan/noć u intervalima od 12 sati (12/12 h) i stalno održavanom temperaturom i vlagom. Hrana i voda bili su dostupni životinjama *ad libitum*, u okolišu obogaćenom predmetima za igru. Sve postupke s pokusnim životinjama odobrilo je Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske (Klasa: UP/I-322-01/20-01/21, Urbroj: 525-10/0543-20-5, od 04.08.2020.), te Etičko povjerenstvo za istraživanja Medicinskog fakulteta Osijek (Klasa: 602-04/20-08/07, Urbroj: 2158-61-07-20-107, od 15.06.2020.). Istraživanje je dio projekta 'Multidisciplinarna evaluacija razlike između kemijski inducirane te urođene (*B4Galnt1-null*) demijelinizacije u miša – utjecaj demijelinizacije na sastav lipidnih splavi te broj, distribuciju i vrstu interneurona' (Mefof IP-2020, voditeljica projekta prof. dr. sc. Marija Heffer). Svi postupci su provedeni u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (NN 102/2017), Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/2013) te Direktivom Parlamenta Europske unije 2010/63/EU. Rad sa životinjama odvijao se prema smjernicama ARRIVE 2.0 za rad sa laboratorijskim životinjama uz poštovanje načela 3R (242).

U svrhu ovog istraživanja životinje su podijeljene u dvije dobne skupine: mlađu skupinu čine miševi starosti 3 mjeseca (N = 24), a stariju miševi starosti 6 mjeseci (N = 24). Starost od 6 mjeseci odabrana je kao translacijski ekvivalent rane zrele odrasle dobi u ljudi kada se javljaju prvi znakovi smanjene neuroplastičnosti, ali bez izraženih uznapredovali sistemskih promjena starenja. Ženke nisu uključene u istraživanje zbog poznatog učinka estrogena koji može djelovati neuroprotektivno i smanjiti osjetljivost na demijelinizacijske učinke kuprizona.

Unutar svake dobne skupine, životinje su nasumično raspoređene u kontrolnu i eksperimentalnu skupinu (N = 12 po skupini). Eksperimentalne skupine su tijekom 20 dana hranjene standardnom laboratorijskom hranom s dodatkom 0,2 % kuprizona, dok su kontrolne skupine dobivale istu hranu bez dodatka toksina. Tretman je započeo 20 dana prije nego su miševi

dosegli ciljanu dobnu granicu (3 ili 6 mjeseci) kako bi se osigurala demijelinizacija unutar željenog vremenskog okvira.

Kako bi se smanjio rizik od eksperimentalne pristranosti, primijenjen je postupak zasljepljivanja tijekom provođenja svih bihevioralnih i analitičkih postupaka. U postupku kvantifikacije nije bila poznata skupina kojoj pripada pojedina životinja, već su korišteni jedinstveni identifikacijski kodovi.

3.1.2. Kemikalije i protutijela

Za potrebe ovog istraživanja korištene su sljedeće kemikalije i puferi:

- fiziološka otopina puferirana fosfatom, PBS (engl. *phosphate buffer saline*):
 - NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD),
 - KCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD),
 - Na₂HPO₄ x 7 H₂O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD),
 - KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- paraformaldehid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- saharoza (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- 2-metilbutan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- tekući dušik (Messer Hrvatska)
- želatina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- kromova stipsa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- medij za kriostatsko rezanje (engl. *tissue freezing medium*, Leica, Nussloch, Njemačka)
- Luxol fast blue (Acros Organics - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- etanol 100 %-tni (apsolutni) (BioGnost, Zagreb, Hrvatska)
- etanol 96 %-tni (BioGnost, Zagreb, Hrvatska)
- etanol 70 %-tni (BioGnost, Zagreb, Hrvatska)
- ledena octena kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- litijev karbonat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- ksilol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- pokrivalo na bazi ksilena (BioGnost Ltd., Zagreb, Hrvatska)
- fiziološka otopina puferirana trisom (TBS, eng. tris buffered saline, pH= 7,4):
 - Tris (Fisher Bioreagents, Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)

HCl (Fisher Bioreagents, Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)

NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)

- vodikov peroksid (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- albumin iz goveđeg seruma (BSA, engl. *bovine serum albumin*; Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Njemačka)
- kozji serum (Gibco, Invitrogen, Auckland, NZ)
- Triton X-100 (Acros Organics, Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- ROTI® DAB Kit (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Njemačka)
- silika-gel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- amonijev acetat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- matrica 9-aminoakridin (9-AA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- metanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)

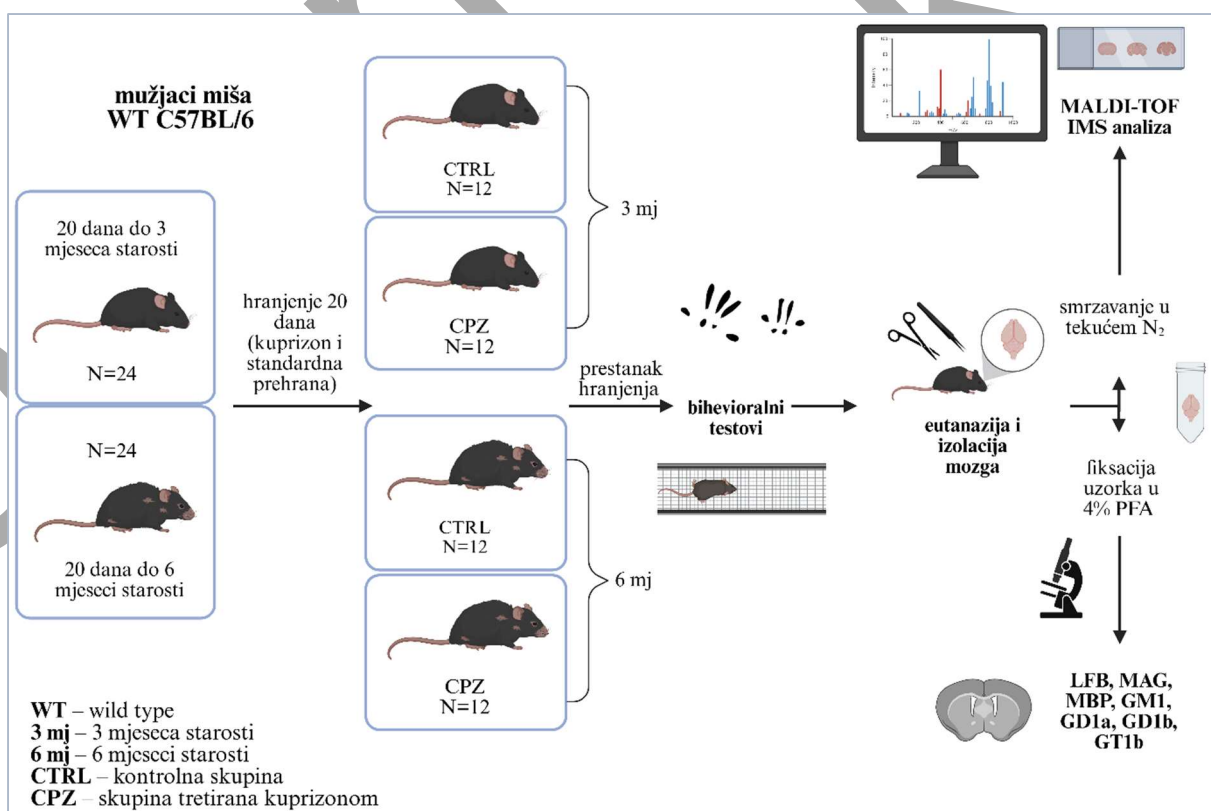
Za potrebe ovog istraživanja korištena su sljedeća protutijela:

- primarna protutijela:
 - anti-GM1 (mišje monoklonsko IgG, Zavod za farmakologiju Medicinskoga fakulteta Johns Hopkins, Baltimore, MD, SAD – dobiveno ljubaznošću prof. Schnaara)
 - anti-GD1a (mišje monoklonsko IgG, Zavod za farmakologiju Medicinskoga fakulteta Johns Hopkins, Baltimore, MD, SAD – dobiveno ljubaznošću prof. Schnaara)
 - anti-GD1b (mišje monoklonsko IgG, Zavod za farmakologiju Medicinskoga fakulteta Johns Hopkins, Baltimore, MD, SAD – dobiveno ljubaznošću prof. Schnaara)
 - anti-GT1b (mišje monoklonsko IgG, Zavod za farmakologiju Medicinskoga fakulteta Johns Hopkins, Baltimore, MD, SAD – dobiveno ljubaznošću prof. Schnaara)
 - anti-Neuroplastin 65 (Np; kozje poliklonsko IgG, R&D Systems, Minneapolis, MN, SAD)
 - anti-glikoprotein pridružen mijelinu (MAG; mišje monoklonsko IgG Milipore, Temecula, CA, SAD)
 - anti-mijelin bazični protein (MBP; mišje monoklonsko IgG Chemicon International, Temecula, CA, SAD)

- sekundarna protutijela:
 - kozje anti-mišje IgG konjugirano s biotinom (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, SAD)
 - goveđe anti-kozje IgG konjugirano s biotinom (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, SAD)
 - magareće anti-kozje IgG konjugirano s peroksidazom (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, SAD)
- tercijarni kompleks ABC – kompleks avidina i biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD)

3.2. Metode

Na Slici 3.1. dan je shematski prikaz istraživanja s brojem životinja čije je tkivo korišteno za pojedinu metodu.



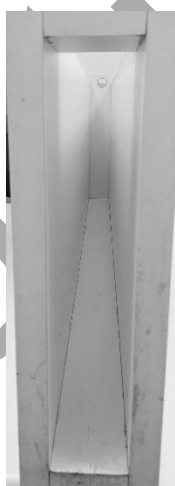
Slika 3.1. Shematski prikaz istraživanja. Shemu kreirao autor na Biorender.com.

3.2.1 Bihevioralni testovi

Po završetku hranjenja sa kuprizonom, životinje su bile podvrgnute bihevioralnim testovima usmjerenih na procjenu motoričkih sposobnosti i koordinacije. Testiranja su provedena u tri vremenska razdoblja: 2., 10. i 20. dan nakon završetka tretmana na istim životinjama. Sve su životinje ($N = 12$ po skupini) sudjelovale u testiranjima koja su provedena u istim uvjetima prostorije, u kontroliranom okruženju i u istom dobu dana kako bi se smanjio utjecaj vanjskih čimbenika. Tijekom svih faza testiranja, primijenjen je postupak zasljepljivanja, bez uvida u pripadnost životinja eksperimentalnim skupinama.

3.2.1.1. Test otiska stopala

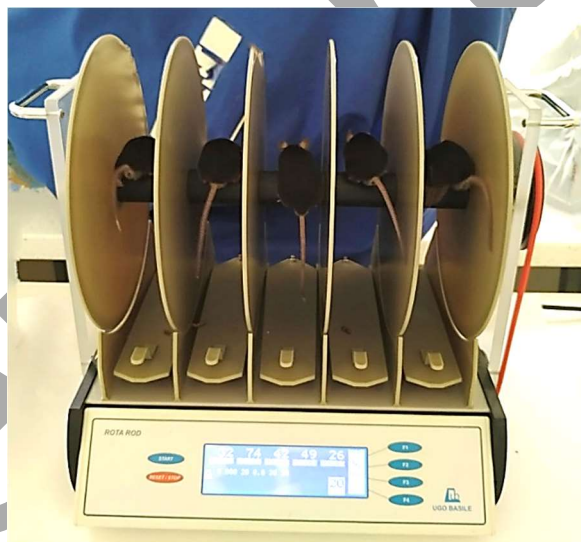
Za procjenu motoričke koordinacije i simetrije kretanja korišten je test otiska stopala. Prednje i stražnje šape svakog miša obojane su netoksičnom bojom na bazi aktivnog ugljena, nakon čega je životinja bila puštena u uski hodnik (tunel) dužine 85 cm i širine 5 cm (Slika 3.2) čija je podloga bila obložena papirnatim trakama. Hodanje miša rezultiralo je otiscima šapa na papiru koji su naknadno analizirani. Kvantitativno su se mjerili parametri poput duljine koraka (od sredine otiska prednje šape do sredine otiska stražnje šape) i simetrije između lijeve i desne strane. U obzir su uzimani samo ravnomjerno razmaknuti, jasni i nerazmazani otisci šapica. Ova metoda omogućuje uvid u funkcionalne promjene uzrokovane demijelinizacijom te je primjenjiva kod procjene blagog do umjerenog neurološkog deficita.



Slika 3.2. Tunel za analizu otiska šapica

3.2.1.2. Rotarod test

Rotarod test korišten je za procjenu ravnoteže, koordinacije i motoričke izdržljivosti. U tu svrhu korišten je uređaj Rotarod (Ugo Basile, Gemonio, Italija) koji se sastoji od pet rotirajućih cilindara promjera 5 cm, a ispod svakog je platforma za detekciju pada životinje (Slika 3.3). Svaka je životinja postavljena na cilindar koji se okretao konstantnom brzinom, a mjereno je vrijeme (latencija) do pada s cilindra. Maksimalno trajanje pojedinog mjerenja iznosilo je 5 minuta (300 sekundi), nakon čega je test automatski prekinut ako životinja nije pala. Prije početka eksperimentalnih mjerenja, sve životinje su prethodno trenirane pet dana prije početka testiranja kako bi se smanjio utjecaj učenja na rezultate. Vrijeme latencije do pada korišteno je kao pokazatelj sposobnosti održavanja ravnoteže i motoričke koordinacije.

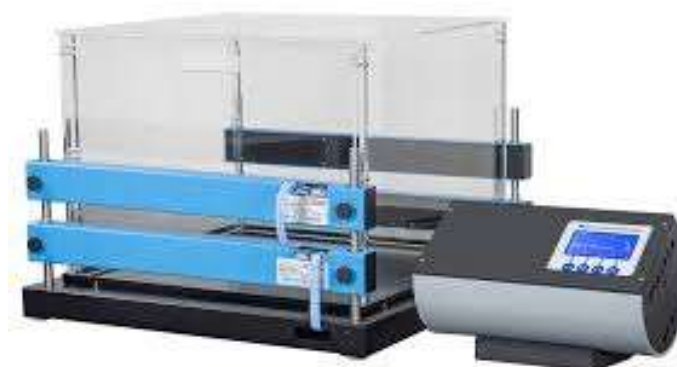


Slika 3.3. Rotarod uređaj

3.2.1.3. Test spontane motoričke aktivnosti

Motorička aktivnost životinja procjenjivana je pomoću uređaja za praćenje lokomotorne aktivnosti (Activity Cage, Ugo Basile, Gemonio, Italija) (Slika 3.4). Uređaj se sastoji od prozirne komore od pleksiglasa opremljene sustavom infracrvenih senzora koji bilježe horizontalne (hod) i vertikalne pokrete (propinjanje na stražnje noge) životinje. Aktivnost svake životinje zabilježena je u dva vremenska intervala, nakon 1 minute i nakon 4 minute boravka u komori. Dobiveni rezultati uključivali su broj horizontalnih i vertikalnih pokreta, što omogućuje procjenu razine motoričke aktivnosti i eventualne letargije povezane s oštećenjem bijele tvari.

Testiranje je provedeno u standardiziranim uvjetima i u tihom okruženju kako bi se smanjio utjecaj vanjskih čimbenika.



Slika 3.4. Uređaj za praćenje lokomotorne aktivnosti (*activity cage*).

3.2.2. Žrtvovanje miševa, fiksiranje i krioprotekcija uzoraka

Nakon završetka eksperimentalnog protokola životinje su eutanazirane u skladu s važećim etičkim smjernicama i odobrenjima. Prije eutanazije životinjama je inducirana duboka anestezija inhalacijom izoflurana sve do potpune arefleksije, čime je osigurano bezbolno stanje. Nakon eutanazije, mozgovi su pažljivo izolirani, a potom su obrađeni ovisno o planiranoj analizi. Iz svake skupine šest životinja je korišteno za histološke i imunohistokemijske analize, dok je preostalih šest životinja korišteno za lipidomsku analizu. Mозгови namijenjeni za histološku i imunohistokemijsku obradu fiksirani su u svježe pripremljenoj 4 %-tnoj otopini paraformaldehida (PFA) na +4 °C tijekom 24 sata, a zatim krioprotektirani u 10 %-tnoj i u 20 %-tnoj saharozi. Nakon krioprotekcije mozgovi su smrznuti u pothlađenom 2-metilbutanu i pohranjeni na –80 °C do daljnje analize. Mозгови preostalih životinja namijenjeni biokemijskim analizama odmah nakon disekcije su smrznuti u tekućem dušiku te pohranjeni na –80 °C do daljnje obrade.

3.2.3. Histološko bojanje

3.2.3.1. Priprema želatiniziranih predmetnih stakalaca

Za histološke i imunohistokemijske analize korištena su želatinizirana predmetna stakalca kako bi se osigurala dobra adhezija kriorezova. Za želatinizaciju stakalaca pripremljena

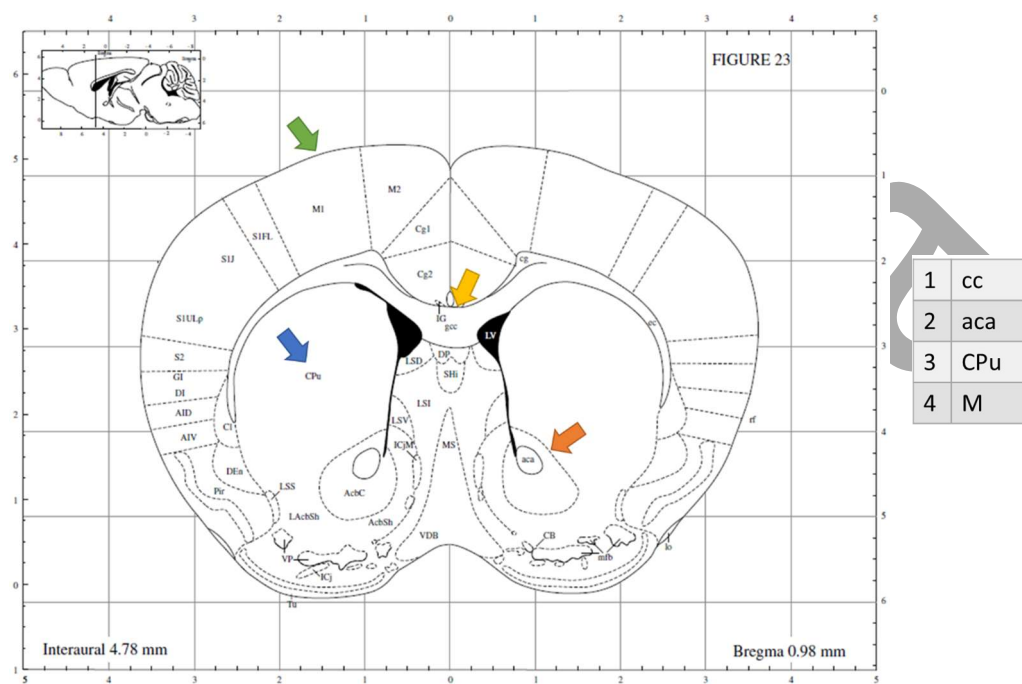
je 2 %-tna otopina želatine otapanjem želatine u destiliranoj vode zagrijanoj na 50 °C uz stalno miješanje do potpunog otapanja. U otopinu je zatim dodana kromova stipsa do konačne koncentracije 0,00025 g/mL. Čista predmetna stakalca uronjena su u pripremljenu otopinu na 10 sekundi, zatim postavljena u vodoravan položaj i ostavljena da se osuše na sobnoj temperaturi.

3.2.3.2. Histološko bojanje metodom Luxol Fast Blue

Za procjenu ukupnog stupnja demijelinizacije u bijeloj tvari mozga, provedeno je histološko bojanje preparata metodom *Luxol Fast Blue* (LFB). Ova metoda omogućuje selektivno bojenje mijelinske ovojnice vezanjem boje na lipoproteinske komponente mijelina, čime se vizualizira prisutnost ili gubitak mijelinske mase. Fiksirani i krioprotektirani mozgovi su uklopljeni u medij za kriostatsko rezanje te su rezani na kriostatu (Leica, Nussloch, Njemačka) pri temperaturi komore od –18 °C u koronarnom smjeru debljine 35 µm. Rezovi su preneseni na želatinizirana predmetna stakalca koja su ostavljena da se suše na zraku barem 24 sata.

Otopina LFB pripremljena je otapanjem 0,1 g LFB u 100 mL 95 %-tnog etanola, uz dodatak 0,5 mL 10 %-tne ledene octene kiseline. Otopina je miješana na magnetskoj miješalici i profiltrirana prije uporabe. Također je pripremljena i 0,05 %-tna otopina litijevog karbonata otapanjem u destiliranoj vodi i profiltrirana. Prije bojenja, preparati su dehidrirani prolaskom kroz seriju etanola rastuće koncentracije (30 %, 70 %, 95 %, 100 % po 5 min) nakon čega su ponovno inkubirani 5 min u 95 %-tnom etanolu. Bojenje je provedeno inkubacijom preparata u LFB otopini preko noći na 50 °C. Nakon toga, rezovi su kratko uronjeni u 95 % etanol (1 min), zatim isprani u destiliranoj vodi te diferencirani uranjanjem u 0,05 %-tnu otopinu litijevog karbonata u trajanju od 5 – 20 sekundi uz lagano protresanje. Intenzitet bojenja kontroliran je mikroskopom, a ovisno o intenzitetu bojenja, postupak je po potrebi ponavljan, ali ne duže od ukupno 50 sekundi.

Nakon diferencijacije, rezovi su višestruko isprani u 70 %-tnom etanolu (tri puta, ukupno 7 min), zatim u destiliranoj vodi i ponovno dehidrirani u 70 %-tnom, 95 %-tnom i trima uzastopnim inkubacijama u 100 %-tnom etanolu (svaka po 5 min). Rezovi su potom uronjeni u ksilol dva puta u trajanju od 10 minuta, pokriveni Histomount medijem te poklopljeni pokrovnim stakalcem.



Slika 3.5. Analizirana područja mozga miševa divljeg tipa C57Bl/6 u histološkoj, imunohistokemijskoj i MALD-TOF IMS metodi. Za izradu slike su korištene i prilagođene slike iz atlasa mišjeg mozga (87). (cc – corpus callosum, aca – prednja komisura, CPu – strijatum, M – motorička kora.

3.2.4. Imunohistokemijska analiza

Kao i za histološku analizu, fiksirani i krioprotektirani mozgovi su najprije uklopljeni u medij za kriostatsko rezanje, a zatim su pomoću kriostata načinjeni koronarni rezovi debljine 35 μ m pri temperaturi komore od -18°C . Imunohistokemija je provedena na slobodno plutajućim rezovima u mikrotitarskim pločicama s 24 jažice. U prvom koraku, rezovi su inkubirani u 1 %-tnoj otopini vodikovog peroksida u 1 $\times$ TBS-u 30 min na $+4^{\circ}\text{C}$ kako bi se inhibirala aktivnost endogenih peroksidaza. Slijedilo je blokiranje nespecifičnih veznih mjesta pomoću otopine koja je sadržavala 1 % albumina iz goveđeg seruma i 5 % normalnog kozjeg seruma u 1 $\times$ TBS-u. Za bojenje markera mijelina, u otopinu za blokiranje je dodan Triton X-100 (1 %) radi permeabilizacije stanične membrane. Rezovi su u blokirajućoj otopini inkubirani 2 h na $+4^{\circ}\text{C}$ uz stalno treskanje. Primarna protutijela su pripremljena u otopini za blokiranje nakon čega je slijedila inkubacija preko noći na $+4^{\circ}\text{C}$. Za detekciju gangliozida korištena su protutijela na GM1, GD1a, GD1b i GT1b, u razrjeđenju 1:10000. Za označavanje mijelinske komponente korištena su protutijela na MBP i MAG, oba u razrjeđenju 1:500. U istraživanju je također analizirana prisutnost i distribucija Np-65 u razrjeđenju 1:500. Nakon inkubacije s

primarnim protutijelima, rezovi su triput isprani u 1×TBS-u u trajanju od po 10 minuta te su potom inkubirani četiri sata na + 4 °C sa sekundarnim protutijelima – kozjim anti-mišjim IgG konjugiranim s biotinom (za gangliozide i markere mijelina) te sa goveđim anti-kozjim IgG konjugiranim s biotinom, pripremljeni u otopini za blokiranje, u razrjeđenju 1:500. Slijedilo je ispiranje tri puta po 10 minuta u 1×TBS-u te potom inkubacija s kompleksom avidinina i biotina konjugiranog s peroksidazom (Vectror Elite ABC kit) pripremljenim u otopini za blokiranje prema uputama proizvođača, dva sata na +4 °C. Nakon završetka inkubacije rezovi su isprani u 1×TBS-u tri puta po 10 minuta. Vizualizacija imunohistokemijskog signala provedena je korištenjem supstrata 3,3'-diaminobenzidina (DAB) do razvoja specifičnog smeđeg obojenja, nakon čega je reakcija zaustavljena ispiranjem u 1×TBS-u. Rezovi su potom pažljivo preneseni na silanizirana predmetna stakalca, ostavljeni da se osuše i zatim prekriveni medijem Histomount i pokrovnim stakalcem.

3.2.5. Analiza histoloških i imunohistokemijskih bojanja

Nakon završene histološke i imunohistokemijske obrade, preparati su analizirani svjetlosnom mikroskopijom (Carl Zeiss Axioskop 2 MOT, Jena, Njemačka) pri povećanju od objektiva 20×. Fotografije odabranih područja mozga namijenjenih za analizu snimljene su kamerom Olympus DP70 (Olympus Optical Co., Japan) koja je pričvršćena na svjetlosni mikroskop. Područje analize histoloških i imunohistokemijskih bojanja je iznosilo 200 × 200 µm. Kvantifikacija intenziteta bojenja provedena je pomoću računalnog paketa Fiji (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD). Analiza je uključivala pretvorbu slika u 8-bitnu sivu skalu i određivanje intenziteta signala u odabranim regijama interesa (ROI, engl. *region of interest*). Regije interesa obuhvaćale su bijelu tvar *corpus callosum* (cc), prednju komisuru (aca, lat. *anterior commissure*), strijatum (CPu, lat. *caudate putamen*) i motorička kora (M, lat. *cortex motorius*) (Slika 3.5) na istim anatomskim razinama za sve životinje. Dobiveni rezultati izraženi su kao prosječni intenzitet sivih vrijednosti, pri čemu niže vrijednosti ukazuju na veći stupanj demijelinizacije. Kvantitativni podaci korišteni su za statističku usporedbu između kontrolnih i kuprizonom tretiranih skupina.

3.2.6. Slikovna spektrometrija masa

Za potrebe vizualizacije prostorne raspodjele lipida u moždanom tkivu korištena je slikovna spektrometrija masa (IMS, engl. *imaging mass spectrometry*), temeljena na matricom potpomognutoj laserskoj desorpciji/ionizaciji spregnuta s masenim detektorom koji mjeri vrijeme preleta (MALDI TOF, eng. *matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight*). Analize su provedene na uređaju iMScope Trio (Shimadzu, Kyoto, Japan), koji omogućuje integraciju optičkog mikroskopa i visokoosjetljive spektrometrije masa u jednom sustavu čime se omogućuje precizno mapiranje molekularnih profila izravno na tkivnim rezovima. Snimanja su provedena u negativnom ionskom modu, koji omogućuje visoku osjetljivost za anionske lipidne vrste, čime se osigurala široka pokrivenost lipidnog profila uzoraka. Regije koje su snimane uključivale su bijelu tvar cc, aca, CPu i M (Slika 3.5).

Brzo smrznuto moždano tkivo rezano je na kriostatu na debljinu od 16 μm i preneseno na predmetna stakalca presvučena oksidom indija i kositra (ITO stakla, engl. *indium tin oxide*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), koja su kompatibilna s IMS analizom zbog svoje vodljive površine. Ukoliko uzorci nisu odmah analizirani pomoću IMS-a, pohranjeni su tube sa silika-gelom radi kontrole vlage i čuvani na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do trenutka snimanja. Prije analize, stakalca su odmrznuta na sobnoj temperaturi u eksikatoru kako bi se uklonila kondenzacija i stabilizirala vlažnost. Nakon toga, uzorci su isprani u 20 mM amonijevom acetatu u trajanju od 10 sekundi radi uklanjanja soli i poboljšanja detekcija lipidnih vrsta, te su ponovno osušeni u eksikatoru 15-tak minuta. Za snimanja u negativnom modu na rezove je nanescena matrica 9-aminoakridin (9-AA) pomoću uređaja iMLayer (Shimadzu, Kyoto, Japan), postupkom sublimacije na $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 5 minuta. Nakon toga provedena je rekristalizacija inkubacijom uzorka na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ izlaganjem 0,5 %-tnoj otopini metanola kroz 5 minuta. Tako pripremljeni uzorci bili su spremni za IMS analizu. Spektralni podaci prikupljeni su u rasponu masa od 600 do 1000 m/z uz analitičke uvjete: D1 (promjer lasera 10 μm), intenzitet lasera 40 %, frekvencija 1000 Hz, 200 snimaka po pikselu, veličina x i y zahvata 10 x 10 μm . Za svako snimanje rezova analizirano je 36 piksela.

3.2.7. Statističke metode

3.2.7.1. Statistička obrada bihevioralnih podataka

Za statističke analize korišten je računalni program Past 4.06b (88). Za sve bihevioralne parametre (duljina koraka i širina koraka, rotarod test, horizontalna i vertikalna aktivnost u uređaju *activity cage*) najprije je provedena deskriptivna analiza podataka, uključujući izračun aritmetičke sredine, standardne devijacije, minimalnih i maksimalnih vrijednosti. Normalnost distribucije podataka testirana je Shapiro–Wilkovim testom. Na temelju rezultata testa normalnosti odlučivalo se o primjeni parametrijskih ili neparametrijskih metoda. Parametrijska jednofaktorska analiza varijance (One-way ANOVA) korištena je za usporedbe skupina kod podataka koji su slijedili normalnu distribuciju. U slučajevima kada je ANOVA pokazala statistički značajnu razliku, provedena je Tukeyjeva *post hoc* analiza radi identifikacije skupina među kojima postoji značajna razlika. U slučajevima kada podaci nisu zadovoljavali pretpostavke normalne distribucije, korišteni je neparametrijski Kruskal–Wallisov test uz Dunnovu analizu za višestruke usporedbe. Za podatke koji su uključivali ponovljena mjerenja korišten je Friedmanov test. Sve analize provedene su odvojeno za tri vremenske točke (2., 10. i 20. dan nakon završetka tretmana kuprizonom), čime je omogućen uvid u dinamiku promjena tijekom oporavka. Razina statističke značajnosti postavljena je na $P < 0,05$. Rezultati su grafički prikazani u obliku box-plot dijagrama (medijan, interkvartilni raspon, minimalne i maksimalne vrijednosti).

3.2.7.2. Statistička obrada histoloških i imunohistokemijskih podataka

Za statističku obradu podataka histološke i imunohistokemijske kvantifikacije korišten je računalni program GraphPad Prism, verzija 10.6.0 (GraphPad Software, Boston, MA, SAD) te PAST, verzija 5.2.1. (88, 89). Kvantifikacija je provedena mjerenjem integriranog intenziteta bojenja (engl. *integrated density*) u unaprijed definiranim strukturama mozga.

Za svaki skup podataka prvo je izračunata deskriptivna statistika, uključujući aritmetičku sredinu, standardnu devijaciju te minimalne i maksimalne vrijednosti. Normalnost distribucije podataka testirana je Shapiro–Wilkovim testom. U slučajevima kada distribucija nije zadovoljavala pretpostavke normalnosti, za usporedbu više nezavisnih skupina primijenjen je Kruskal–Wallisov test, a višestruke usporedbe među skupinama provedene su Dunnovim *post-hoc* testom. Iako su u pojedinim analizama sve skupine pokazivale normalnu distribuciju, zbog

ograničenog broja replikata po skupini ($n = 9$, npr. u cc) također je primijenjen konzervativniji pristup, tj. Kruskal–Wallisov test.

Kada su bile zadovoljene pretpostavke normalne distribucije i homogenosti varijanci, primijenjena je jednofaktorska analiza varijance (One-way ANOVA), dok je za podatke u kojima su se istovremeno analizirala dva faktora (dob i tretman) korištena dvofaktorska ANOVA. Parne usporedbe između razina faktora provedene su Tukeyjevim *post-hoc* testom. Razina statističke značajnosti u svim analizama postavljena je na $P < 0,05$.

3.2.7.3. Statistička obrada podataka iz IMS metode

Dobiveni spektralni podaci prvo su obrađeni u softverskom paketu IMAGEREVEAL™ v1.1 (Shimadzu, Kyoto, Japan). Predobrada je uključivala uklanjanje pozadinske buke, kalibraciju m/z osi i normalizaciju na ukupni ionizacijski signal (TIC, engl. *total ion current*) kako bi se smanjile varijacije u ukupnoj količini detektiranih iona među uzorcima i omogućila kvantitativna usporedba između skupina. Nakon toga su generirane ionske mape za odabrane m/z signale radi procjene prostorne distribucije lipida u regijama interesa (cc, aca, CPu, M).

Za statističku usporedbu lipidnih profila između eksperimentalnih skupina korišten je IMAGEREVEAL™ softver ili je rađena analiza u programskom paketu R v. 4.2 (90). U statističku analizu su uključeni signali unutar masenog raspona 600–1000 m/z . Za smanjenje dimenzionalnosti i vizualizaciju grupiranja podataka korištena je analiza glavnih komponenti (PCA, engl. *principal component analysis*) (91), dok je za nadziranu klasifikaciju i identifikaciju m/z signala koji najviše doprinose razlikovanju skupina korištena analiza djelomičnih najmanjih kvadrata diskriminantne analize (PLS-DA, engl. *partial least-squares discriminant analysis*) (92).

Za daljnju identifikaciju najznačajnijih m/z vrijednosti, iz svake piramidalne analize doprinosa prema prvoj i drugoj komponenti odabrano je po deset m/z značajki s najvećim doprinosom razdvajanju skupina. Ukupno je tako izdvojeno 160 m/z vrijednosti, koje su zatim pretražene u internetskoj platformi METASPACE (<https://metaspace2020.eu>) radi provizorne identifikacije potencijalnih analita. Pretraga je provedena uz sljedeće filtere: negativan polaritet, baza podataka HMDB – endogeni metaboliti v4, stopa lažnih otkrića (FDR) postavljena na 10 %, organizam *Mus musculus* ili *Homo sapiens*, MALDI izvor ionizacije, adukt M+H te tolerancija mase od 50 ppm. Dobivene anotacije korištene su za provizornu identifikaciju lipidnih klasa i potencijalnih molekula koje odgovaraju detektiranim m/z vrijednostima.

4. REZULTATI

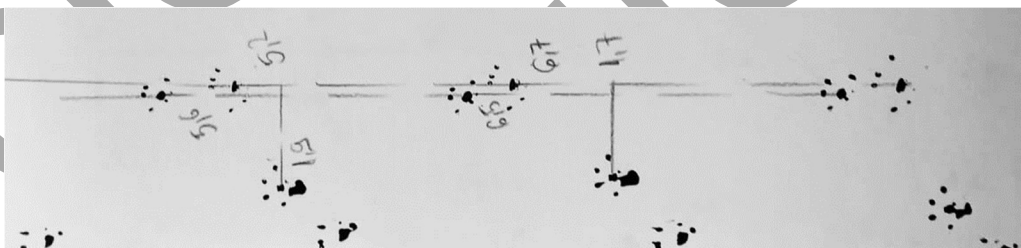
4.1. Bihevioralni testovi

Kako bi se procijenio utjecaj kuprizona na motoričke funkcije, provedena su tri bihevioralna testa: analiza otiska šapica, rotarod test i test motoričke aktivnosti u uređaju *activity cage*. Ovi testovi omogućili su procjenu koordinacije pokreta, ravnoteže, izdržljivosti te spontanog kretanja u tri vremenske točke (2., 10. i 20. dan) nakon završetka tretmana kuprizonom čime je dobiven cjelovit uvid u promjene motoričkih funkcija.

Životinje su bile podijeljene u 4 skupine prema dobi i tretmanu: dvije eksperimentalne skupine miševa starosti 3 (3CPZ) i 6 (6CPZ) mjeseci koje su tijekom 20 dana bile hranjene hranom koja je sadržavala 0,2 % kuprizona, te dvije odgovarajuće kontrolne skupine koje nisu bile izložene toksinu (3CTRL i 6CTRL). Ove oznake korištene su u svim prikazima rezultata bihevioralnih testova.

4.1.1. Analiza otiska šapica

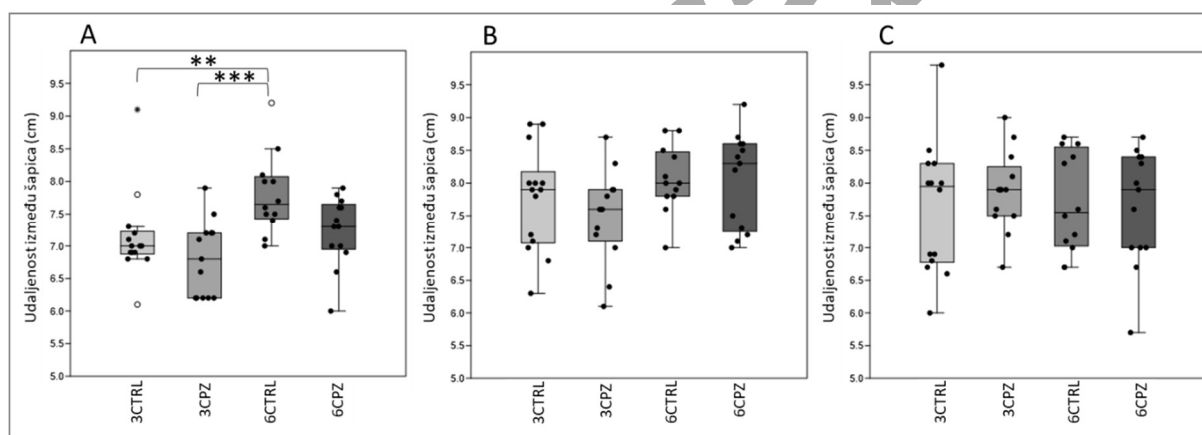
Analiza otiska šapica korištena je za procjenu motoričkih sposobnosti miševa u tri vremenske točke nakon završetka tretmana kuprizonom. Za svaku životinju izmjerena je duljina koraka lijeve i desne stražnje šape te širina koraka (Slika 4.1).



Slika 4.1. Mjerenje duljine i širine koraka miševa

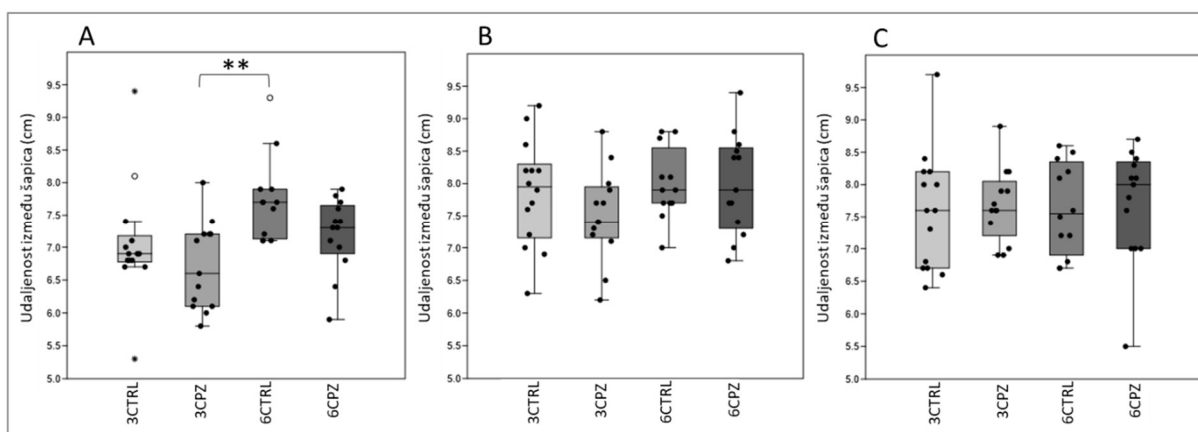
Rezultati Shapiro–Wilkovog testa pokazali su da vrijednosti za duljinu koraka desnih šapica slijede normalnu distribuciju, pa je za usporedbu između skupina primijenjen parametrijski test One-way ANOVA. Za duljinu koraka lijevih šapica, Shapiro–Wilkovov test je pokazao odstupanje od normalne distribucije ($P < 0,05$), pa su skupine uspoređene neparametrijskim Kruskal–Wallisovim testom.

Shapiro–Wilkov test pokazao je da podaci za udaljenost između uzastopnih otisaka lijeve šape ne slijede normalnu distribuciju, pa je za analizu razlika između skupina korišten Kruskal–Wallisov test. Rezultati su pokazali statistički značajnu razliku među skupinama drugog dana nakon završetka tretmana ($P < 0,01$). *Post hoc* Dunn-ova višestruka usporedba pokazala je značajne razlike između skupina 3CTRL i 6CTRL ($P < 0,001$) te između skupina 3CPZ i 6CTRL ($P < 0,001$) drugi dan nakon prestanka tretmana sa kuprizonom (Slika 4.2 A). 10 i 20 dana nakon završetka tretmana nije utvrđena statistički značajna razlika među skupinama (Slika 4.2 B i C).

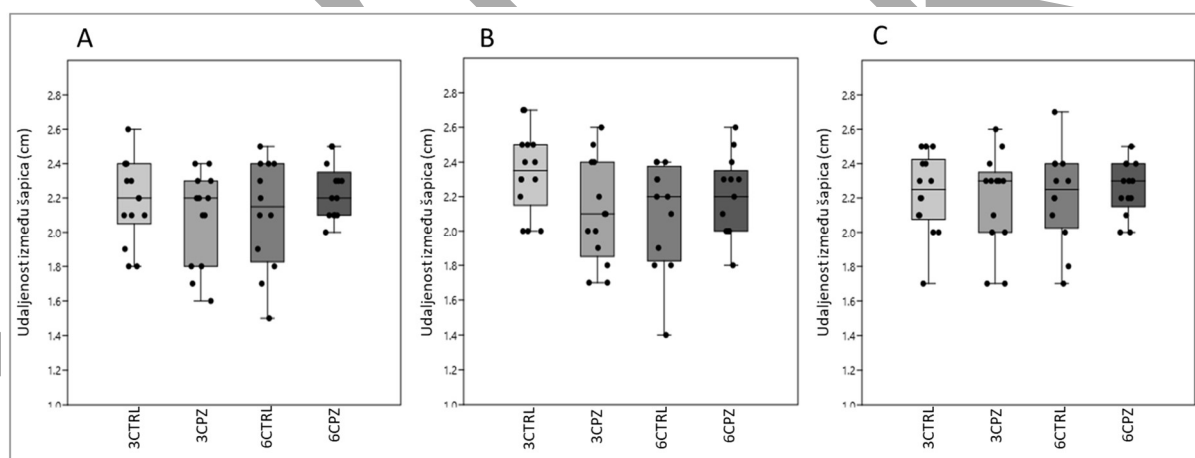


Slika 4.2. Udaljenosti između uzastopnih otisaka šapa prednje i stražnje lijeve noge miševa: A) 2. dan, B) 10. dan i C) 20. dan nakon prestanka tretmana kuprizonom. Podaci su prikazani box-plot dijagramom (medijan, interkvartilni raspon, vrijednosti min–max). Zvezdice predstavljaju statistički značajnu razliku (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; Kruskal–Wallis test uz *post hoc* Dunn-ov test). 3CTRL, 6CTRL – kontrolne skupine miševa starosti 3 i 6 mjeseci; 3CPZ, 6CPZ – miševi starosti 3 i 6 mjeseci tretirani kuprizonom.

Shapiro–Wilkov test pokazao je da podaci za udaljenost između uzastopnih otisaka desne šape slijede normalnu distribuciju, stoga je za analizu korištena jednofaktorska analiza varijance (One-way ANOVA). Rezultati su pokazali statistički značajnu razliku između skupina drugog dana nakon završetka tretmana ($P < 0,01$). *Post hoc* Tukeyev test višestrukih usporedbi identificirao je jedinu značajnu razliku između skupina 3CPZ i 6CTRL ($P < 0,01$), pri čemu je duljina koraka bila kraća u skupini 3CPZ (Slika 4.3 A). Analize provedene 10. i 20. dana nakon završetka tretmana nisu pokazale statistički značajne razlike među skupinama (Slika 4.3 B i C).



Slika 4.3. Udaljenosti između uzastopnih otiska šapa desne noge miševa: A) 2. dan nakon prestanka tretmana kuprizonom, B) 10. dan nakon prestanka tretmana kuprizonom, C) 20. dan nakon prestanka tretmana kuprizonom. Podaci su prikazani box-plot dijagramom (medijan, interkvartilni raspon, vrijednosti min–max) za objedinjene rezultate prednje i stražnje lijeve šape. Statistička analiza provedena je Kruskal–Wallisovim testom uz *post hoc* Dunn-ov test (** $P < 0,01$). 3CTRL, 6CTRL – kontrolne skupine miševa starosti 3 i 6 mjeseci; 3CPZ, 6CPZ – miševi starosti 3 i 6 mjeseci tretirani kuprizonom.



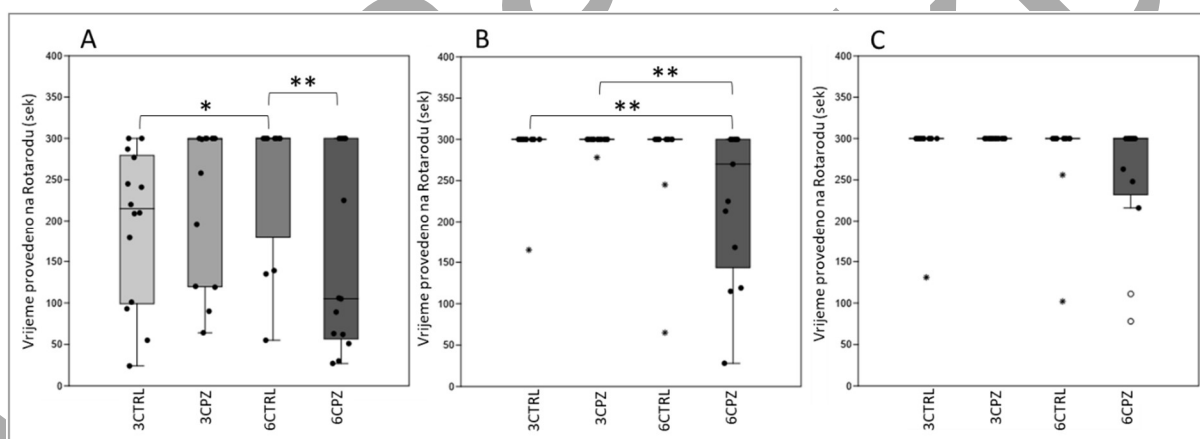
Slika 4.4. Širina koraka miševa: A) 2. dan nakon završetka tretmana kuprizonom, B) 10. dan nakon završetka tretmana kuprizonom, C) 20. dan nakon završetka tretmana kuprizonom. Podaci su prikazani box-plot dijagramom (medijan, interkvartilni raspon, vrijednosti min–max). Statistička analiza provedena je Kruskal–Wallis testom, koji nije pokazao statistički značajne razlike među skupinama ni u jednoj vremenskoj točki. 3CTRL, 6CTRL – kontrolne skupine miševa starosti 3 i 6 mjeseci; 3CPZ, 6CPZ – miševi starosti 3 i 6 mjeseci tretirani kuprizonom.

Shapiro–Wilkov test pokazao je da podaci za širinu koraka ne slijede normalnu distribuciju, stoga je za usporedbu skupina korišten Kruskal–Wallisov test. Rezultati analize nisu pokazali statistički značajne razlike među skupinama ni drugog, ni desetog, niti dvadesetog dana nakon završetka tretmana kuprizonom (Slika 4.4 A-C).

4.1.2. Rotarod test

Rotarod test korišten je za procjenu ravnoteže, koordinacije i motoričke izdržljivosti miševa u tri vremenske točke nakon završetka tretmana kuprizonom. Za svaku životinju zabilježeno je vrijeme (latencija) koje je provela na rotirajućem cilindru prije pada, a maksimalno vrijeme trajanja pojedinog mjerenja bilo je 300 sekundi.

Rezultati su pokazali da podaci u većini skupina ne slijede normalnu distribuciju (Shapiro–Wilkov test, $P < 0,05$), stoga je za usporedbu korišten neparametrijski Kruskal–Wallisov test.



Slika 4.5. Vrijeme zadržavanja miševa na rotarodu: A) 2. dan nakon prestanka tretmana kuprizonom, B) 10. dan nakon prestanka tretmana kuprizonom, C) 20. dan nakon prestanka tretmana kuprizonom. Podaci su prikazani box-plot dijagramom (medijan, interkvartilni raspon, vrijednosti min-max). Statistička analiza provedena je Kruskal–Wallisovim testom uz *post hoc* Dunn-ov test (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$). 3CTRL, 6CTRL – kontrolne skupine miševa starosti 3 i 6 mjeseci; 3CPZ, 6CPZ – miševi starosti 3 i 6 mjeseci tretirani kuprizonom.

Rezultati Kruskal–Wallisovog testa pokazali su da postoje statistički značajne razlike u latenciji pada između skupina u sve tri vremenske točke (2. dan: $P < 0,05$; 10. dan: $P < 0,05$; 20. dan: $P < 0,05$). Za identifikaciju parova skupina koje se međusobno razlikuju provedena je *post hoc* Dunn-ova analiza višestrukih usporedbi. Rezultati su pokazali da su 2. i 10. dan nakon završetka tretmana miševi skupine 6CPZ imali statistički značajno kraće vrijeme zadržavanja na rotarodu u usporedbi s kontrolnom skupinom 6CTRL ($P < 0,05$) (Slika 4.5 A i B). Razlike između skupina 20. dan nisu bile statistički značajne. U skupini 3CPZ zabilježeno je smanjenje vremena zadržavanja na valjku drugog dana nakon završetka tretmana, ali razlika u odnosu na kontrolnu skupinu 3CTRL nije bila statistički značajna (Slika 4.5 C).

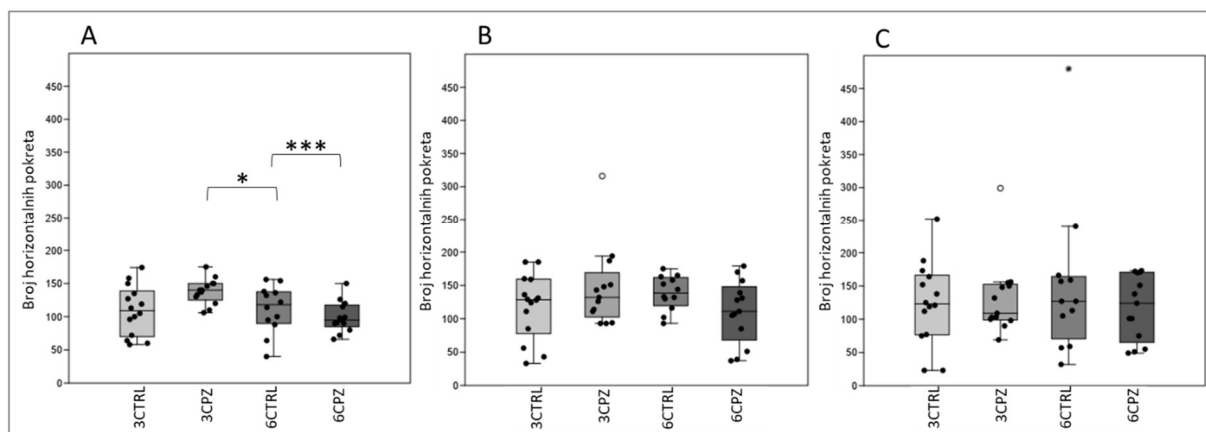
4.1.3. Test motoričke aktivnosti (*activity cage*)

Test motoričke aktivnosti u uređaju *activity cage* korišten je za procjenu spontanog kretanja miševa u tri vremenske točke nakon završetka tretmana kuprizonom. Za svaku životinju zabilježen je broj horizontalnih (kretanje po komori) i vertikalnih pokreta (uspravljanje na stražnje noge) tijekom 1 i tijekom 4 minute boravka u komori.

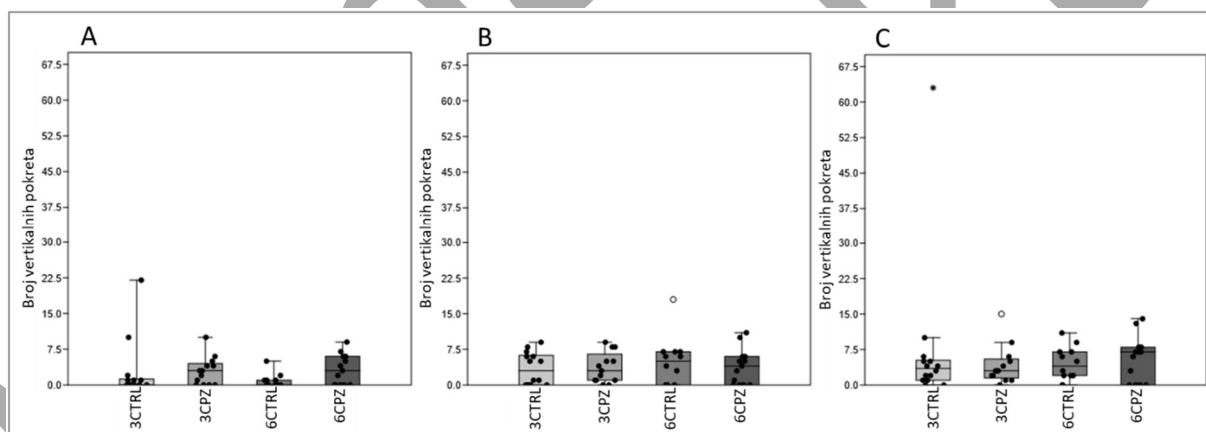
Shapiro–Wilkov test normalnosti proveden je za sve podatke dobivene u testu, odnosno za horizontalnu i vertikalnu aktivnost nakon 1 i nakon 4 minute. Rezultati su pokazali da većina podataka ne slijedi normalnu distribuciju ($P < 0,05$), stoga je za statističku analizu korišten neparametrijski Kruskal–Wallisov test uz *post hoc* Dunn-ove višestruke usporedbe.

Rezultati Kruskal–Wallis testa pokazali su statistički značajnu razliku u broju horizontalnih pokreta u prvoj minuti boravka u *activity cage*-u između skupina drugog dana nakon završetka tretmana ($P < 0,01$). *Post hoc* Dunn-ova analiza višestrukih usporedbi otkrila je da skupina 3CPZ ima značajno veći broj horizontalnih pokreta u odnosu na kontrolnu skupinu 3CTRL ($P < 0,05$) kao i u odnosu na skupinu 6CTRL ($P < 0,05$) i skupinu 6CPZ ($P < 0,001$). Razlike između 6CTRL i 6CPZ nisu bile statistički značajne (Slika 4.6 A).

Desetog dana nakon završetka tretmana Kruskal–Wallisov test nije pokazao statistički značajnu razliku u broju horizontalnih pokreta između skupina nakon jedne minute boravka u *activity cage*-u (Slika 4.6. B), kao niti dvadesetog dana nakon završetka tretmana (Slika 4.6 C).

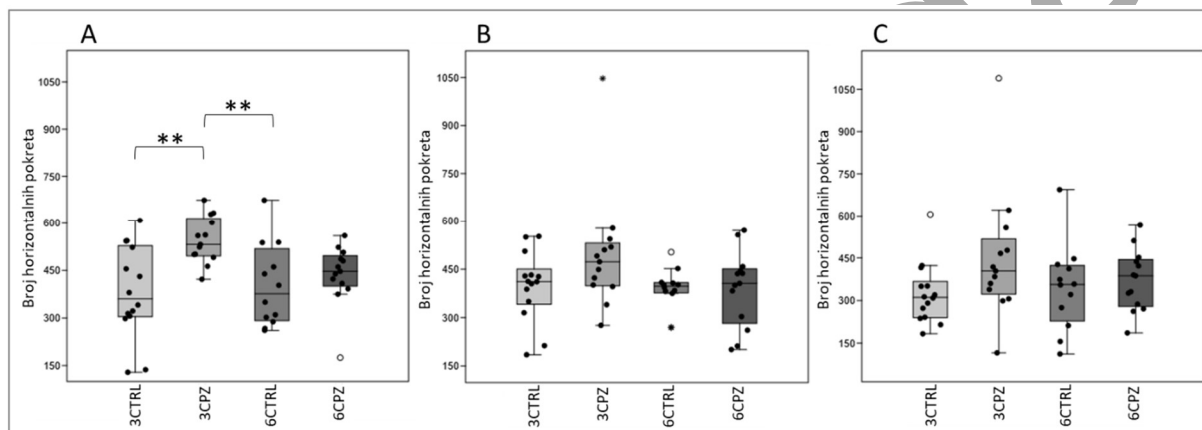


Slika 4.6. Broj horizontalnih pokreta miševa nakon 1 minute u uređaju *Activity cage*: A) 2. dan nakon prestanka tretmana kuprizonom, B) 10. dan nakon prestanka tretmana kuprizonom, C) 20. dan nakon prestanka tretmana kuprizonom. Podaci su prikazani box-plot dijagramom (medijan, interkvartilni raspon, vrijednosti min–max). Statistička analiza provedena je Kruskal–Wallisovim testom uz *post hoc* Dunn-ov test (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$). 3CTRL, 6CTRL – kontrolne skupine miševa starosti 3 i 6 mjeseci; 3CPZ, 6CPZ – miševi starosti 3 i 6 mjeseci tretirani kuprizonom.



Slika 4.7. Broj vertikalnih pokreta miševa nakon 1 minute u uređaju *Activity cage*: A) 2. dan nakon prestanka tretmana kuprizonom, B) 10. dan nakon prestanka tretmana kuprizonom, C) 20. dan nakon prestanka tretmana kuprizonom. Podaci su prikazani box-plot dijagramom (medijan, interkvartilni raspon, vrijednosti min–max). Statistička analiza provedena je Kruskal–Wallisovim testom uz *post hoc* Dunn-ov test (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$). 3CTRL, 6CTRL – kontrolne skupine miševa starosti 3 i 6 mjeseci; 3CPZ, 6CPZ – miševi starosti 3 i 6 mjeseci tretirani kuprizonom.

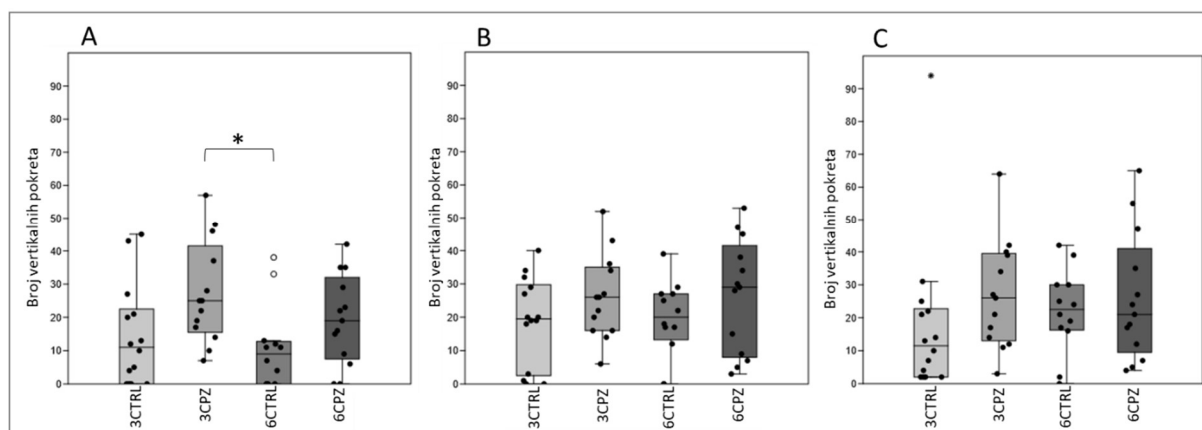
Kruskal–Wallis test nije pokazao statistički značajne razlike u broju vertikalnih pokreta među skupinama ni drugog, desetog niti dvadesetog dana nakon završetka tretmana (Slika 4.7 A-C). Broj vertikalnih pokreta bio je ujednačen među svim skupinama miševa u svim mjerenim vremenskim točkama.



Slika 4.8. Broj horizontalnih pokreta miševa nakon 4 minute u uređaju *Activity cage*: A) 2. dan nakon prestanka tretmana kuprizonom, B) 10. dan nakon prestanka tretmana kuprizonom, C) 20. dan nakon prestanka tretmana kuprizonom. Podaci su prikazani box-plot dijagramom (medijan, interkvartilni raspon, vrijednosti min–max). Statistička analiza provedena je Kruskal–Wallisovim testom uz *post hoc* Dunn-ov test (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$). 3CTRL, 6CTRL – kontrolne skupine miševa starosti 3 i 6 mjeseci; 3CPZ, 6CPZ – miševi starosti 3 i 6 mjeseci tretirani kuprizonom.

Rezultati Kruskal–Wallisovog testa pokazali su da nakon četiri minute boravka u *Activity cage*-u drugog dana nakon završetka tretmana postoji statistički značajna razlika u broju horizontalnih pokreta među skupinama ($P < 0,01$). *Post hoc* Dunn-ova analiza višestrukih usporedbi pokazala je da skupina 3CPZ ima značajno manji broj horizontalnih pokreta u usporedbi s 3CTRL ($P < 0,01$) i 6CTRL ($P < 0,01$), dok razlika između 6CPZ i 6CTRL nije bila statistički značajna (Slika 4.8 A).

Desetog dana nakon završetka tretmana, Kruskal–Wallisov test nije pokazao statistički značajne razlike u horizontalnoj aktivnosti među skupinama (Slika 4.8 B), kao niti dvadesetog dana (Slika 4.8 C).



Slika 4.9. Broj vertikalnih pokreta miševa nakon 4 minute u uređaju *Activity cage*: A) 2. dan nakon prestanka tretmana kuprizonom, B) 10. dan nakon prestanka tretmana kuprizonom, C) 20. dan nakon prestanka tretmana kuprizonom. Podaci su prikazani box-plot dijagramom (medijan, interkvartilni raspon, vrijednosti min–max). Statistička analiza provedena je Kruskal–Wallisovim testom uz *post hoc* Dunn-ov test (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$). 3CTRL, 6CTRL – kontrolne skupine miševa starosti 3 i 6 mjeseci; 3CPZ, 6CPZ – miševi starosti 3 i 6 mjeseci tretirani kuprizonom.

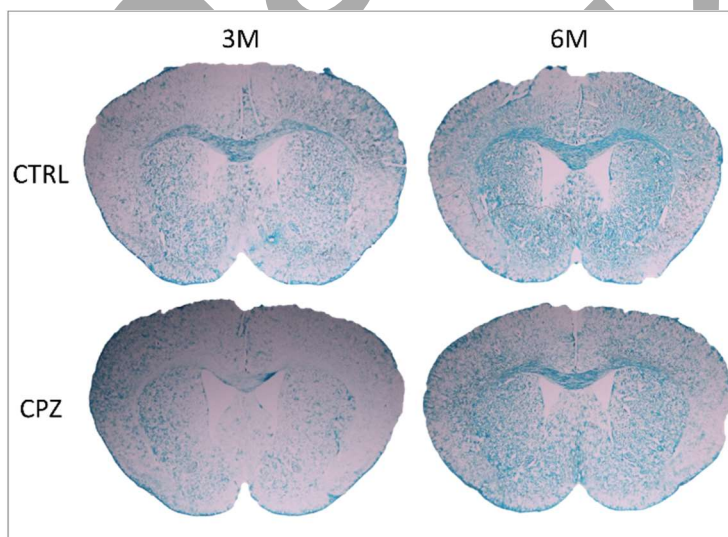
Rezultati Kruskal–Wallis testa pokazali su statistički značajnu razliku u broju vertikalnih pokreta među skupinama drugog dana nakon završetka tretmana ($P < 0,05$). *Post hoc* Dunn-ova analiza višestrukih usporedbi pokazala je da skupina 3CPZ ima značajno veći broj vertikalnih pokreta u usporedbi sa skupinom 6CPZ ($P < 0,05$). Razlike između 6CTRL i 6CPZ kao i između 3CPZ i 3CTRL nisu bile statistički značajne (Slika 4.9 A).

Desetog (Slika 4.9 B) i dvadesetog dana (Slika 4.9 C) nakon završetka tretmana nisu zabilježene statistički značajne razlike među skupinama u broju vertikalnih pokreta nakon četiri minute u *activity cage*-u.

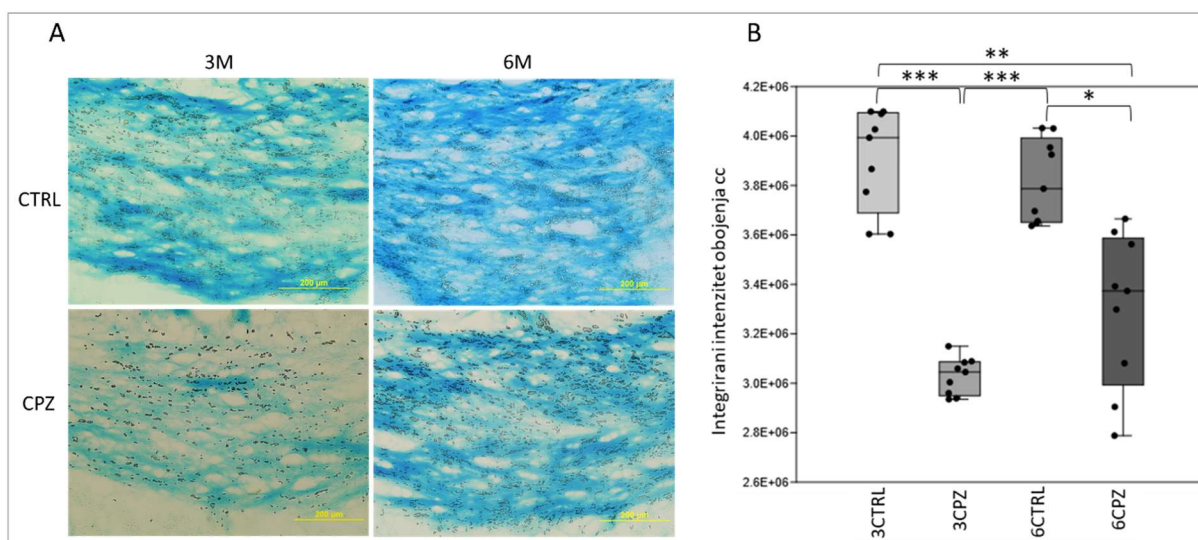
4.2. Histološka analiza (LFB)

Nakon završetka bihevioralnih testova i žrtvovanja životinja 20 dana nakon prestanka hranjenja kuprizonom, mozgovi su prikupljeni za histološku analizu. Histološka analiza LFB korištena je za procjenu opsega demijelinizacije bijele tvari te je provedena na mozgovima miševa starosti 3 i 6 mjeseci podijeljenih u četiri skupine: 3CTRL i 6CTRL (kontrolne skupine hranjene standardnom prehranom) te 3CPZ i 6CPZ (eksperimentalne skupine hranjene s hranom koja je sadržavala 0,2 % kuprizona). Iste oznake (3CTRL, 3CPZ, 6CTRL, 6CPZ) korištene su u svim prikazima rezultata.

Ovom analizom su procijenjeni prisutnost mijelina i stupanj gubitka mijelinske mase u različitim regijama mozga (Slika 4.10), uključujući cc, aca, CPu i M (Slika 3.5). Rezultati su kvantificirani mjerenjem intenziteta bojenja u definiranim regijama interesa, a dobiveni podaci su prikazani kao reprezentativne slike histoloških rezova i odgovarajući grafički prikazi kvantifikacije.

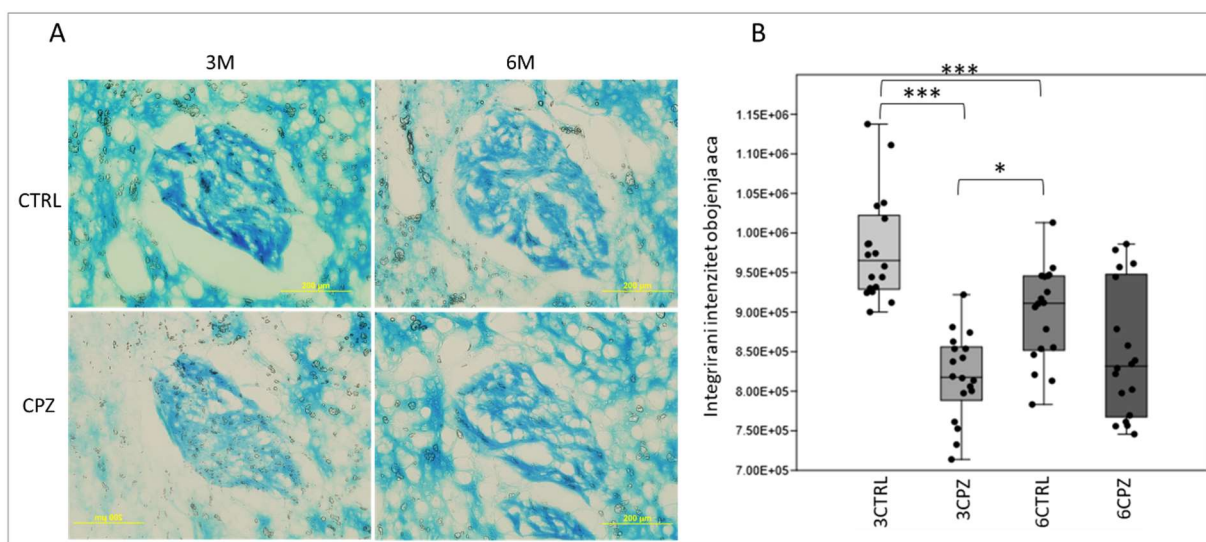


Slika 4.10. Histološko bojanje Luxol Fast Blue (LFB) prednjeg mozga miševa starih 3 (3M) i 6 mjeseci (6M). Prikazana su reprezentativna LFB bojanja u kontrolnim skupinama (CTRL) i skupinama tretiranim kuprizonom (CPZ).



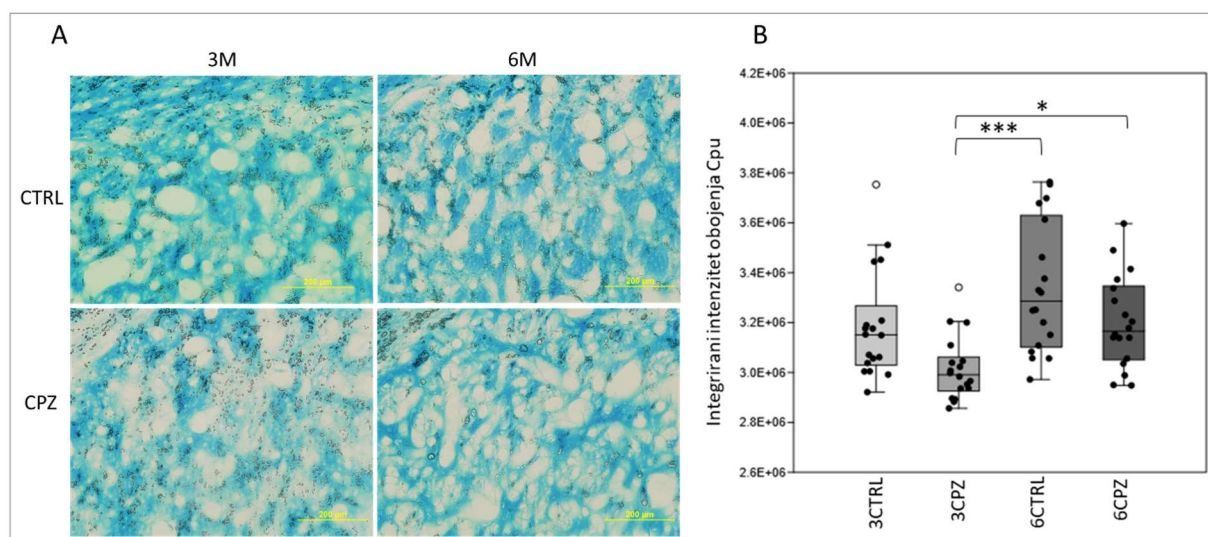
Slika 4.11. Histološka analiza mijelina u *corpus callosumu* (cc) miševa. A) Prikazana su reprezentativna Luxol Fast Blue (LFB) bojenja u kontrolnim skupinama (CTRL) i skupinama tretiranim kuprizonom (CPZ) u dobi od 3 (3M) i 6 mjeseci (6M). Skala na slikama iznosi 200 μ m. B) Grafički prikaz intenziteta bojenja LFB bojenja u cc. Podaci su prikazani box-plot dijagramom (medijan, interkvartilni raspon, vrijednosti min-max). Statistička analiza provedena je Kruskal-Wallisovim testom uz *post hoc* Dunn-ov test (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). 3CTRL, 6CTRL – kontrolne skupine miševa starosti 3 i 6 mjeseci; 3CPZ, 6CPZ – miševi starosti 3 i 6 mjeseci tretirani kuprizonom.

U kontrolnim skupinama u cc uočen je homogen i intenzivan LFB signal koji odgovara očuvanoj mijelinskoj strukturi, dok je u eksperimentalnim skupinama tretiranim kuprizonom vidljivo smanjenje intenziteta bojenja što ukazuje na gubitak mijelina (Slika 4.11 A). Kvantifikacija intenziteta LFB bojenja u cc pokazala je statistički značajnu razliku među skupinama ($P < 0,001$; Kruskal-Wallis test). *Post hoc* Dunn-ov test otkrio je značajno niže vrijednosti intenziteta bojenja u skupinama 3CPZ ($P < 0,001$) i 6CPZ ($P < 0,001$) u usporedbi s pripadajućim kontrolnim skupinama (Slika 4.11 B). Također je uočena razlika između 3CTRL i 6CPZ skupine ($P < 0,01$).



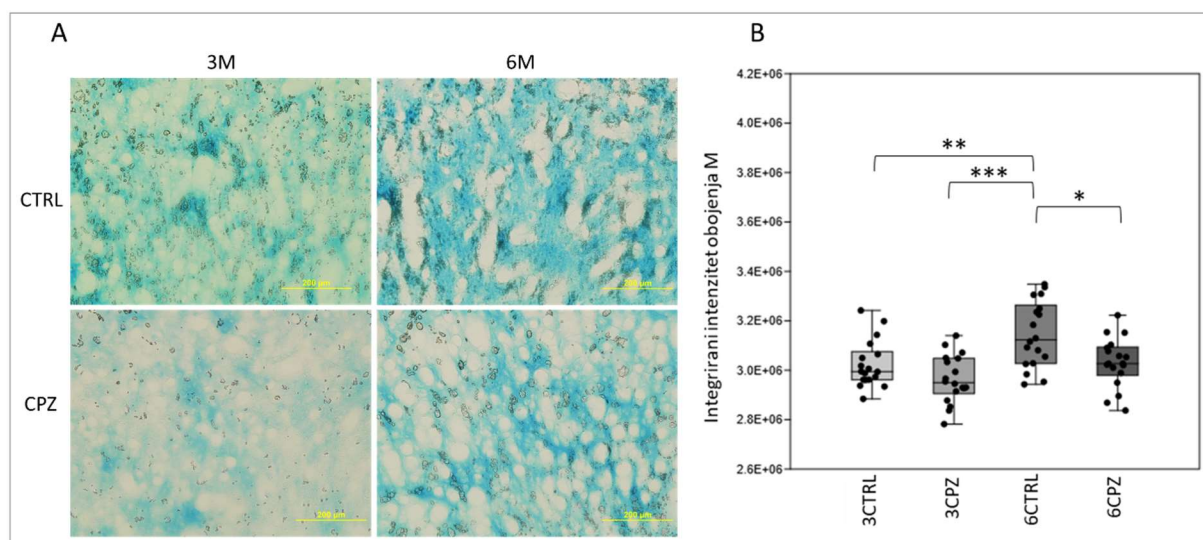
Slika 4.12. Histološka analiza mijelina u prednjoj komisuri (aca) miševa. A) Prikazana su reprezentativna Luxol Fast Blue (LFB) bojanja u kontrolnim skupinama (CTRL) i skupinama tretiranim kuprizonom (CPZ) u dobi od 3 (3M) i 6 mjeseci (6M). Skala na slikama iznosi 200 μm . B) Grafički prikaz intenziteta bojenja LFB bojenja u aca. Podaci su prikazani box-plot dijagramom (medijan, interkvartilni raspon, vrijednosti min-max). Statistička analiza provedena je Kruskal-Wallisovim testom uz *post hoc* Dunn-ov test (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$). 3CTRL, 6CTRL – kontrolne skupine miševa starosti 3 i 6 mjeseci; 3CPZ, 6CPZ – miševi starosti 3 i 6 mjeseci tretirani kuprizonom.

Analizom moždane strukture aca opaženo je smanjenje intenziteta bojenja u skupinama tretiranim kuprizonom (3CPZ i 6CPZ) u odnosu na kontrolne skupine, što ukazuje na određeni stupanj demijelinizacije (Slika 4.12 A). Statistička analiza intenziteta LFB bojenja pokazala je značajne razlike između skupina ($P < 0,001$; Kruskal-Wallis test). *Post hoc* Dunn-ov test potvrdio je značajno niži intenzitet bojenja u skupini 3CPZ u usporedbi s 3CTRL ($P < 0,001$) te između 3CPZ i 6CTRL ($P < 0,001$). Osim toga, utvrđena je značajna razlika i između skupina 6CTRL i 6CPZ ($P < 0,05$) (Slika 4.12 B).



Slika 4.13. Histološka analiza mijelina u strijatumu (CPu) miševa. A) Prikazana su reprezentativna Luxol Fast Blue (LFB) bojanja u kontrolnim skupinama (CTRL) i skupinama tretiranim kuprizonom (CPZ) 3 (3M) i 6 (6M) starosti. Skala na slikama iznosi 200 μm. B) Grafički prikaz intenziteta bojenja LFB bojanja u Cpu. Podaci su prikazani box-plot dijagramom (medijan, interkvartilni raspon, vrijednosti min–max). Statistička analiza provedena je Kruskal–Wallisovim testom uz *post hoc* Dunn-ov test (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$). 3CTRL, 6CTRL – kontrolne skupine miševa starosti 3 i 6 mjeseci; 3CPZ, 6CPZ – miševi starosti 3 i 6 mjeseci tretirani kuprizonom.

Analizom regije CPu vidljivo je smanjenje intenziteta LFB bojenja u eksperimentalnim skupinama tretiranim kuprizonom (3CPZ i 6CPZ) u usporedbi s kontrolnim skupinama, što može ukazivati na promjene u mijelinskoj građi (Slika 4.13 A). Statistička analiza pokazala je značajne razlike između skupina ($P < 0,001$; Kruskal–Wallis test). *Post hoc* Dunn-ov test potvrdio je značajno niži intenzitet bojenja u skupini 3CPZ u usporedbi s 6CTRL ($P < 0,001$), kao i razliku između 6CTRL i 6CPZ ($P < 0,05$) (Slika 4.13 B).



Slika 4.14. Histološka analiza mijelina u motoričkoj kori (M) miševa. A) Prikazana su reprezentativna Luxol Fast Blue (LFB) bojanja u kontrolnim skupinama (CTRL) i skupinama tretiranim kuprizonom (CPZ) u dobi od 3 (3M) i 6 mjeseci (6M). Skala na slikama iznosi 200 μ m. B) Grafički prikaz intenziteta bojenja LFB bojanja u M miševa. Podaci su prikazani box-plot dijagramom (medijan, interkvartilni raspon, vrijednosti min-max). Statistička analiza provedena je jednofaktorskom ANOVA s Tukeyevim *post hoc* testom (* $P < 0,05$; *** $P < 0,01$; **** $P < 0,001$). 3CTRL, 6CTRL – kontrolne skupine miševa starosti 3 i 6 mjeseci; 3CPZ, 6CPZ – miševi starosti 3 i 6 mjeseci tretirani kuprizonom.

U M eksperimentalnih skupina tretiranih kuprizonom (3CPZ i 6CPZ) opaža se blago smanjenje intenziteta bojenja u odnosu na kontrole (Slika 4.14 A). Statistička analiza (jednofaktorska ANOVA) pokazala je postojanje značajnih razlika među skupinama ($P < 0,001$). Tukeyev *post hoc* test otkrio je značajno niži intenzitet bojenja u skupini 3CPZ u usporedbi s 3CTRL ($P < 0,01$) i 6CTRL ($P < 0,001$), te razliku između 6CTRL i 6CPZ ($P < 0,05$) (Slika 4.14 B).

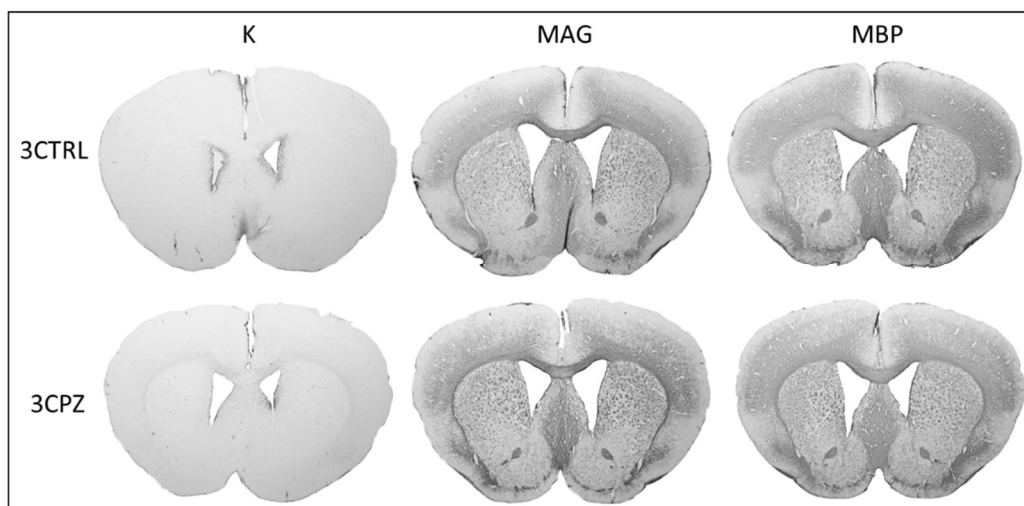
4.3. Rezultati imunohistokemijske analize

Nakon završetka tretmana i provedbe bihevioralnih testova, životinje su žrtvovane 20 dana nakon prestanka hranjenja kuprizonom, a njihovi mozgovi prikupljeni i obrađeni za imunohistokemijsku analizu. Analiza je provedena na istim skupinama miševa kao i histološka LFB analiza te su iste oznake (3CTRL, 3CPZ, 6CTRL, 6CPZ) korištene u svim prikazima rezultata.

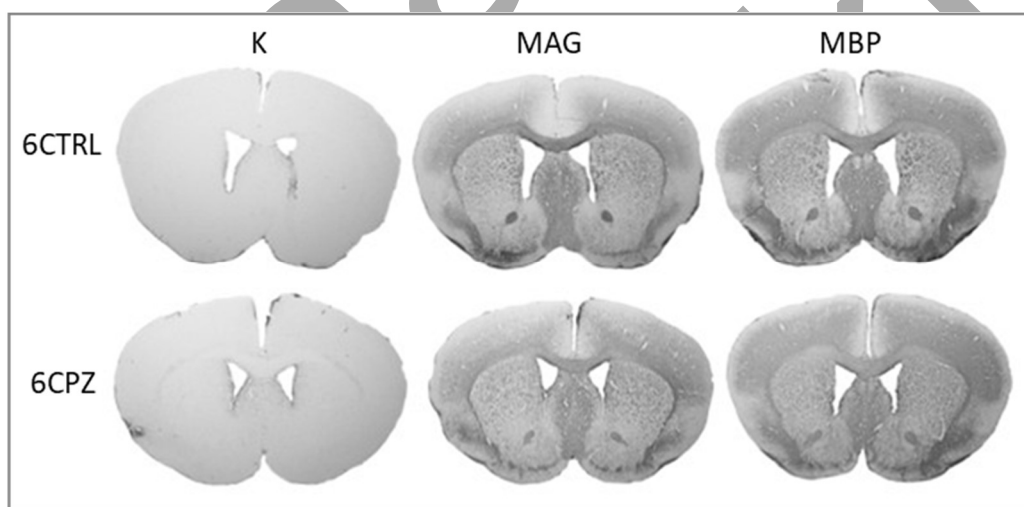
Imunohistokemijska bojanja su napravljena na kriostatskim rezovima moždanog tkiva radi detaljnije procjene učinka kuprizona na mijelinsku strukturu. Korištena su primarna protutijela na mijelinske proteine (MBP, MAG), kompleksne gangliozide (GM1, GD1a, GD1b, GT1b). Kvantifikacija je napravljena mjerenjem integriranog intenziteta imunohistokemijskog bojanja u četiri regije prednjeg mozga miševa: cc, aca, CPu i M. Rezultati su prikazani kao reprezentativne slike imunohistokemijskih bojanja i grafički prikazi kvantifikacije.

4.3.1. Markeri mijelina (MAG i MBP)

Za procjenu promjena u mijelinskoj strukturi nakon izlaganja kuprizonu provedena je imunohistokemijska analiza bojenja na mijelinske proteine MAG i MBP (Slika 4.15 i Slika 4.16). Kvantifikacija je napravljena mjerenjem integriranog intenziteta bojenja (InvIntDen) u analiziranim moždanim regijama. Dobiveni rezultati su najprije testirani na normalnost distribucije pomoću Shapiro–Wilkovog testa. Ovisno o ishodu testa normalnosti, za usporedbu između skupina primijenjena je jednofaktorska analiza varijance (ANOVA) uz Tukeyjev *post hoc* test ili, u slučajevima odstupanja od normalne distribucije, neparametrijski Kruskal–Wallis test uz Dunnovu korekciju za višestruke usporedbe.



Slika 4.15. Imunohistokemijska analiza mijelinskih proteina miševa starih 3 mjeseca. Prikazana su reprezentativna bojanja za MAG i MBP u kontrolnoj skupini (3CTRL) i skupini tretiranoj kuprizonom (3CPZ). Negativna kontrola (K) prikazuje odsutnost specifičnog bojenja u nedostatku primarnog protutijela.

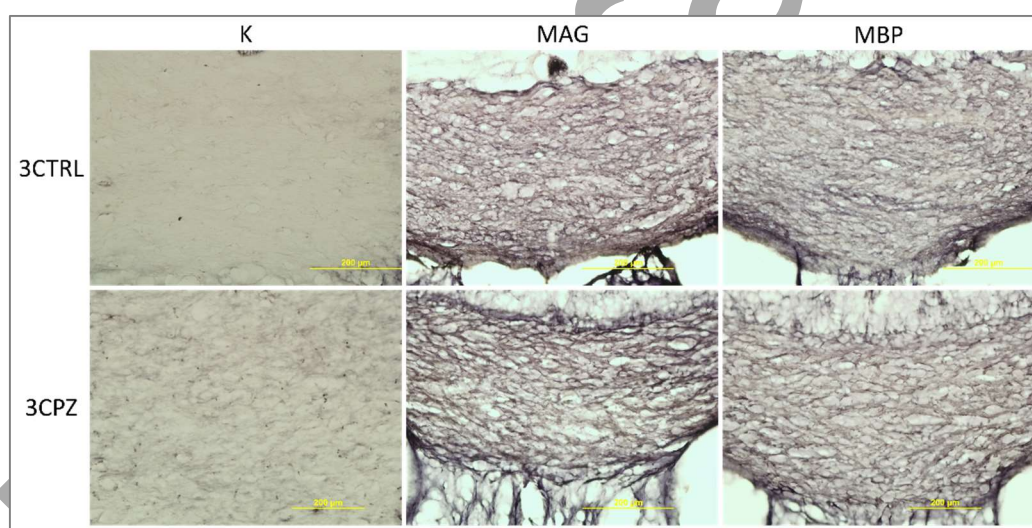


Slika 4.16. Imunohistokemijska analiza mijelinskih proteina miševa starih 6 mjeseci. Prikazana su reprezentativna bojanja za MAG i MBP u kontrolnoj skupini (6CTRL) i skupini tretiranoj kuprizonom (6CPZ). Negativna kontrola (K) prikazuje odsutnost specifičnog bojenja u nedostatku primarnog protutijela.

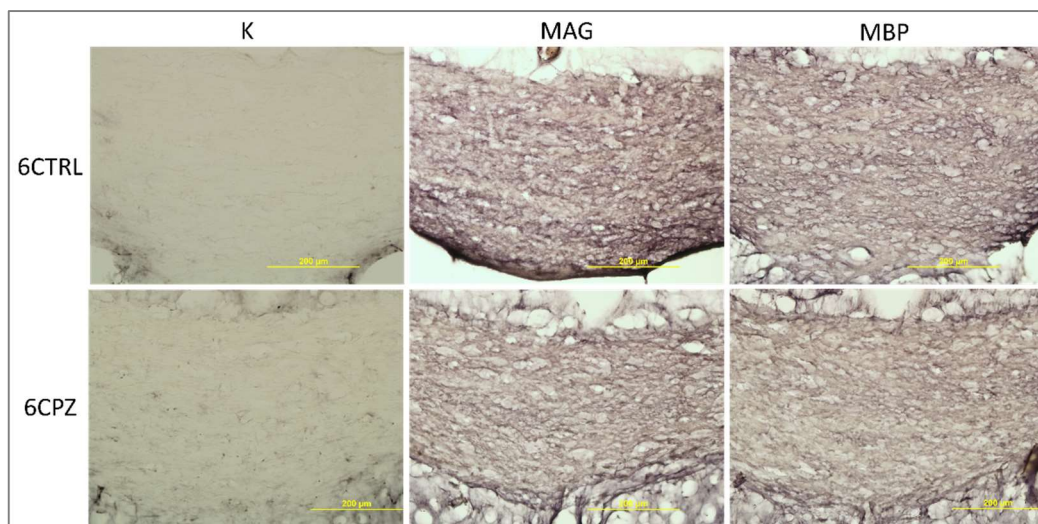
4.3.1.1. Izražaj mijelinskih proteina u cc

Shapiro–Wilkov test pokazao je da podaci za MAG slijede normalnu distribuciju dok su podaci za MBP odstupali od normalne distribucije. Prema tome je za analizu MAG-a primijenjena jednofaktorska ANOVA, a za analizu MBP-a je korišten neparametrijski Kruskal–Wallisov test.

Na rezovima prednjeg mozga u razini cc (Slika 4.17 i Slika 4.18) uočen je smanjen intenzitet bojenja za oba mijelinska proteina u skupinama tretiranim kuprizonom u cc starijih životinja (6 mjeseci).



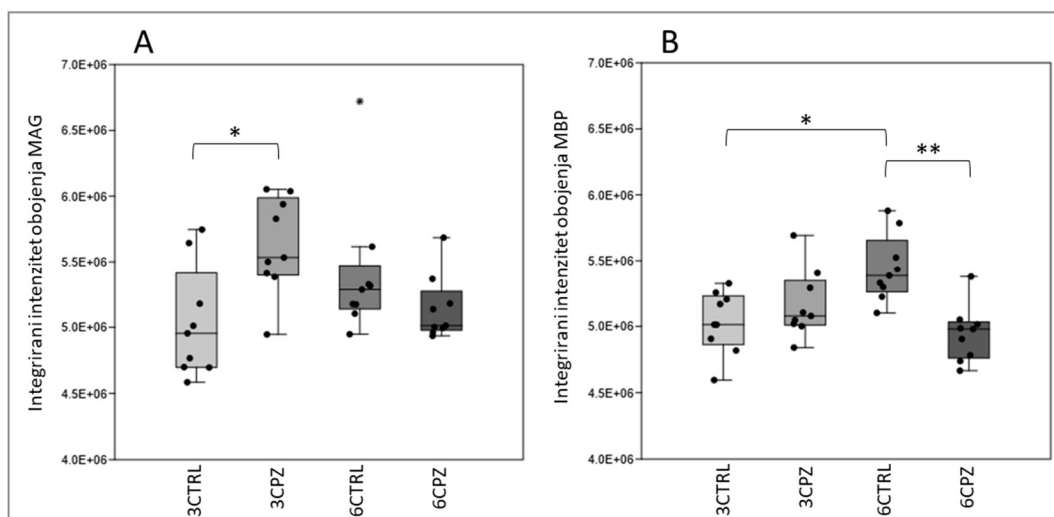
Slika 4.17. Imunohistokemijska analiza mijelinskih proteina u *corpus callosumu* (cc) miševa starih 3 mjeseca. Prikazana su reprezentativna bojanja za MAG i MBP u kontrolnoj skupini (3CTRL) i skupini tretiranoj kuprizonom (3CPZ). Negativna kontrola (K) prikazuje odsutnost specifičnog bojenja u nedostatku primarnog protutijela. Skala na slikama iznosi 200 µm.



Slika 4.18. Imunohistokemijska analiza mijelinskih proteina u *corpus callosumu* (cc) miševa starih 6 mjeseci. Prikazana su reprezentativna bojanja za MAG i MBP u kontrolnoj skupini (6CTRL) i skupini tretiranoj kuprizonom (6CPZ). Negativna kontrola (K) prikazuje odsutnost specifičnog bojenja u nedostatku primarnog protutijela. Skala na slikama iznosi 200 µm.

Rezultati ANOVA analize pokazali su značajnu razliku u izražaju MAG-a među skupinama ($P < 0,01$). *Post hoc* Tukeyjev test potvrdio je značajno niži intenzitet bojenja u 6CPZ u odnosu na 6CTRL ($P < 0,01$) i 3CTRL ($P < 0,05$) (Slika 4.19 A).

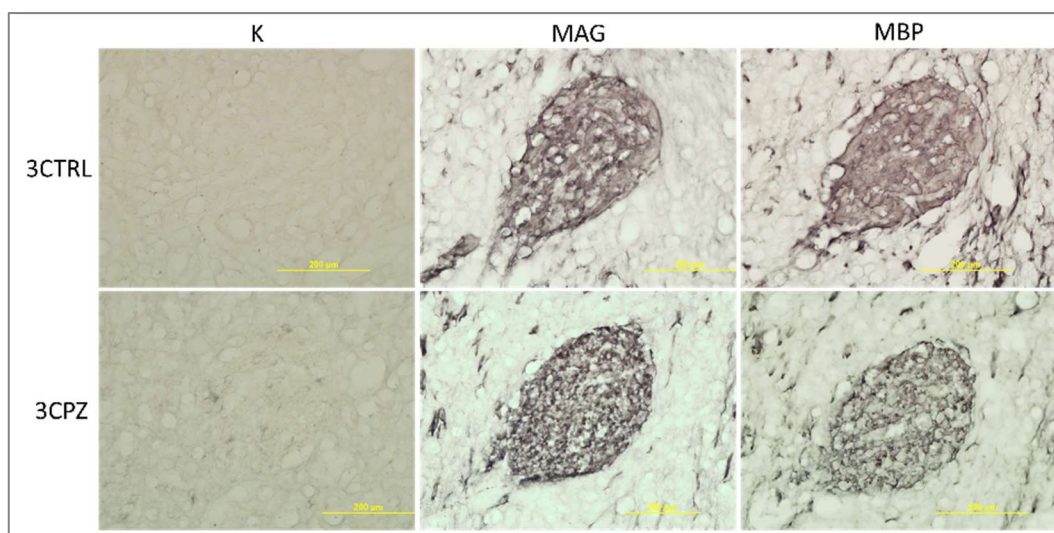
Za MBP, Kruskal–Wallisov test pokazao je statistički značajnu razliku među skupinama ($P < 0,01$). *Post hoc* Dunnova analiza višestrukih usporedbi otkrila je značajno niži intenzitet bojenja u skupini 3CPZ u odnosu na 3CTRL ($P < 0,05$), te u 6CPZ u odnosu na 6CTRL ($P < 0,01$) (Slika 4.19 B).



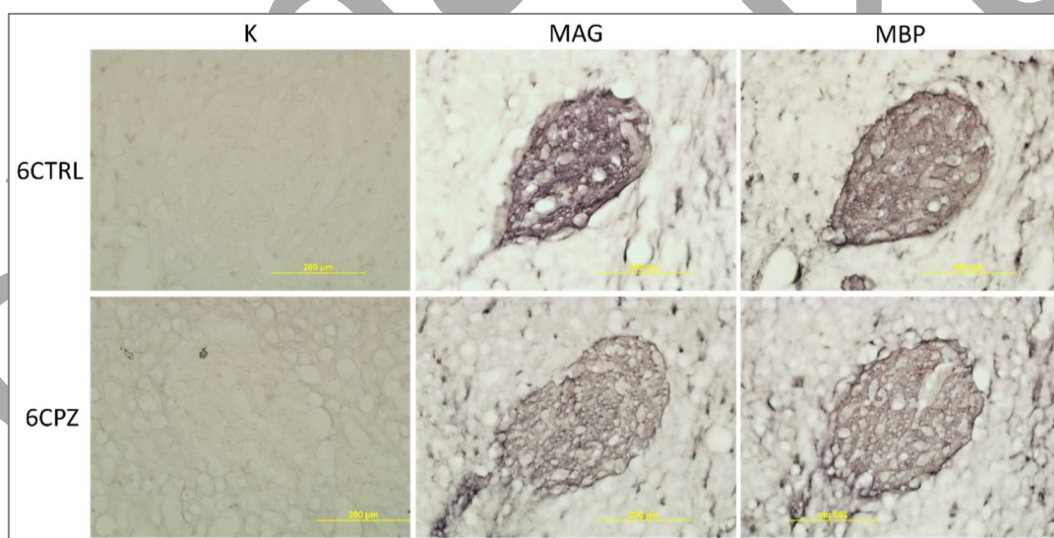
Slika 4.19. Grafički prikaz intenziteta bojenja mijelinskih proteina MAG (A) i MBP (B) u *corpus callosumu* (cc) miševa. Podaci su prikazani box-plot dijagramom (medijan, interkvartilni raspon, vrijednosti min-max). Statistička analiza provedena je Kruskal-Wallisovim testom uz *post hoc* Dunn-ov test ili jednofaktorskom ANOVA s Tukeyevim *post hoc* testom (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$). 3CTRL, 6CTRL – kontrolne skupine miševa starosti 3 i 6 mjeseci; 3CPZ, 6CPZ – miševi starosti 3 i 6 mjeseci tretirani kuprizonom.

4.3.1.2. Izražaj mijelinskih proteina u aca

Prije statističke usporedbe intenziteta bojenja u prednjoj komisuri provedena je provjera normalnosti distribucije. Dobiveni rezultati ukazali su na to da MAG slijedi normalnu distribuciju, dok MBP pokazuje odstupanja. Stoga je MAG analiziran jednofaktorskom ANOVA-om, a MBP neparametrijskim Kruskal-Wallisovim testom. Na rezovima prednje komisure (Slika 4.20 i 4.21) uočen je smanjen intenzitet bojenja MBP-a u obje dobne skupine, dok je MAG smanjen samo kod starijih životinja (6 mjeseci).



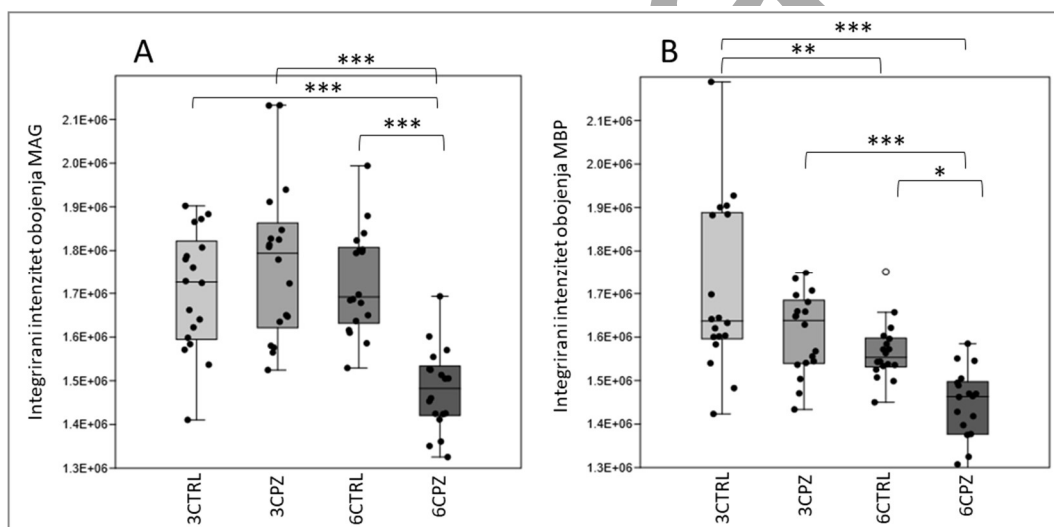
Slika 4.20. Imunohistokemijska analiza mijelinskih proteina u prednjoj komisuri (aca) miševa starih 3 mjeseca. Prikazana su reprezentativna bojanja za MAG i MBP u kontrolnoj skupini (3CTRL) i skupini tretiranoj kuprizonom (3CPZ). Negativna kontrola (K) prikazuje odsutnost specifičnog bojenja u nedostatku primarnog protutijela. Skala na slikama iznosi 200 µm.



Slika 4.21. Imunohistokemijska analiza mijelinskih proteina u prednjoj komisuri (aca) miševa starih 6 mjeseci. Prikazana su reprezentativna bojanja za MAG i MBP u kontrolnoj skupini (6CTRL) i skupini tretiranoj kuprizonom (6CPZ). Negativna kontrola (K) prikazuje odsutnost specifičnog bojenja u nedostatku primarnog protutijela. Skala na slikama iznosi 200 µm.

Rezultati analize ANOVA pokazali su značajnu razliku u izražaju MAG-a među skupinama ($P < 0,01$). *Post hoc* Tukeyjev test potvrdio je značajno niži intenzitet bojenja u skupini 6CPZ u odnosu na 6CTRL ($P < 0,01$) i 3CTRL ($P < 0,05$) (Slika 4.22 A).

Za MBP, Kruskal–Wallis test je pokazao statistički značajnu razliku među skupinama ($P < 0,01$). *Post hoc* Dunnova analiza višestrukih usporedbi otkrila je značajno niži intenzitet bojenja u skupini 3CPZ u odnosu na 3CTRL ($P < 0,05$), te u skupini 6CPZ u odnosu na 6CTRL ($P < 0,01$) (Slika 4.22 B).

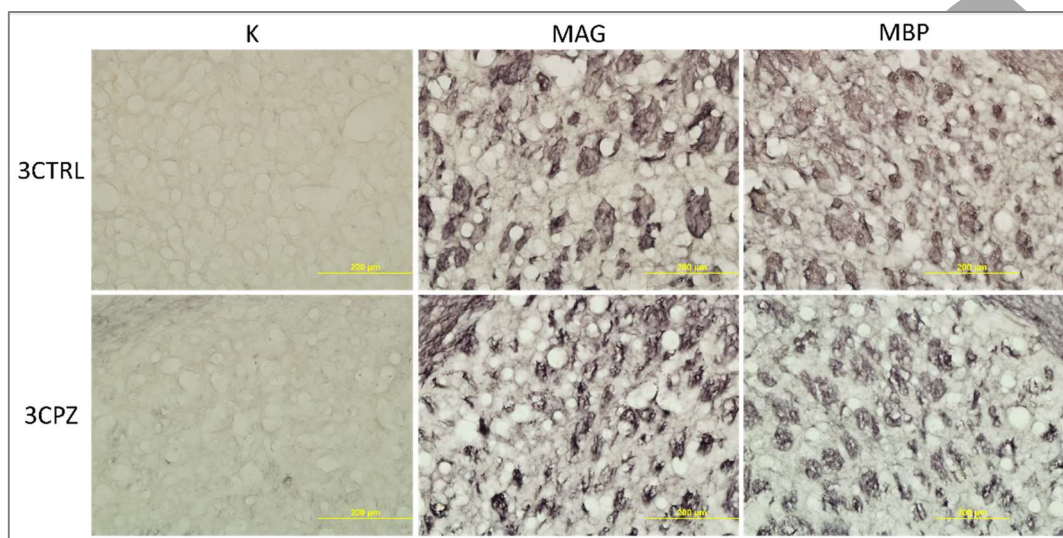


Slika 4.22. Grafički prikaz intenziteta bojenja mijelinskih proteina MAG (A) i MBP (B) u prednjoj komisuri (aca) miševa. Podaci su prikazani box–plot dijagramom (medijan, interkvartilni raspon, vrijednosti min–max). Statistička analiza provedena je Kruskal–Wallisovim testom uz *post hoc* Dunnov test ili jednofaktorskom ANOVA s Tukeyevim *post hoc* testom (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,00$). 3CTRL, 6CTRL – kontrolne skupine miševa starosti 3 i 6 mjeseci; 3CPZ, 6CPZ – miševi starosti 3 i 6 mjeseci tretirani kuprizonom.

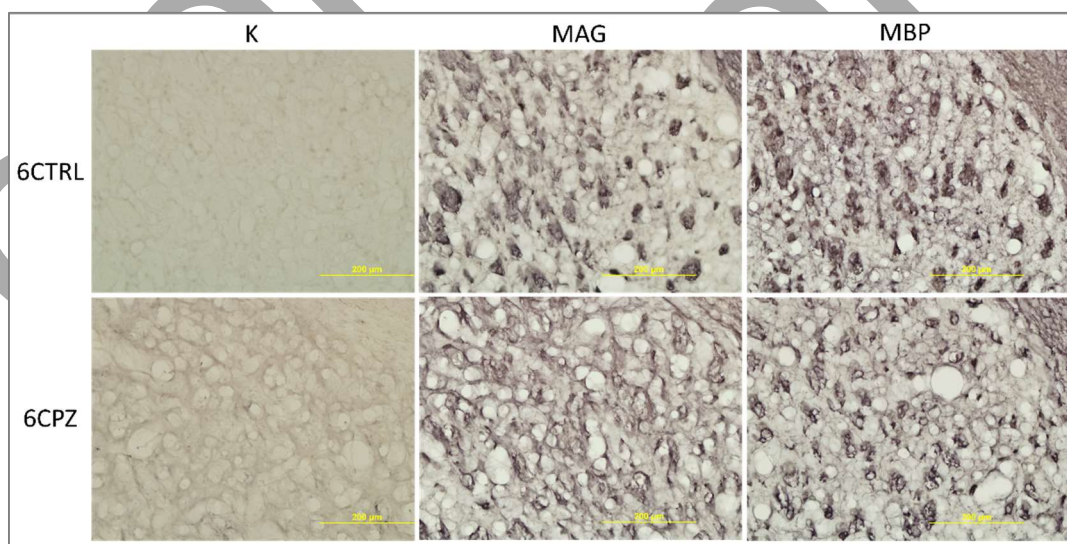
4.3.1.3. Izražaj mijelinskih proteina u Cpu

Shapiro–Wilkov test pokazao je da podaci za MAG odstupaju od normalne distribucije, dok su podaci za MBP imali približno normalnu distribuciju. U skladu s tim, analiza MAG-a provedena je neparametrijskim Kruskal–Wallis testom, dok je za MBP korištena jednofaktorska ANOVA.

Na reprezentativnim presjecima striatuma (Slika 4.23 i Slika 4.24) zamjetno je smanjenje intenziteta bojenja za MAG u skupini 6 mjeseci starosti dok je MBP približno jednakog intenziteta u obje dobne skupine.



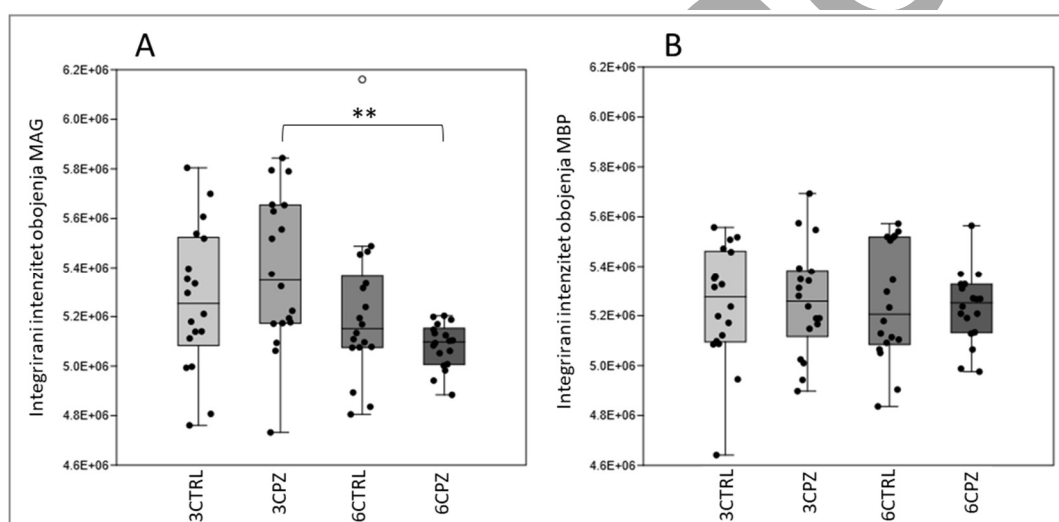
Slika 4.23. Imunohistokemijska analiza mijelinskih proteina u strijatumu (CPu) miševa starih 3 mjeseca. Prikazana su reprezentativna bojanja za MAG i MBP u kontrolnoj skupini (3CTRL) i skupini tretiranoj kuprizonom (3CPZ). Negativna kontrola (K) prikazuje odsutnost specifičnog bojenja u nedostatku primarnog protutijela. Skala na slikama iznosi 200 µm.



Slika 4.24. Imunohistokemijska analiza mijelinskih proteina u strijatumu (CPu) miševa starih 6 mjeseci. Prikazana su reprezentativna bojanja za MAG i MBP u kontrolnoj skupini (6CTRL) i skupini tretiranoj kuprizonom (6CPZ). Negativna kontrola (K) prikazuje odsutnost specifičnog bojenja u nedostatku primarnog protutijela. Skala na slikama iznosi 200 µm.

Rezultati Kruskal–Wallisovog testa za MAG pokazali su značajnu razliku među skupinama ($P < 0,05$). *Post hoc* Dunn-ova analiza višestrukih usporedbi otkrila je značajno niži intenzitet bojenja u skupini 6CPZ u odnosu na 6CTRL ($P < 0,05$) (Slika 4.25 A).

Analiza ANOVA za MBP pokazala je također statistički značajnu razliku ($P < 0,01$). Tukeyjev *post hoc* test potvrdio je smanjen intenzitet bojenja u 3CPZ u odnosu na 3CTRL ($P < 0,05$), te u 6CPZ u odnosu na 6CTRL ($P < 0,01$) (Slika 4.25 B).

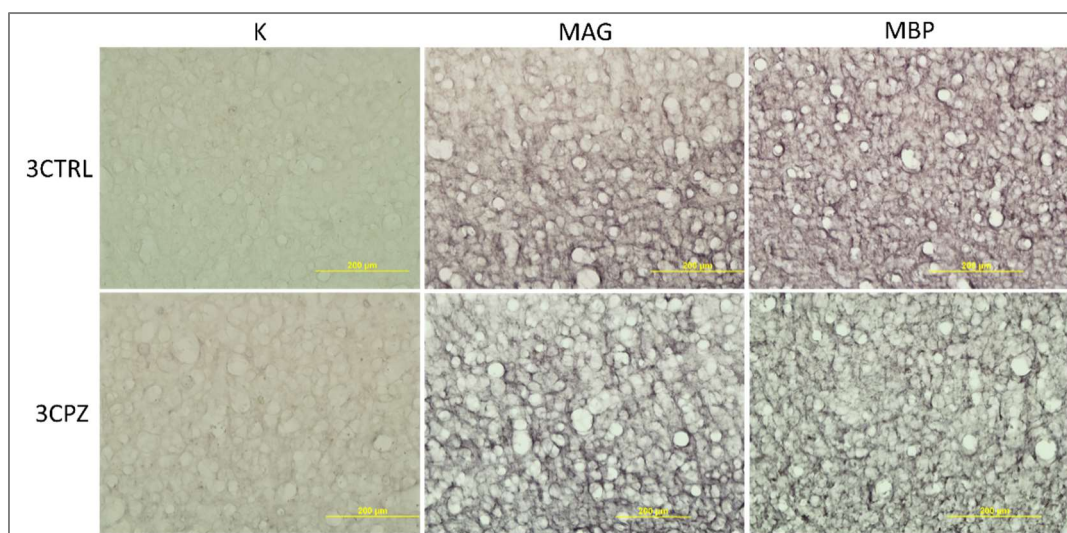


Slika 4.25. Grafički prikaz intenziteta bojenja mijelinskih proteina MAG (A) i MBP (B) u strijatumu (CPu) miševa. Podaci su prikazani box–plot dijagramom (medijan, interkvartilni raspon, vrijednosti min–max). Statistička analiza provedena je Kruskal–Wallisovim testom uz *post hoc* Dunn-ov test ili jednofaktorskom ANOVA s Tukeyevim *post hoc* testom (** $P < 0,01$). 3CTRL, 6CTRL – kontrolne skupine miševa starosti 3 i 6 mjeseci; 3CPZ, 6CPZ – miševi starosti 3 i 6 mjeseci tretirani kuprizonom.

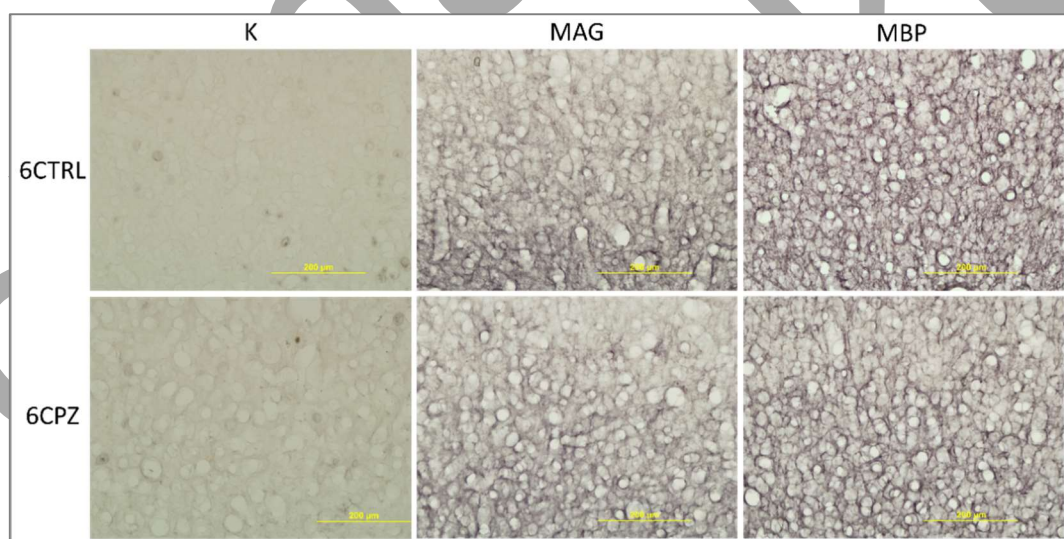
4.3.1.4. Izražaj mijelinskih proteina u M

Normalnost distribucije podataka prvo je ispitana Shapiro–Wilkovim testom, koji je pokazao da oba mijelinska proteina (MAG i MBP) prate normalnu distribuciju i zbog toga je za daljnju analizu korištena jednofaktorska ANOVA.

Na rezovima prednjeg mozga u razini M (Slika 4.26 i Slika 4.27) nije uočena razlika u intenzitetu obojenja niti na jedan mijelinski marker u obje dobne skupine.



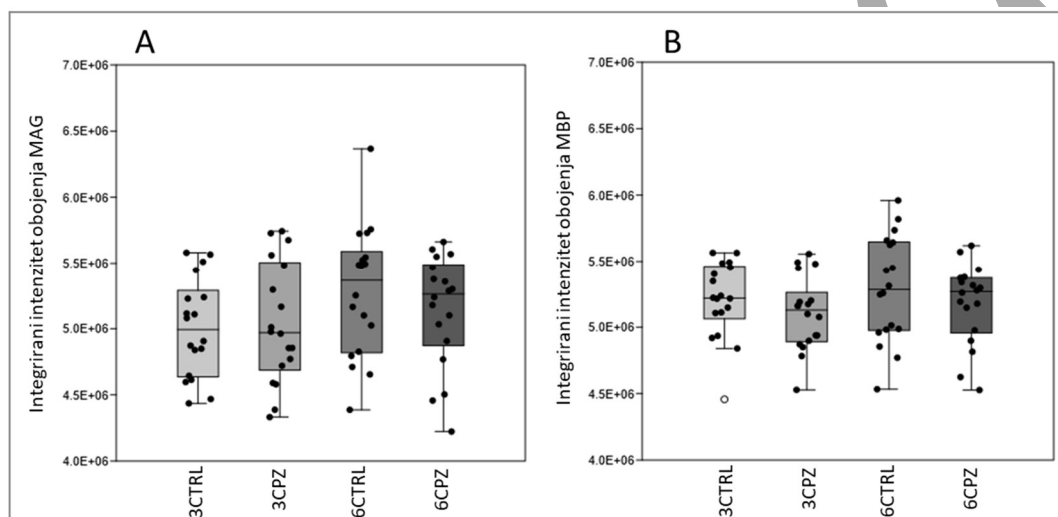
Slika 4.26. Imunohistokemijska analiza mijelinskih proteina u motoričkoj kori (M) miševa starih 3 mjeseca. Prikazana su reprezentativna bojanja za MAG i MBP u kontrolnoj skupini (3CTRL) i skupini tretiranoj kuprizonom (3CPZ). Negativna kontrola (K) prikazuje odsutnost specifičnog bojenja u nedostatku primarnog protutijela. Skala na slikama iznosi 200 µm.



Slika 4.27. Imunohistokemijska analiza mijelinskih proteina u motoričkoj kori (M) miševa starih 6 mjeseci. Prikazana su reprezentativna bojanja za MAG i MBP u kontrolnoj skupini (6CTRL) i skupini tretiranoj kuprizonom (6CPZ). Negativna kontrola (K) prikazuje odsutnost specifičnog bojenja u nedostatku primarnog protutijela. Skala na slikama iznosi 200 µm.

Analizom pomoću ANOVA-e nije pokazana statistički značajna razlika u intenzitetu obojenja MAG među analiziranim skupinama (Slika 4.28 A).

Iako se uočava smanjenje izražaja MBP-a u miševa tretiranih kuprizonom u obje dobne skupine, statističkim testom nije dobivena značajna razlika u usporedbi sa odgovarajućim kontrolama (Slika 4.28 B).

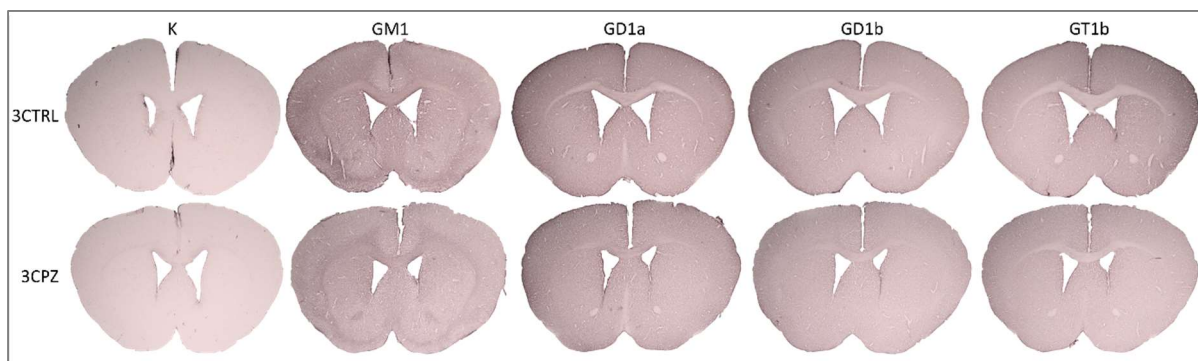


Slika 4.28. Grafički prikaz intenziteta bojenja mijelinskih proteina MAG (A) i MBP (B) u motoričkoj kori (M) miševa. Podaci su prikazani box–plot dijagramom (medijan, interkvartilni raspon, vrijednosti min–max). Statistička analiza provedena je Kruskal–Wallisovim testom uz *post hoc* Dunn-ov test ili jednofaktorskom ANOVA s Tukeyevim *post hoc* testom. 3CTRL, 6CTRL – kontrolne skupine miševa starosti 3 i 6 mjeseci; 3CPZ, 6CPZ – miševi starosti 3 i 6 mjeseci tretirani kuprizonom.

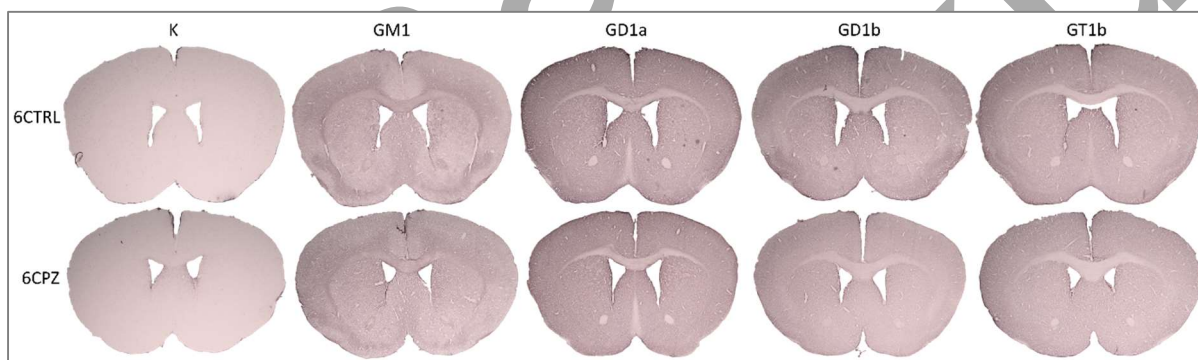
4.3.2. Gangliozi

Kako bi se ispitala promjena distribucije i ekspresije kompleksnih gangliozi nakon izlaganja kuprizonu, provedena je imunohistokemijska analiza bojenja za GM1, GD1a, GD1b i GT1b (Slika 4.29. i Slika 4.30.). Kvantifikacija je napravljena mjerenjem integriranog intenziteta bojenja (InvIntDen) u svakoj analiziranoj moždanoj regiji, a dobiveni rezultati su najprije testirani na normalnost distribucije pomoću Shapiro–Wilkovog testa. Ovisno o distribuciji, za usporedbu između skupina korištena je jednofaktorska analiza varijance (One-way ANOVA)

uz Tukey *post hoc* test ili neparametrijski Kruskal–Wallis test uz Dunnovu korekciju za višestruke usporedbe.



Slika 4.29. Imunohistokemijska analiza kompleksnih gangliozida miševa starih 3 mjeseca. Prikazana su reprezentativna bojanja za GM1, GD1a, GD1b i GT1b u kontrolnoj skupini (3CTRL) i skupini tretiranoj kuprizonom (3CPZ). Negativna kontrola (K) prikazuje odsutnost specifičnog bojenja u nedostatku primarnog protutijela.

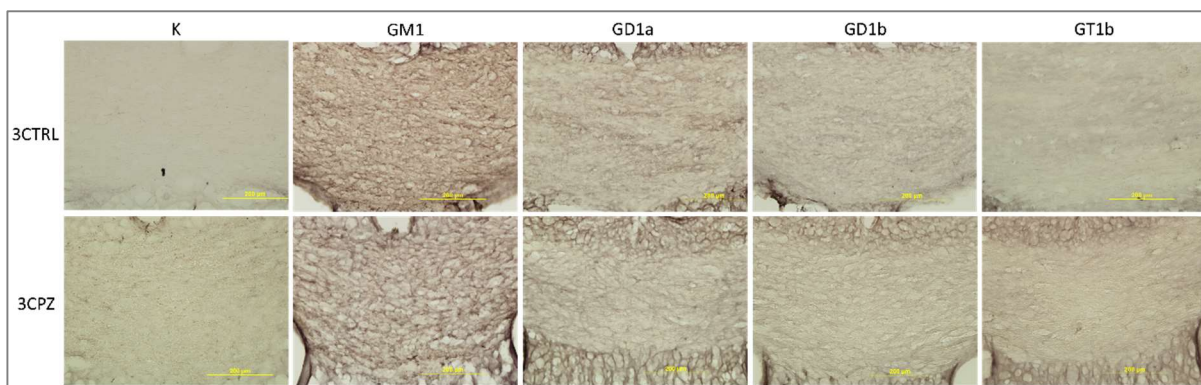


Slika 4.30. Imunohistokemijska analiza kompleksnih gangliozida miševa starih 6 mjeseca. Prikazana su reprezentativna bojanja za GM1, GD1a, GD1b i GT1b u kontrolnoj skupini (6CTRL) i skupini tretiranoj kuprizonom (6CPZ). Negativna kontrola (K) prikazuje odsutnost specifičnog bojenja u nedostatku primarnog protutijela.

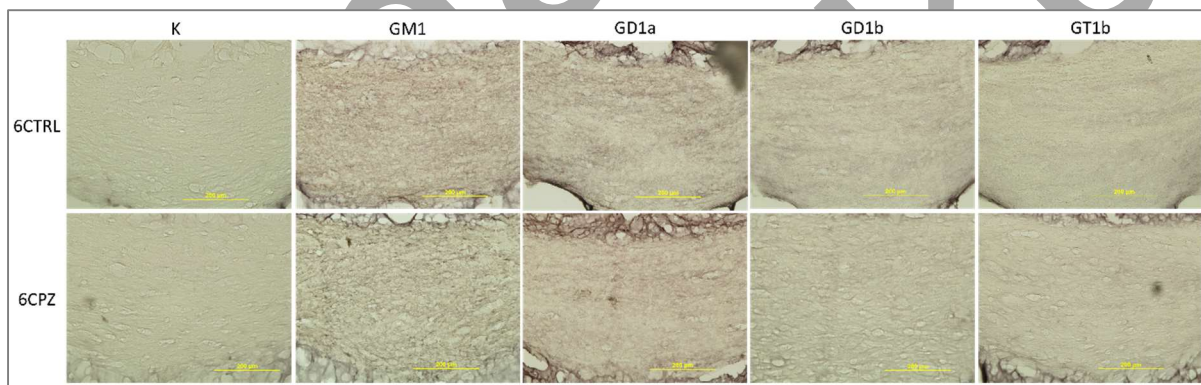
4.3.2.1. Izražaj gangliozida u cc

Prije usporedbe intenziteta imunohistokemijskog bojenja (Slika 4.31 i Slika 4.32) između skupina, podaci su za svaki od četiri gangliozida (GM1, GD1a, GD1b, GT1b) testirani na normalnost distribucije pomoću Shapiro–Wilkovog testa. Rezultati su pokazali da podaci za GM1 i GD1a ne slijede normalnu distribuciju, dok su podaci za GD1b i GT1b imali normalnu

distribuciju. U skladu s navedenim, za analizu izražaja GM1 i GD1a je korišten neparametrijski Kruskal–Wallis test, dok je za GD1b i GT1b korištena jednofaktorska ANOVA.



Slika 4.31. Imunohistokemijska analiza kompleksnih gangliozida u *corpus callosumu* (cc) miševa starih 3 mjeseca. Prikazana su reprezentativna bojanja za GM1, GD1a, GD1b i GT1b u kontrolnoj skupini (3CTRL) i skupini tretiranoj kuprizonom (3CPZ). Negativna kontrola (K) prikazuje odsutnost specifičnog bojenja u nedostatku primarnog protutijela. Skala na slikama iznosi 200 µm.



Slika 4.32. Imunohistokemijska analiza kompleksnih gangliozida u *corpus callosumu* (cc) miševa starih 6 mjeseca. Prikazana su reprezentativna bojanja za GM1, GD1a, GD1b i GT1b u kontrolnoj skupini (6CTRL) i skupini tretiranoj kuprizonom (6CPZ). Negativna kontrola (K) prikazuje odsutnost specifičnog bojenja u nedostatku primarnog protutijela. Skala na slikama iznosi 200 µm.

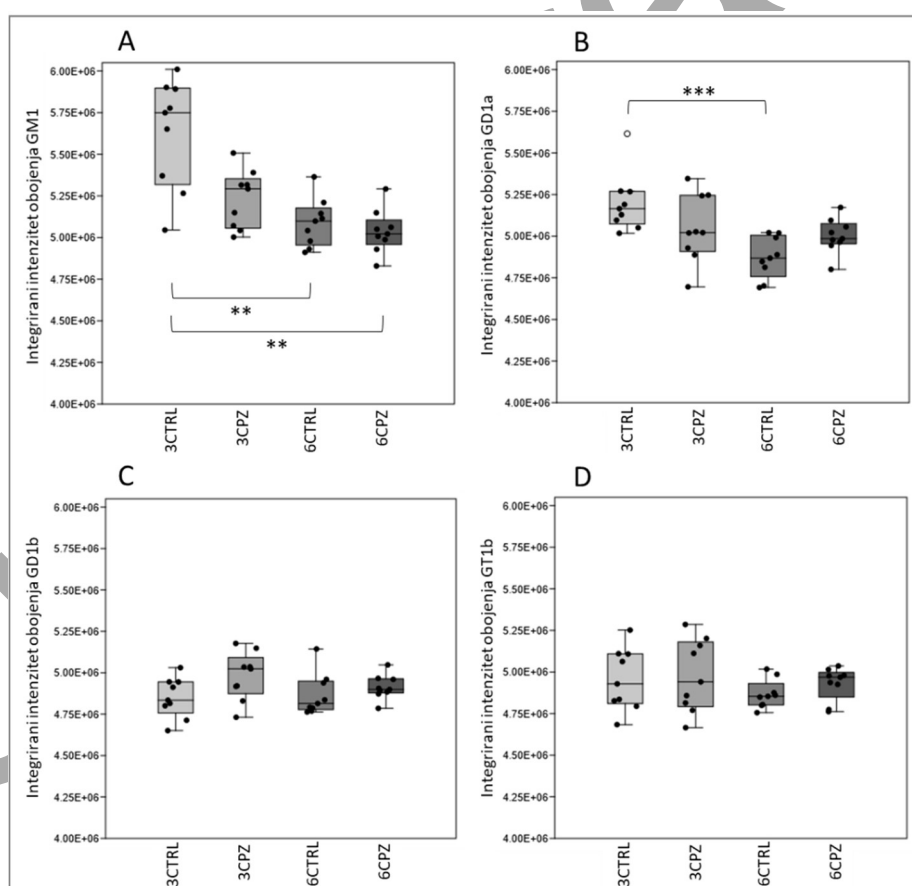
Pregledom imunohistokemijskog bojenja, vidljivo je smanjenje intenziteta bojenja za GM1 i GD1a u odnosu na kontrolu, dok su promjene u ekspresiji GD1b i GT1b manje izražene.

Rezultati Kruskal–Wallisovog testa pokazali su statistički značajnu razliku u intenzitetu imunohistokemijskog bojenja GM1 između skupina ($P < 0,001$). *Post hoc* Dunn-ova analiza

višestrukih usporedbi otkrila je značajno niži intenzitet bojenja u 3CPZ u usporedbi s 3CTRL ($P < 0,01$) te u 6CPZ u usporedbi s 3CTRL ($P < 0,001$) i 6CTRL ($P < 0,001$) (Slika 4.33 A).

Za GD1a, Kruskal–Wallis test pokazao je statistički značajnu razliku u intenzitetu bojenja GD1a među skupinama ($P < 0,001$). Tukeyev *post hoc* test je potvrdio da kontrolne skupine (3CTRL i 6CTRL) imaju značajno različit intenzitet bojenja ($P < 0,001$) (Slika 4.33 B).

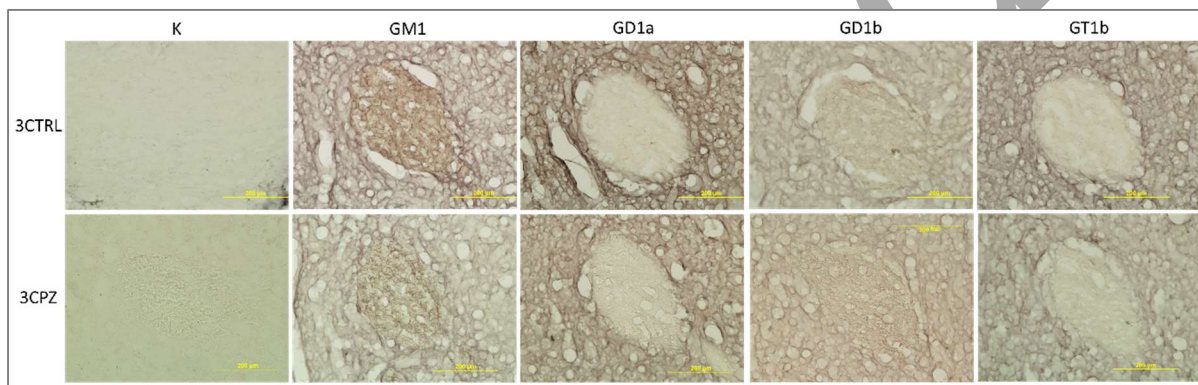
Analiza varijance (ANOVA) nije pokazala statistički značajnu razliku u intenzitetu bojenja GD1b niti GT1b među analiziranim skupinama (Slika 4.33 C i D).



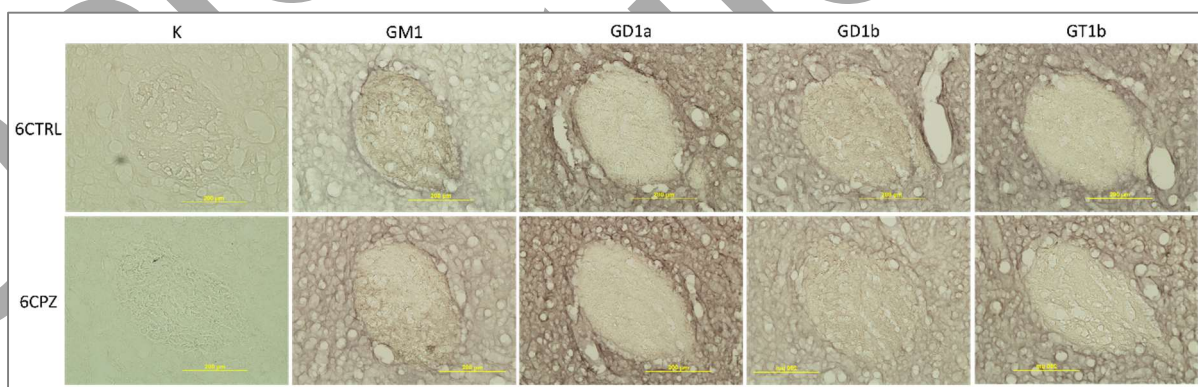
Slika 4.33. Grafički prikaz intenziteta bojenja kompleksnih gangliozida u *corpus callosum* (cc) miševa. A) GM1, B) GD1a, C) GD1b, D) GT1b. Podaci su prikazani box–plot dijagramom (medijan, interkvartilni raspon, vrijednosti min–max). Statistička analiza provedena je Kruskal–Wallisovim testom uz *post hoc* Dunn-ov test ili jednofaktorskom ANOVA s Tukeyevim *post hoc* testom (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). 3CTRL, 6CTRL – kontrolne skupine miševa starosti 3 i 6 mjeseci; 3CPZ, 6CPZ – miševi starosti 3 i 6 mjeseci tretirani kuprizonom.

4.3.2.2. Izražaj gangliozida u aca

Prije usporedbe intenziteta imunohistokemijskog bojenja (prikazano na Slici 4.34. i Slici 4.35) između skupina, provjereno je slijede li podaci normalnu distribuciju. Shapiro–Wilkov test pokazao je da su podaci GM1 i GD1b imali normalnu distribuciju dok su podaci za GD1a i GT1b odstupali od normalne distribucije. Prema tome, za GM1 i GD1b primijenjena jednofaktorska ANOVA, dok je za GD1a i GT1b korišten je neparametrijski Kruskal–Wallisov test.



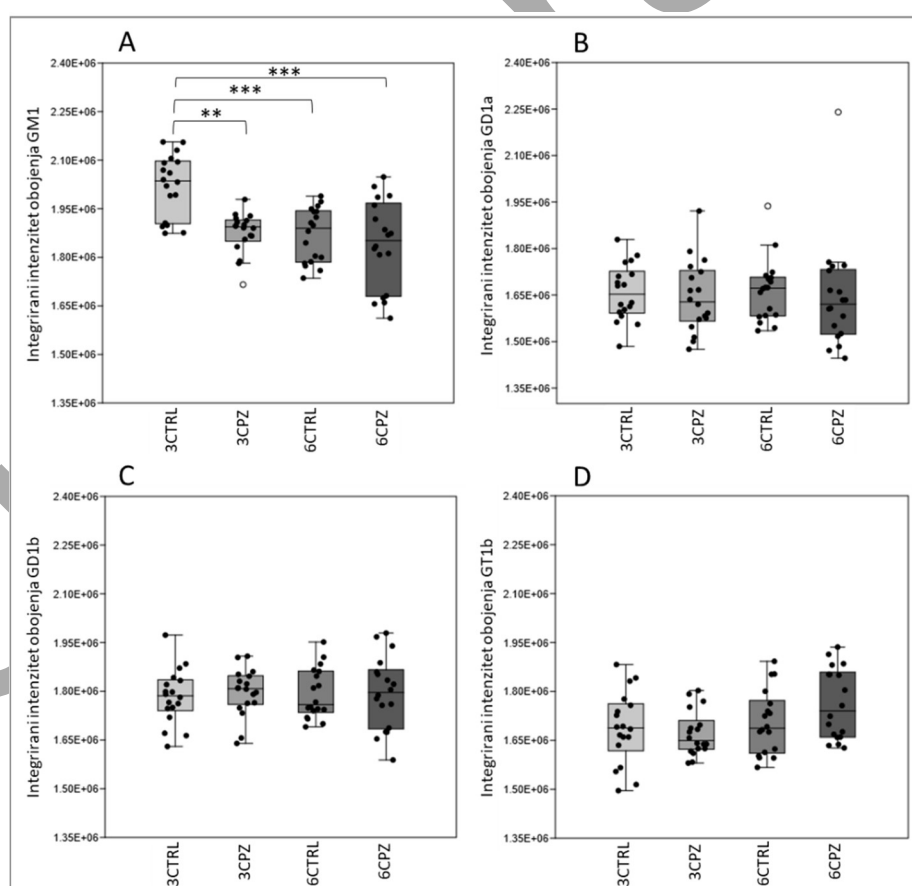
Slika 4.34. Imunohistokemijska analiza kompleksnih gangliozida u prednjoj komisuri (aca) miševa starih 3 mjeseca. Prikazana su reprezentativna bojanja za GM1, GD1a, GD1b i GT1b u kontrolnoj skupini (3CTRL) i skupini tretiranoj kuprizonom (3CPZ). Negativna kontrola (K) prikazuje odsutnost specifičnog bojenja u nedostatku primarnog protutijela. Skala na slikama iznosi 200 μm .



Slika 4.35. Imunohistokemijska analiza kompleksnih gangliozida u prednjoj komisuri (aca) miševa starih 6 mjeseca. Prikazana su reprezentativna bojanja za GM1, GD1a, GD1b i GT1b u kontrolnoj skupini (6CTRL) i skupini tretiranoj kuprizonom (6CPZ). Negativna kontrola (K) prikazuje odsutnost specifičnog bojenja u nedostatku primarnog protutijela. Skala na slikama iznosi 200 μm .

Rezultati ANOVA-e za GM1 pokazali su statistički značajnu razliku među skupinama ($P < 0,001$), a Tukeyev *post hoc* test identificirao je značajno niži intenzitet bojenja u skupinama 3CPZ i odgovarajućoj kontrolnoj skupini 3CTRL ($P < 0,001$). Statistički značajna razlika također je utvrđena između 3CTRL i 6CTRL ($P < 0,001$) i 3CTRL i 6CPZ ($P < 0,001$) (Slika 4.36 A).

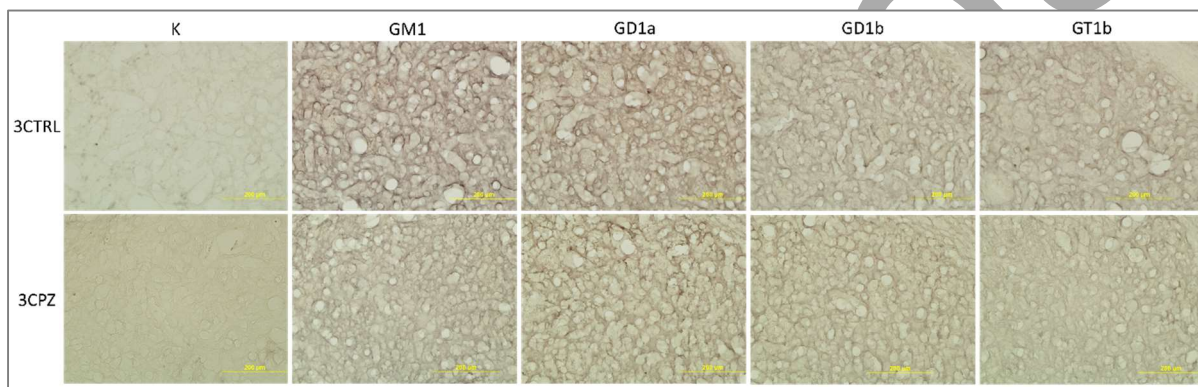
Za GD1a, Kruskal–Wallisov test nije pokazao je značajnu razliku među skupinama ($P = 0,677$) (Slika 4.36 B). Rezultati ANOVA-e za GD1b nisu pokazali statistički značajnu razliku među skupinama (Slika 4.36 C). Za GT1b, Kruskal–Wallis test također nije pokazao statistički značajnu razliku u intenzitetu bojenja među skupinama (Slika 4.36 D).



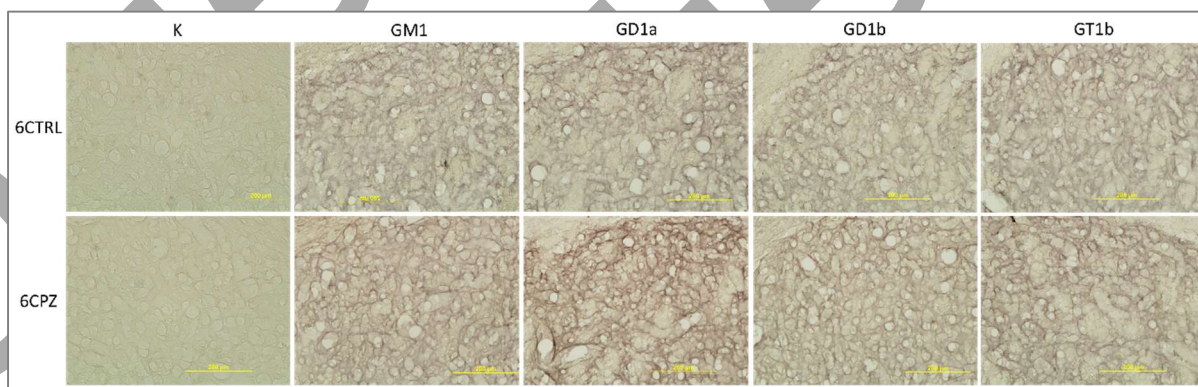
Slika 4.36. Grafički prikaz intenziteta bojenja kompleksnih gangliozida u prednjoj komisuri (aca) miševa. A) GM1, B) GD1a, C) GD1b, D) GT1b. Podaci su prikazani box–plot dijagramom (medijan, interkvartilni raspon, vrijednosti min–max). Statistička analiza provedena je Kruskal–Wallisovim testom uz *post hoc* Dunn-ov test ili jednofaktorskom ANOVA s Tukeyevim *post hoc* testom (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). 3CTRL, 6CTRL – kontrolne skupine miševa starosti 3 i 6 mjeseci; 3CPZ, 6CPZ – miševi starosti 3 i 6 mjeseci tretirani kuprizonom.

4.3.2.3. Izražaj gangliozida u CPu

Testiranje distribucije podataka Shapiro–Wilkovim testom pokazalo je da GM1, GD1a i GT1b prate normalnu distribuciju te je za njihovu analizu korištena jednofaktorska ANOVA. Podaci za GD1b su pokazali odstupanje od normalne distribucije te je za njihovu analizu korišten Kruskal–Wallis test. Reprezentativne slike bojenja kompleksnih gangliozida u CPu prikazani su na Slikama 4.37. i 4.38.

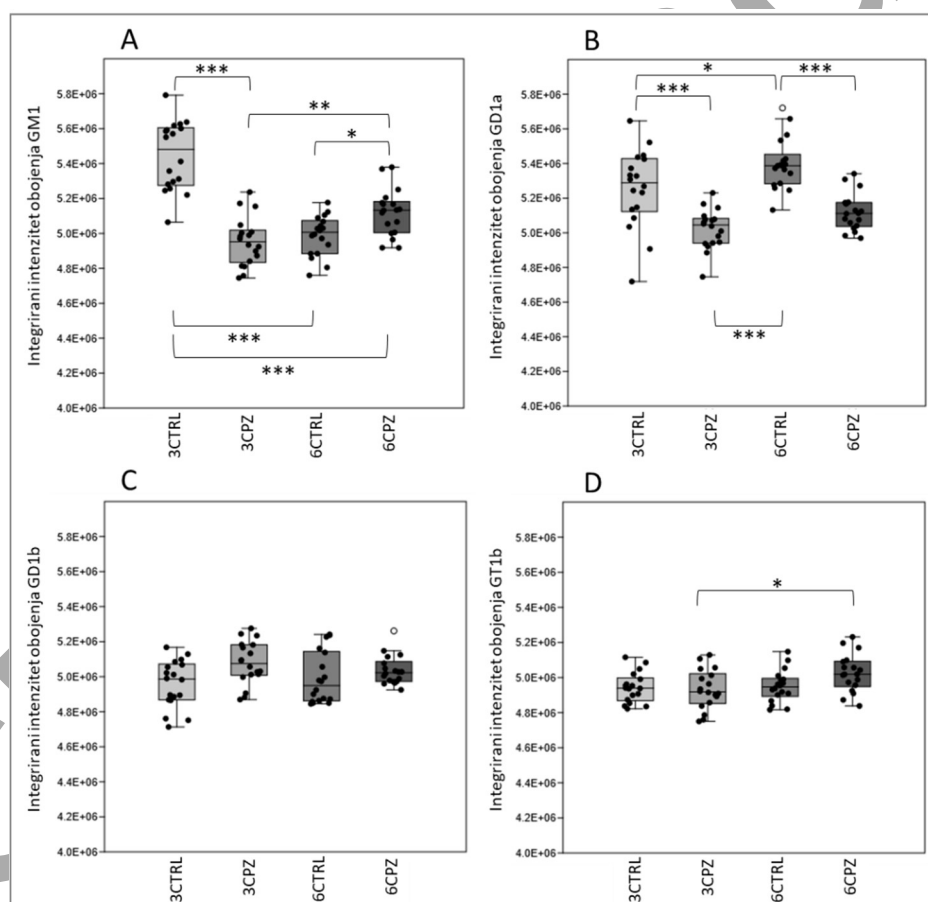


Slika 4.37. Imunohistokemijska analiza kompleksnih gangliozida u strijatumu (CPu) miševa starih 3 mjeseca. Prikazana su reprezentativna bojanja za GM1, GD1a, GD1b i GT1b u kontrolnoj skupini (3CTRL) i skupini tretiranoj kuprizonom (3CPZ). Negativna kontrola (K) prikazuje odsutnost specifičnog bojenja u nedostatku primarnog protutijela. Skala na slikama iznosi 200 μm.



Slika 4.38. Imunohistokemijska analiza kompleksnih gangliozida u strijatumu (CPu) miševa starih 6 mjeseci. Prikazana su reprezentativna bojanja za GM1, GD1a, GD1b i GT1b u kontrolnoj skupini (6CTRL) i skupini tretiranoj kuprizonom (6CPZ). Negativna kontrola (K) prikazuje odsutnost specifičnog bojenja u nedostatku primarnog protutijela. Skala na slikama iznosi 200 μm.

Rezultati dobiveni jednofaktorskom ANOVA-om pokazali su statistički značajnu razliku u intenzitetu bojenja GM1 među skupinama ($P < 0,001$). *Post hoc* Tukey test pokazao je značajnu razliku u intenzitetu bojenja između 3CPZ i odgovarajuće kontrolne skupine 3CTRL ($P < 0,001$) te 6CTRL i 6CPZ ($P < 0,05$). Statistički značajna razlika je utvrđena i za 3CTRL u odnosu na 6CTRL ($P < 0,001$), 3CTRL u odnosu na 6CPZ ($P < 0,001$) te 3CPZ u odnosu na 6CPZ ($P < 0,01$) (Slika 4.39 A).



Slika 4.39. Grafički prikaz intenziteta bojenja kompleksnih gangliozida u strijatumu (CPu). A) GM1, B) GD1a, C) GD1b, D) GT1b. Podaci su prikazani box-plot dijagramom (medijan, interkvartilni raspon, vrijednosti min-max). Statistička analiza provedena je Kruskal-Wallis testom uz post hoc Dunn-ov test ili jednofaktorskom ANOVA s Tukeyevim post hoc testom (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). 3CTRL, 6CTRL – kontrolne skupine miševa starosti 3 i 6 mjeseci; 3CPZ, 6CPZ – miševi starosti 3 i 6 mjeseci tretirani kuprizonom.

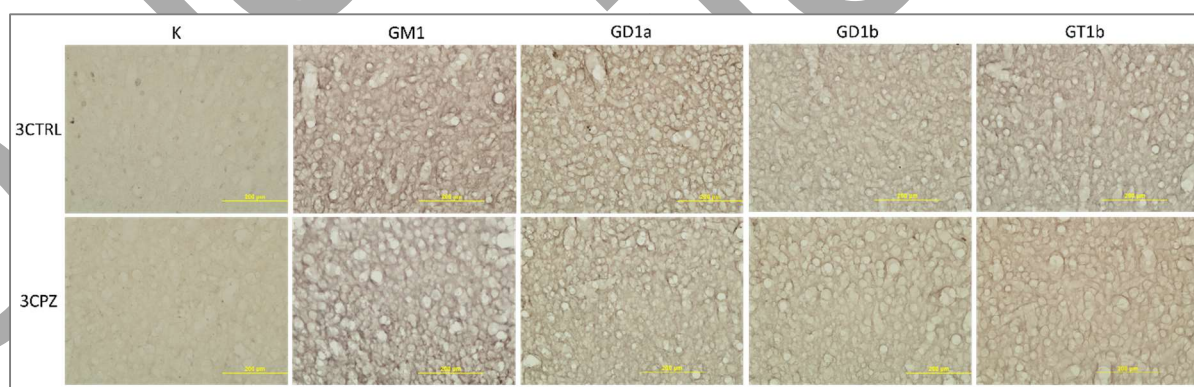
Za GD1a također je zabilježena statistički značajna razlika među skupinama ($P < 0,001$), pri čemu je *post hoc* analiza pokazala snižene vrijednosti u 3CPZ i 6CPZ u usporedbi s kontrolnim skupinama – 3CTRL i 3CPZ ($P < 0,001$) te 6CTRL i 6CPZ ($P < 0,001$). Statistički značajna razlika utvrđena je i za 3CTRL u usporedbi sa 6CTRL ($P < 0,05$) te 3CPZ u usporedbi sa 6CTRL ($P < 0,001$) (Slika 4.39 B).

Kruskal-Wallisovim testom je pronađeno da postoji razlika između skupina u izražaju GD1b ($P < 0,05$). Međutim, naknadni Dunnov test nije identificirao značajne razlike između pojedinih parova skupina (Slika 4.39 C).

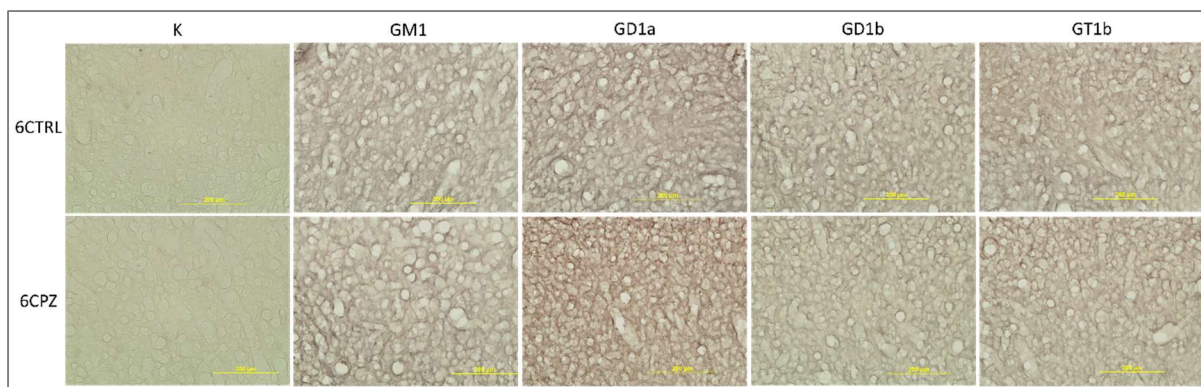
Za GT1b je ANOVA pokazala postojanje statistički značajne razlike ($P < 0,05$), a *post hoc* analiza potvrdila je značajno niži intenzitet bojenja u 3CPZ u odnosu na 6CPZ ($P < 0,05$) (Slika 4.39 D).

4.3.2.4. Izražaj gangliozida u M

Shapiro–Wilkov test je pokazao da rezultati dobiveni bojanjem GM1 i GD1a (Slika 4.40 i Slika 4.41) odstupaju od normalne distribucije te su dalje testirani Kruskal-Wallisovim testom, dok su podaci za GD1b i GT1b imali normalnu distribuciju te je za njihovu analizu primijenjena jednofaktorska ANOVA.



Slika 4.40. Imunohistokemijska analiza kompleksnih gangliozida u motoričkoj kori (M) miševa starih 3 mjeseca. Prikazana su reprezentativna bojanja za GM1, GD1a, GD1b i GT1b u kontrolnoj skupini (3CTRL) i skupini tretiranoj kuprizonom (3CPZ). Negativna kontrola (K) prikazuje odsutnost specifičnog bojenja u nedostatku primarnog protutijela. Skala na slikama iznosi 200 µm.

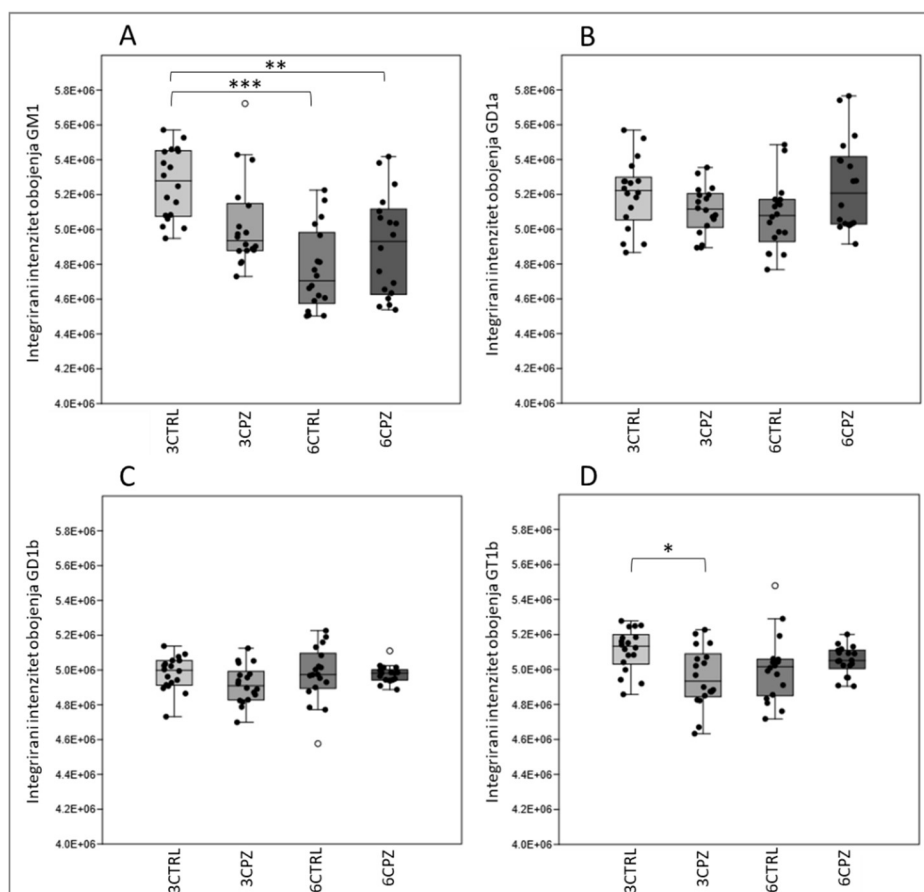


Slika 4.41. Imunohistokemijska analiza kompleksnih gangliozida u gangliozida u motoričkoj kori (M) miševa starih 6 mjeseci. Prikazana su reprezentativna bojanja za GM1, GD1a, GD1b i GT1b u kontrolnoj skupini (6CTRL) i skupini tretiranoj kuprizonom (6CPZ). Negativna kontrola (K) prikazuje odsutnost specifičnog bojenja u nedostatku primarnog protutijela. Skala na slikama iznosi 200 μ m.

Rezultati Kruskal–Wallisovog testa pokazali su statistički značajnu razliku u intenzitetu bojenja GM1 između skupina ($P < 0,001$). *Post hoc* Dunn-ova analiza višestrukih usporedbi pokazala je značajno niži intenzitet bojenja u 3CTRL u odnosu na 6CTRL ($P < 0,001$) te u 3CTRL u odnosu na 6CPZ ($P < 0,001$) (Slika 4.42 A).

Za GD1a, Kruskal–Wallisov test nije pokazao statistički značajnu razliku među skupinama (Slika 4.42 B). Također, niti jednofaktorska ANOVA nije pokazala statistički značajne razlike u intenzitetu bojenja GD1b među skupinama (Slika 4.42 C).

Za GT1b, ANOVA je pokazala postojanje statistički značajne razlike među skupinama ($P < 0,05$), a Tukeyev *post hoc* test identificirao je viši intenzitet bojenja u skupini 3CTRL u odnosu na 3CPZ ($P < 0,05$) (Slika 4.42 D).



Slika 4.42. Grafički prikaz intenziteta bojenja kompleksnih gangliozida u motoričkoj kori (M). A) GM1, B) GD1a, C) GD1b, D) GT1b. Podaci su prikazani box–plot dijagramom (medijan, interkvartilni raspon, vrijednosti min–max). Statistička analiza provedena je Kruskal–Wallis testom uz *post hoc* Dunn-ov test ili jednofaktorskom analizom varijance s Tukeyevim *post hoc* testom (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). 3CTRL, 6CTRL – kontrolne skupine miševa starosti 3 i 6 mjeseci; 3CPZ, 6CPZ – miševi starosti 3 i 6 mjeseci tretirani kuprizonom.

4.3.3. Neuroplastin

Imunohistokemijsko bojenje za neuroplastin provedeno je u više navrata korištenjem protutijela anti-Neuroplastin 65, uz promjene eksperimentalnih uvjeta s ciljem optimizacije signala. Korištena su različita vremena inkubacije s primarnim protutijelom (jedna i dvije noći pri 4 °C) te dvije vrste sekundarnih protutijela (biotinilirano goveđe anti-kozje IgG protutijelo konjugirano s biotinom i magareće anti-kozje IgG protutijelo konjugirano s peroksidazom). Unatoč provedenim optimizacijskim pokušajima, u svim je slučajevima izostala specifična

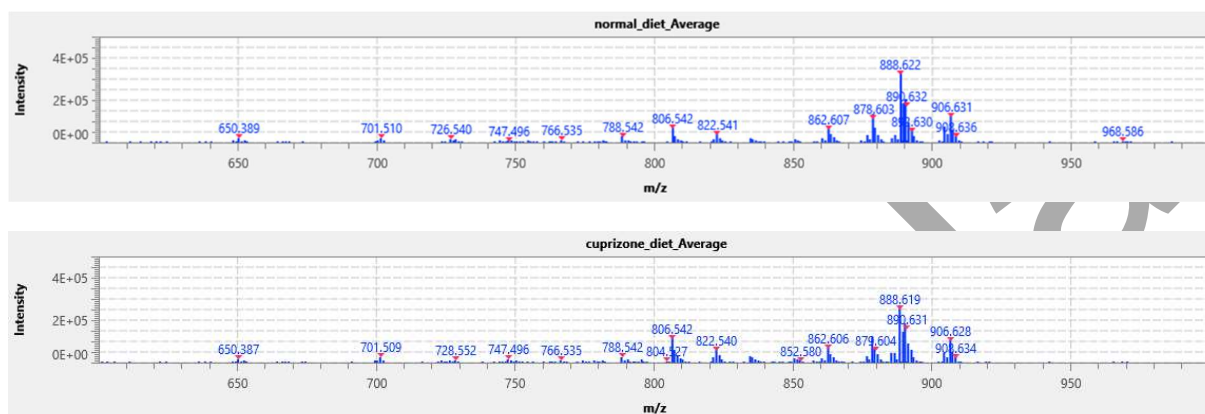
imunohistokemijska reakcija. Dobiveni preparati nisu pokazali pozitivan signal, odnosno razliku u signalu između tretiranih i kontrolnih skupina, niti karakterističnu staničnu lokalizaciju Neuroplastina. Predstavne slike ovih pokušaja prikazane su u Dodatku (Slika S1.).

4.4. IMS analiza

Kako bi se procijenio učinak kuprizona na lipidni sastav mozga i prostornu distribuciju pojedinih lipidnih vrsta, primijenjena je metoda MALDI-TOF IMS. Životinje su bile podijeljene u četiri skupine prema dobi i tretmanu: miševi starosti 3 (3CPZ) i 6 (6CPZ) mjeseci hranjeni hranom s dodatkom 0,2 % kuprizona kroz 20 dana te odgovarajuće kontrolne skupine (3CTRL i 6CTRL) hranjene standardnom hranom. Nakon završetka tretmana i provedbe svih bihevioralnih testova, životinje su žrtvovane, a njihovi mozgovi prikupljeni i pripremljeni za MALDI-TOF IMS analizu.

IMS analiza je provedena na kriostatskim rezovima moždanog tkiva u negativnom ionskom modu, a obuhvatila je četiri regije prednjeg mozga (Slika 3.5): cc, aca, CPu i M. Podaci su prikupljeni u masenom rasponu 600–1000 m/z što je omogućilo detekciju i mapiranje širokog spektra lipida uključenih u strukturu mijelina i staničnu signalizaciju. U svim analiziranim regijama zabilježeno je jasno razdvajanje između kontrolnih i kuprizonskih skupina, uz izraženiju varijabilnost lipidnih profila unutar kuprizonskih skupina. Najveći doprinos razdvajanju skupina dolazio je od signala viših m/z vrijednosti (> 800 m/z), što upućuje na važnu ulogu promjena u fosfolipidnim i sfingolipidnim komponentama membrana u odgovoru na kuprizon.

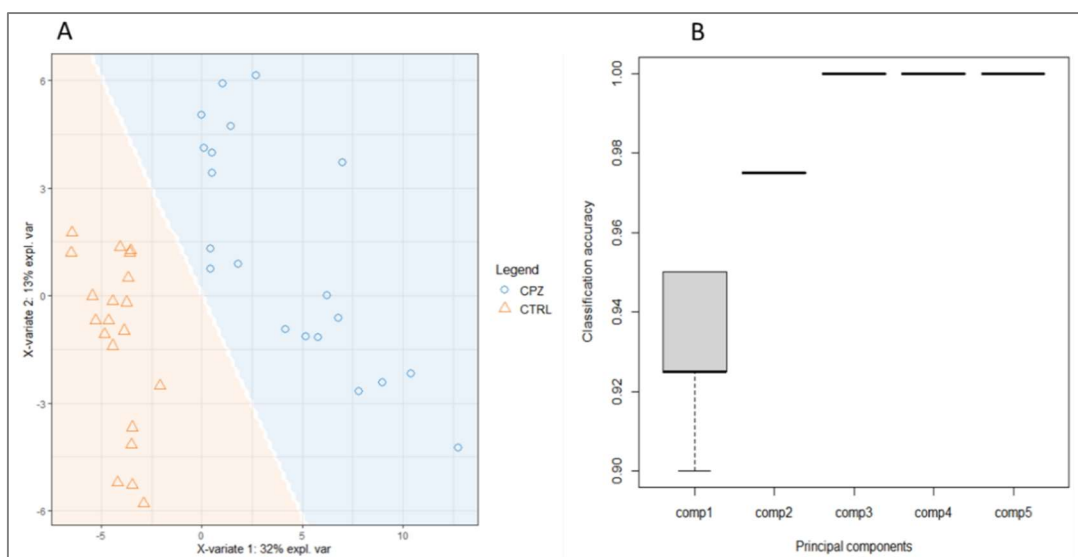
4.4.1. IMS analiza cc



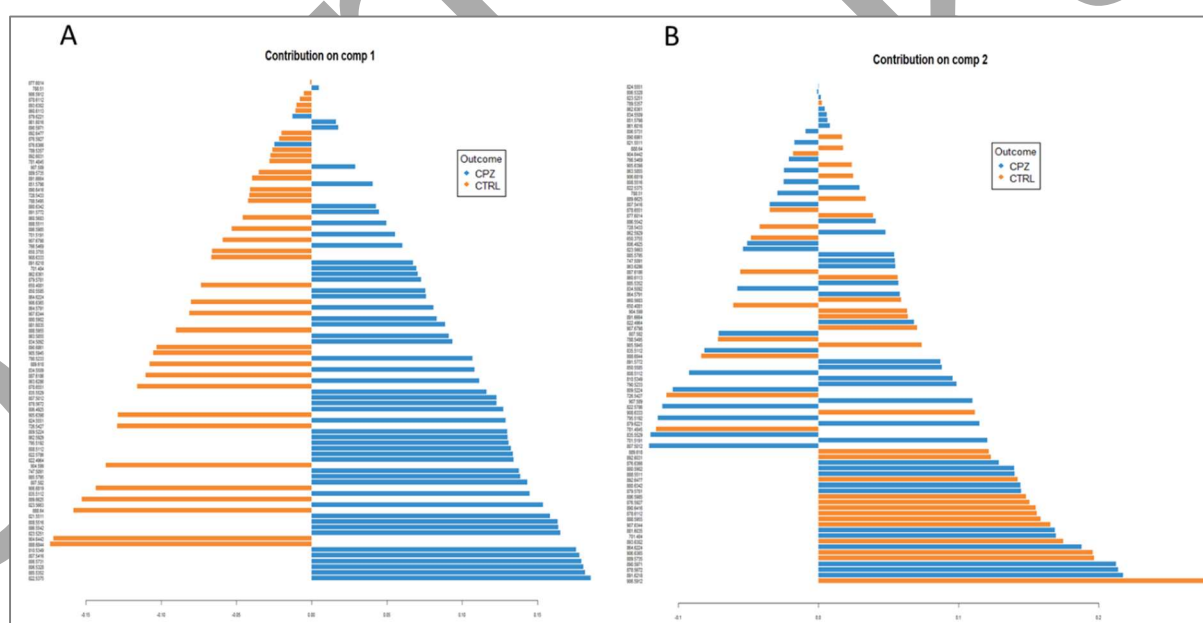
Slika 4.43. TIC normalizirani prosječni spektri masa (600–1000 m/z) odabranih ROI-ja *corpus callosum* (cc) kontrolnih miševa (*normal diet*) i miševa tretiranih kuprizonom (*cuprizone diet*) 3 mjeseca starosti. TIC – ukupni intenzitet signala m/z kvocijenata.

PLS-DA analiza cjelokupnih masenih spektra dobivenih IMS analizom moždane strukture cc korištena je za razlikovanje lipidnih profila između kontrolne skupine miševa i skupine tretirane kuprizonom starosti 3 mjeseca. Spektri su prethodno TIC normalizirani kako bi se omogućila usporedivost intenziteta signala između različitih skupina i regija mozga (Slika 4.43). U analiziranom rasponu 600-1000 m/z postignuto je jasno razdvajanje uzoraka između skupina (Slika 4.44 A), pri čemu je kod životinja tretiranih kuprizonom uočena veća varijabilnost spektralnih profila u odnosu na kontrolu (što je prikazano plavim područjem na Slici 4.44 A). Točnost klasifikacije signala po broju komponenti u odgovarajuće skupine prikazana je na Slici 4.44 B na kojoj se vidi da je dovoljna razdvojenost skupina postignuta korištenjem prve dvije glavne komponente, uz visoku klasifikacijsku točnost od 97 %.

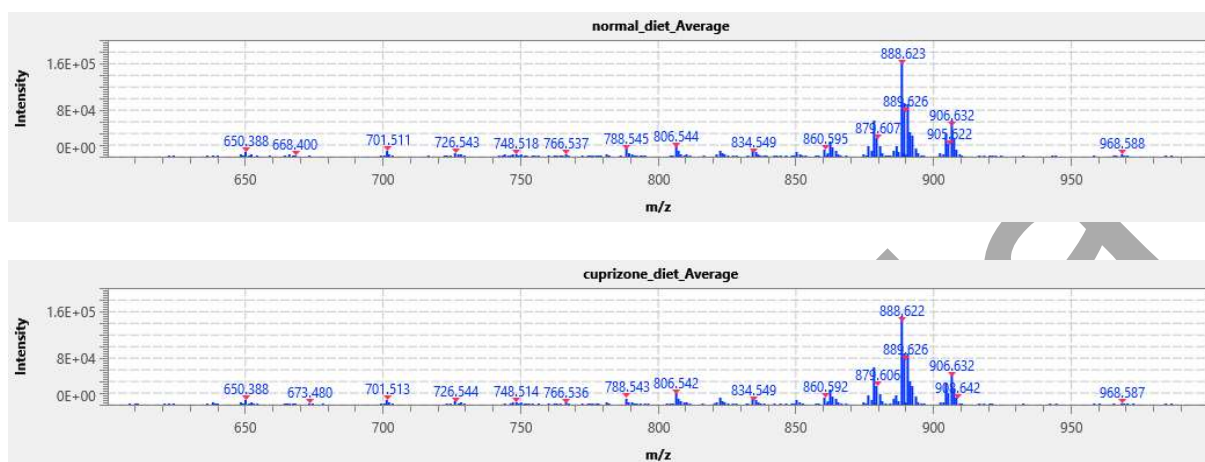
Za određivanje ključnih m/z značajki koje najviše doprinose razdvajanju skupina prikazani su doprinosi pojedinih m/z vrijednosti prvoj i drugoj glavnoj komponenti (Slika 4.45 A i B). U piramidalnim prikazima vidljivo je po 89 m/z značajki koje najviše doprinose razdvajanju na prvoj komponenti (A) i drugoj komponenti (B). Duljina vektora označava relativni doprinos pojedine značajke razdvajanju skupina, dok boja u označava kojoj je skupini vrijednost povišena (narančasto = CPZ, plavo = CTRL). Najveći doprinos razdvajanju skupina potječe od m/z vrijednosti u rasponu 700–900 Da.



Slika 4.44. PLS-DA analiza *corpus callosum* (cc) miševa starosti 3 mjeseca. A) PLS-DA prikaz distribucije signala i heterogenosti skupa podataka kontrolne (CTRL) i kuprizonom tretirane skupine miševa (CPZ). B) Točnost klasifikacije signala cc miševa starih 3 mjeseca u odgovarajuće skupine unutar masenog raspona od 600 do 1000 Da.



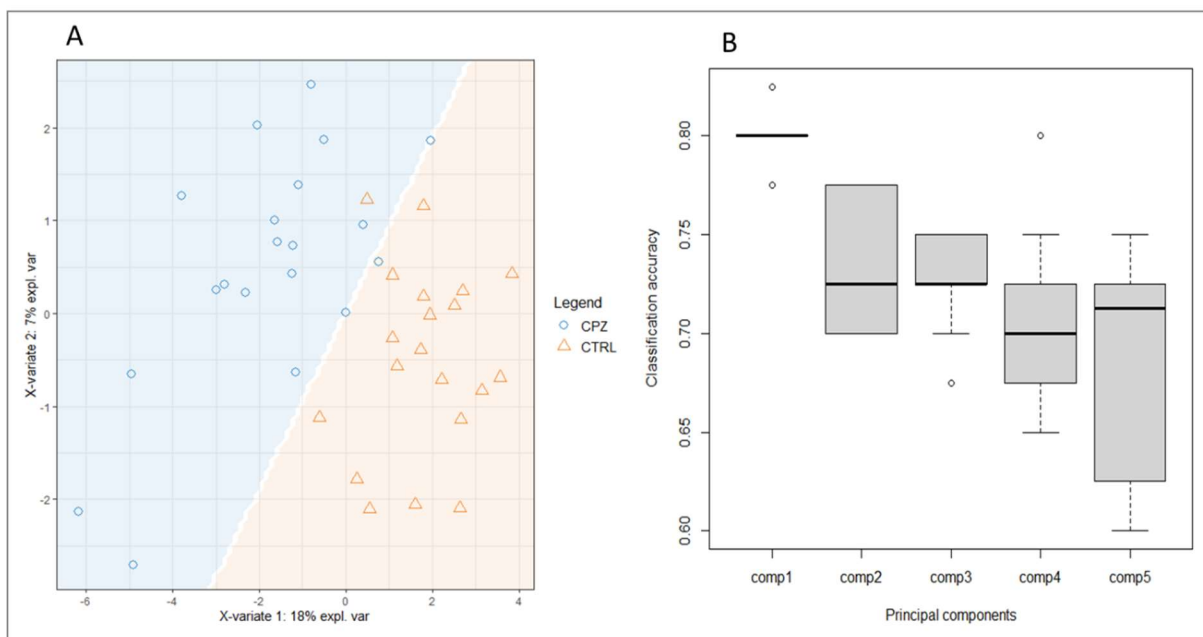
Slika 4.45. Doprinos pojedinih m/z značajki razdvajanju skupina u *corpus callosumu* (cc) miševa starih 3 mjeseca na prvoj (A) i drugoj (B) glavnoj komponenti u PLS-DA analizi. Duljina trake označava relativnu važnost značajke za razdvajanje skupina; boja označava smjer učinka (narančasto = CPZ, plavo = CTRL), a m/z vrijednosti značajki navedene su uz osi.



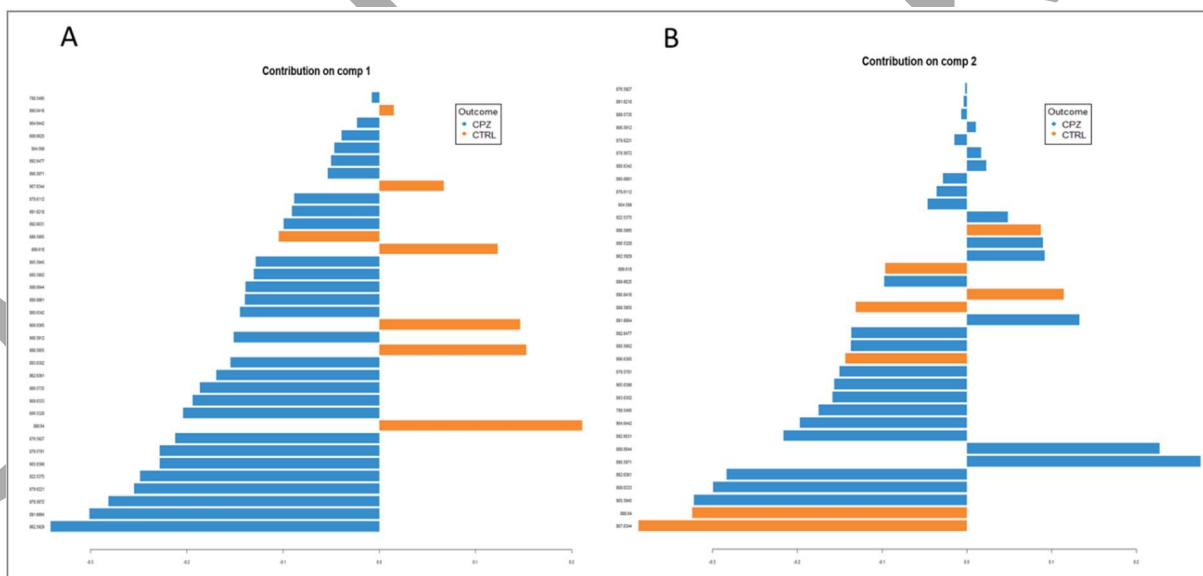
Slika 4.46. TIC normalizirani prosječni spektri masa (600–1000 m/z) odabranih ROI-ja *corpus callosum* (cc) kontrolnih miševa (*normal diet*) i miševa tretiranih kuprizonom (*cuprizone diet*) 6 mjeseci starosti. TIC – ukupni intenzitet signala m/z kvocijenata.

PLS-DA analiza TIC-normaliziranih masenih spektra dobivenih IMS analizom cc provedena je za razlikovanje lipidnih profila između kontrolne i kuprizonom tretirane skupine životinja starosti 6 mjeseci. U spektralnom rasponu 600–1000 m/z uočene su izražene razlike u intenzitetima signala između skupina (Slika 4.46). PLS-DA model pokazao je jasno razdvajanje skupina uz minimalno preklapanje (Slika 4.47 A), pri čemu je klasifikacijska točnost uz korištenje prve komponente bila vrlo visoka (80 %), dok su dodatne komponente imale manji doprinos (Slika 4.47 B). Veća varijabilnost skupa podataka zabilježena je kod uzoraka tretiranih kuprizonom, što je prikazano plavim područjem na Slici 4.47 A.

Za identifikaciju m/z vrijednosti koje najviše doprinose razlikovanju skupina, analizirani su doprinosi pojedinih značajki prvoj i drugoj glavnoj komponenti (Slika 4.48 A i B). Na prvoj i drugoj komponenti identificirano je po 35 m/z značajki koje imaju najveći diskriminacijski doprinos. Kao i kod mlađih životinja, ključne razlike koncentrirane su u rasponu 700–900 Da. Kvaljivo je da većina m/z vrijednosti pokazuje značajnost u CPZ skupini, dok manji broj m/z ima više intenzitete signala u kontrolnoj skupini.

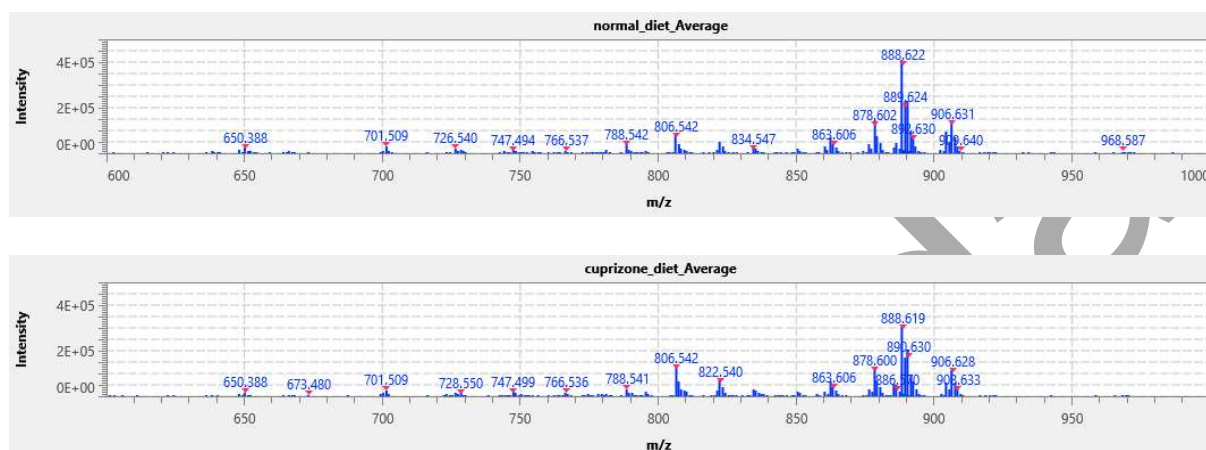


Slika 4.47. PLS-DA analiza *corpus callosum* (cc) miševa starosti 6 mjeseci. A) PLS-DA prikaz distribucije signala i heterogenosti skupa podataka kontrolne (CTRL) i kuprizonom tretirane skupine miševa (CPZ). B) Točnost klasifikacije signala cc miševa starih 6 mjeseci u odgovarajuće skupine unutar masenog raspona od 600 do 1000 Da.



Slika 4.48. Doprinos pojedinih m/z značajki razdvajanju skupina u *corpus callosum* (cc) miševa starih 6 mjeseci na prvoj (A) i drugoj (B) glavnoj komponenti u PLS-DA analizi. Duljina trake označava relativnu važnost značajke za razdvajanje skupina; boja označava smjer učinka (narančasto = CPZ, plavo = CTRL), a m/z vrijednosti značajki navedene su uz osi.

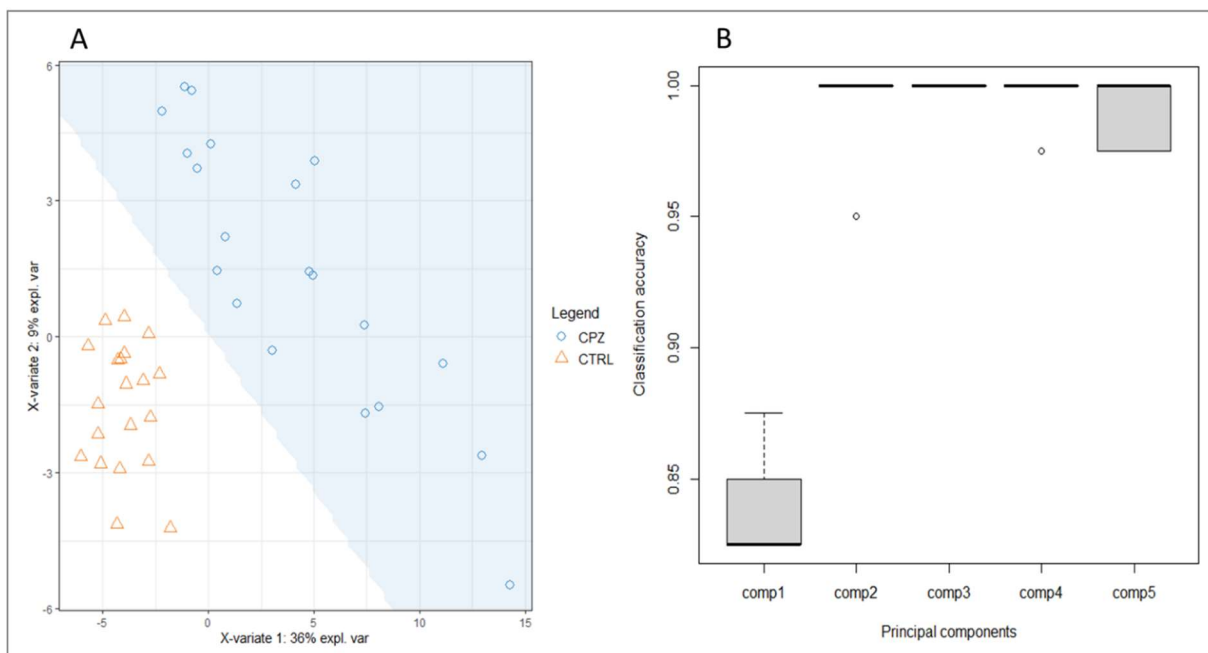
4.4.2. IMS analiza aca



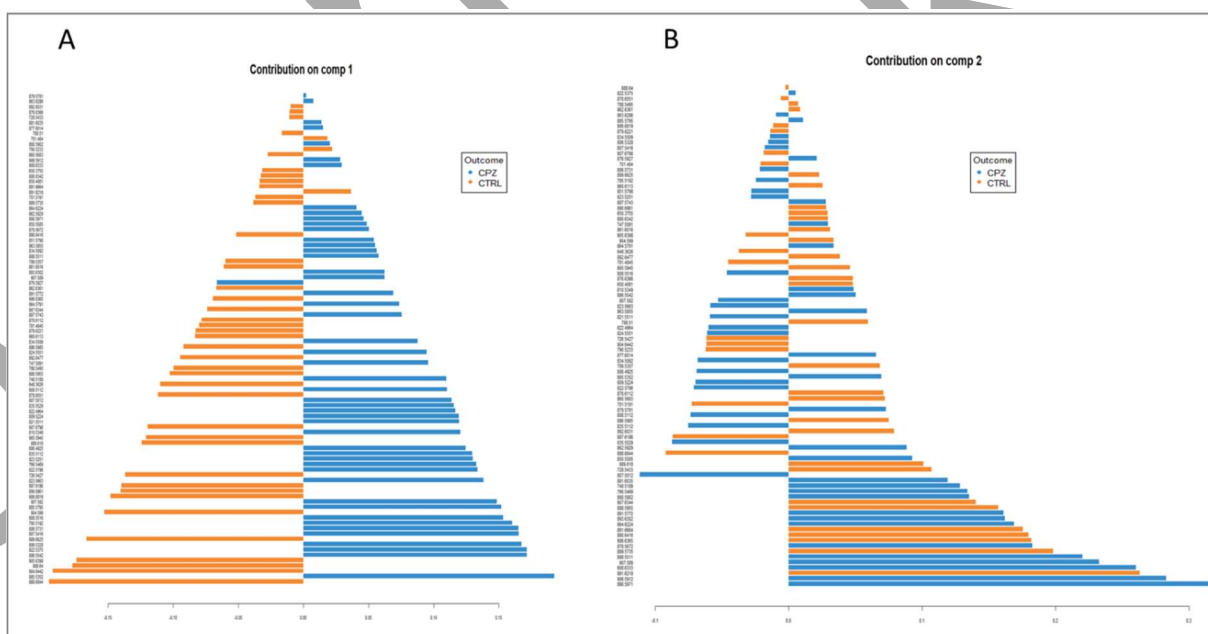
Slika 4.49. TIC normalizirani prosječni spektri masa (600–1000 m/z) odabranih ROI-ja prednje komisure (aca) kontrolnih miševa (*normal diet*) i miševa tretiranih kuprizonom (*cuprizone diet*) 3 mjeseca starosti. TIC – ukupni intenzitet signala m/z kvocijenata.

PLS-DA analiza TIC-normaliziranih masenih spektra dobivenih IMS analizom regije aca provedena je zbog razlikovanja lipidnih profila između kontrolne i kuprizonom tretirane skupine životinja starosti 3 mjeseca. TIC normalizacija omogućila je uklanjanje varijabilnosti uzrokovane tehničkim faktorima. U analiziranom rasponu 600–1000 m/z uočene su izražene razlike u spektralnim intenzitetima između skupina (Slika 4.49). PLS-DA model pokazao je potpuno razdvajanje skupina (Slika 4.50 A), što ukazuje na različite lipidne profile između skupina u ovoj regiji. Prikaz klasifikacijske točnosti (Slika 4.50 B) pokazuje da je razdvajanje gotovo u potpunosti postignuto korištenjem prve komponente, uz vrlo visoku klasifikacijsku točnost (100 %). Veća heterogenost skupa podataka zabilježena je kod uzoraka tretiranih kuprizonom, što je prikazano plavim područjem na Slici 4.50 A.

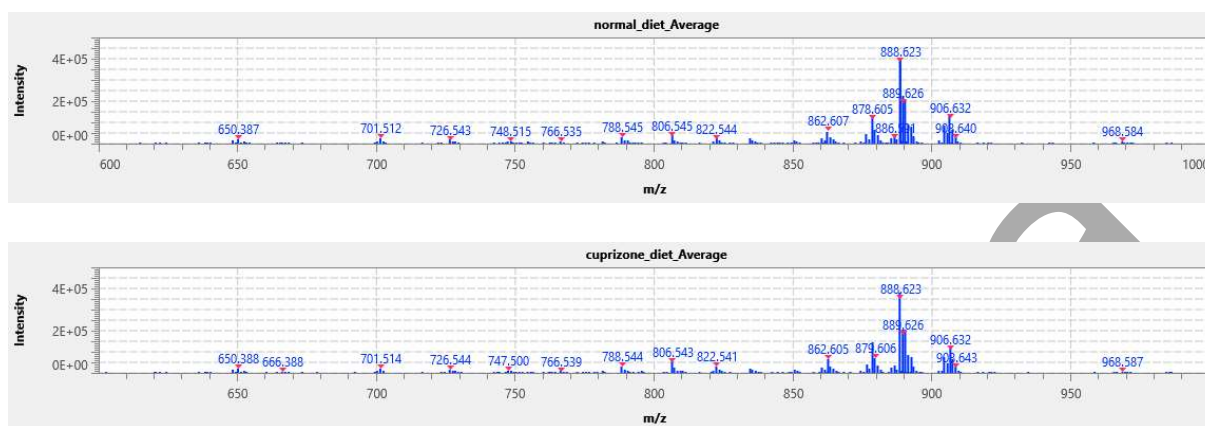
Za identifikaciju m/z značajki koje najviše pridonose razlikovanju skupina analizirani su doprinosi pojedinih m/z vrijednosti prvoj i drugoj glavnoj komponenti (Slika 4.51 A i B). Na obje komponente izdvojeno je po 92 m/z značajke s najvećim doprinosom klasifikaciji. Najveći broj značajki nalazi se u rasponu od 700 do 900 Da. Raspodjela m/z značajki između skupinana prvoj komponenti je približno izjednačena, dok druga komponenta pokazuje veći broj m/z s povišenim intenzitetima u CPZ skupini.



Slika 4.50. PLS-DA analiza prednje komisure (aca) miševa starosti 3 mjeseca. A) PLS-DA prikaz distribucije signala i heterogenosti skupa podataka kontrolne (CTRL) i kuprizonom tretirane skupine miševa (CPZ). B) Točnost klasifikacije signala aca miševa starih 3 mjeseca u odgovarajuće skupine unutar masenog raspona od 600 do 1000 Da.



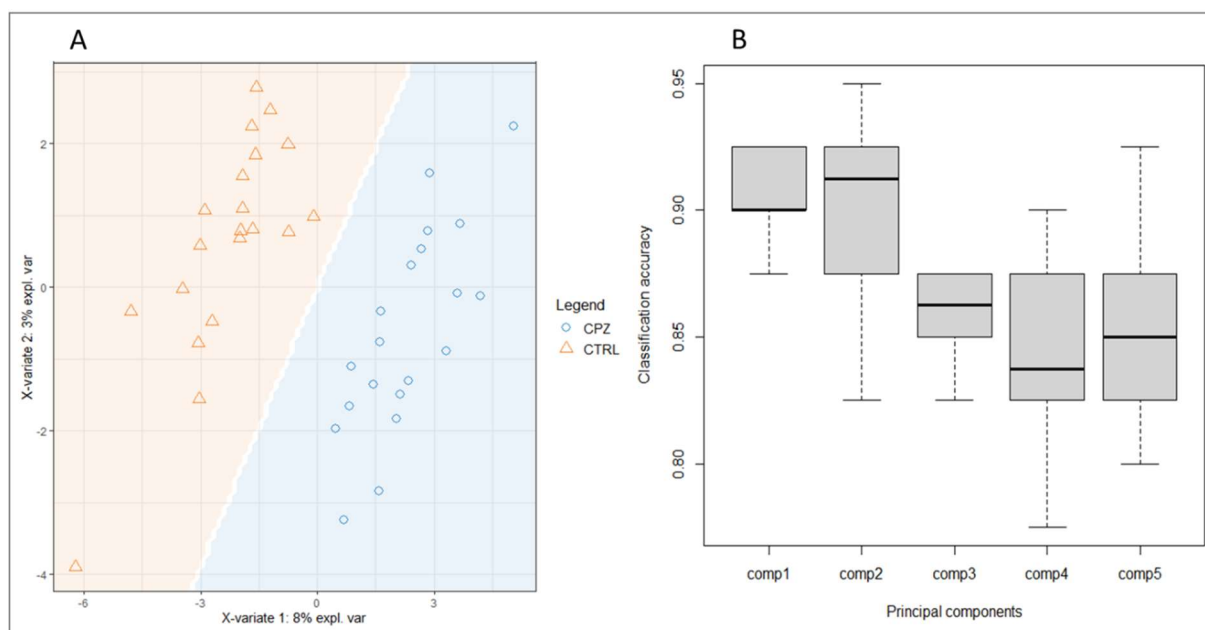
Slika 4.51. Doprinos pojedinih m/z značajki razdvajanju skupina u prednjoj komisuri (aca) miševa starih 3 mjeseca na prvoj (A) i drugoj (B) glavnoj komponenti u PLS-DA analizi. Duljina trake označava relativnu važnost značajke za razdvajanje skupina; boja označava smjer učinka (narančasto = CPZ, plavo = CTRL), a m/z vrijednosti značajki navedene su uz osi.



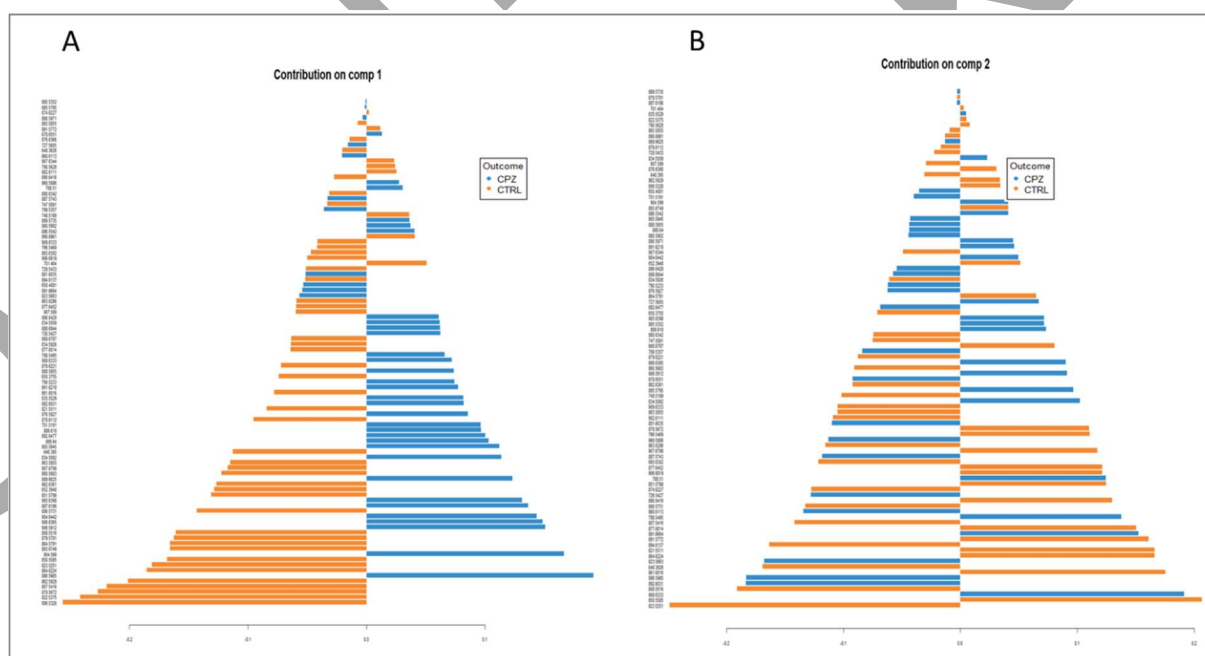
Slika 4.52. TIC normalizirani prosječni spektri masa (600–1000 m/z) odabranih ROI-ja prednje komisure (aca) kontrolnih miševa (*normal diet*) i miševa tretiranih kuprizonom (*cuprizone diet*) 6 mjeseci starosti. TIC – ukupni intenzitet signala m/z kvocijenata.

PLS-DA analiza cjelokupnih TIC normaliziranih masenih spektra dobivenih IMS analizom regije aca provedena je radi razlikovanja lipidnih profila između kontrolne i kuprizonom tretirane skupine životinja starosti 6 mjeseci. U analiziranom rasponu 600–1000 m/z zabilježene su razlike u intenzitetima signala između skupina (Slika 4.52). PLS-DA model pokazao je jasno razdvajanje skupina (Slika 4.53 A), a prikaz klasifikacijske točnosti (Slika 4.53 B) ukazuje da je najveći doprinos klasifikaciji ostvaren na prvoj komponenti (90 %).

Analiza doprinosa m/z značajki pokazala je da je za prvu i drugu komponentu izdvojeno po 94 m/z značajke koje najviše pridonose razdvajanju skupina (Slika 4.54 A i B). Na prvoj komponenti veći broj značajki povezan je s kontrolnom skupinom, dok je na drugoj komponenti raspodjela između skupina uravnoteženija. Najveći broj diferencijalnih m/z vrijednosti nalazi se u rasponu od 700 do 900 Da.

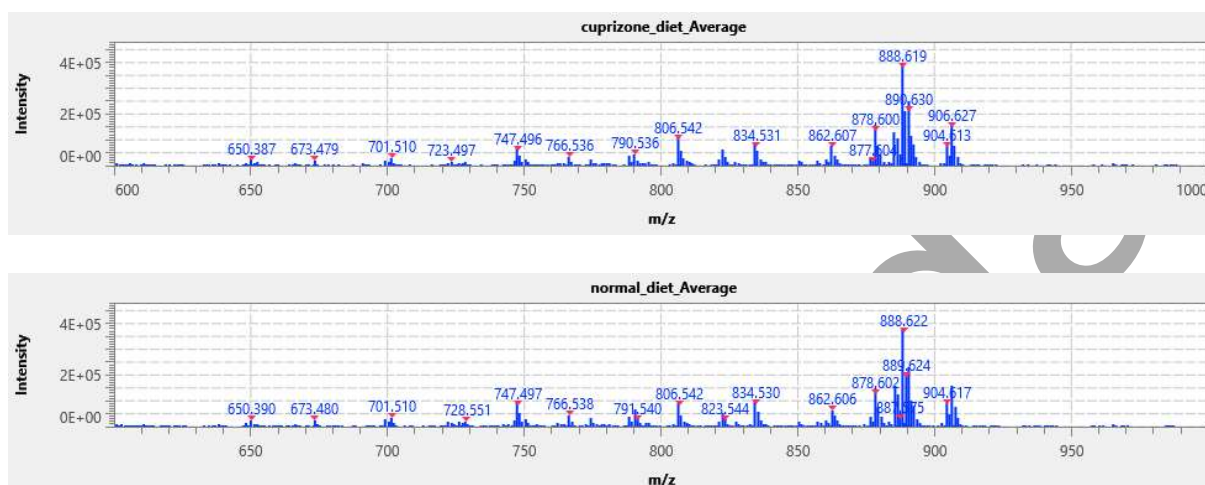


Slika 4.53. PLS-DA analiza prednje komisure (aca) miševa starosti 6 mjeseci. A) PLS-DA prikaz distribucije signala i heterogenosti skupa podataka kontrolne (CTRL) i kuprizonom tretirane skupine miševa (CPZ). B) Točnost klasifikacije signala aca miševa starih 6 mjeseci u odgovarajuće skupine unutar masenog raspona od 600 do 1000 Da.



Slika 4.54. Doprinos pojedinih m/z značajki razdvajanju skupina u prednjoj komisuri (aca) miševa starih 6 mjeseci na prvoj (A) i drugoj (B) glavnoj komponenti u PLS-DA analizi. Duljina trake označava relativnu važnost značajke za razdvajanje skupina; boja označava smjer učinka (narančasto = CPZ, plavo = CTRL), a m/z vrijednosti značajki navedene su uz osi.

4.4.3. IMS analiza CPu

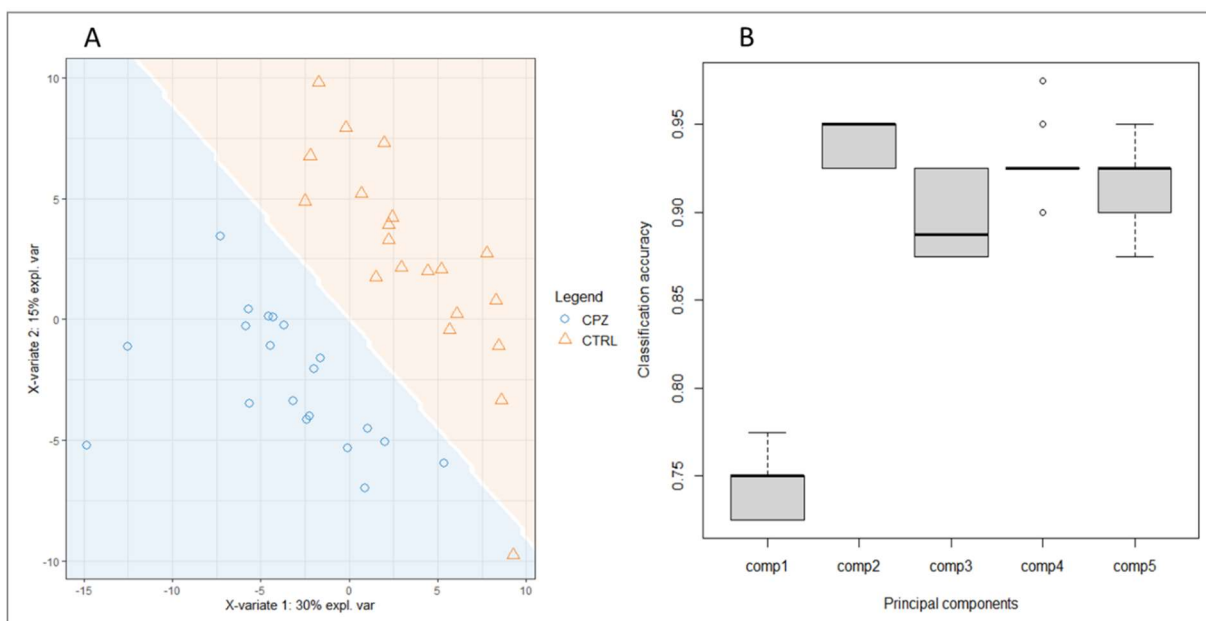


Slika 4.55. TIC normalizirani prosječni spektri masa (600–1000 m/z) odabranih ROI-ja strijatuma (CPu) kontrolnih miševa (*normal diet*) i miševa tretiranih kuprizonom (*cuprizone diet*) 3 mjeseca starosti. TIC – ukupni intenzitet signala m/z kvocijenata.

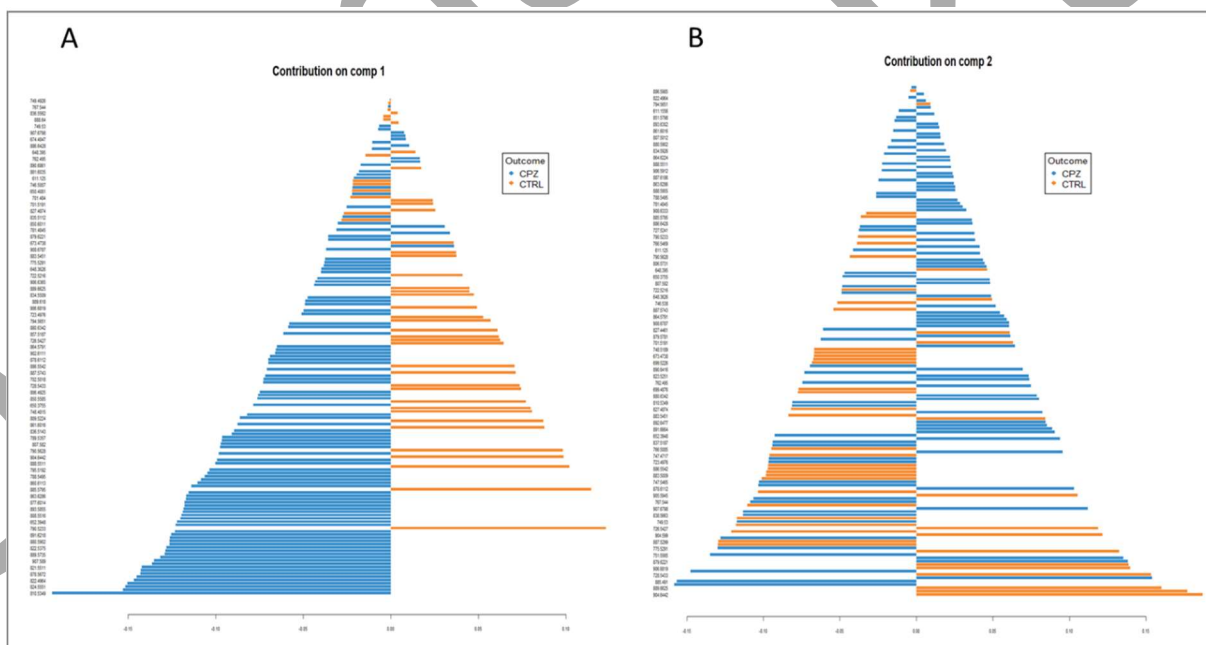
PLS-DA analiza cjelokupnih masenih spektra korištena je za lipidnih profila CPu između kontrolne skupine i skupine miševa tretirane kuprizonom starosti 3 mjeseca. Na Slici 4.55 prikazano je razdvajanje uzoraka unutar masenog raspona od 600 do 1000 Da, koje pokazuje značajno različite lipidne profile između skupina. Veća heterogenost podataka zabilježena je kod uzoraka tretiranih kuprizonom, što je vidljivo iz šireg raspona distribucije CPZ skupine (plavo područje na Slici 4.56 A).

Točnost klasifikacije uzoraka u odgovarajuće skupine prikazana je na Slici 4.56 B. Analiza pokazuje da se dovoljna razdvojenost između skupina postiže korištenjem prve dvije komponente, uz visoku klasifikacijsku točnost u prve dvije komponente (95 %).

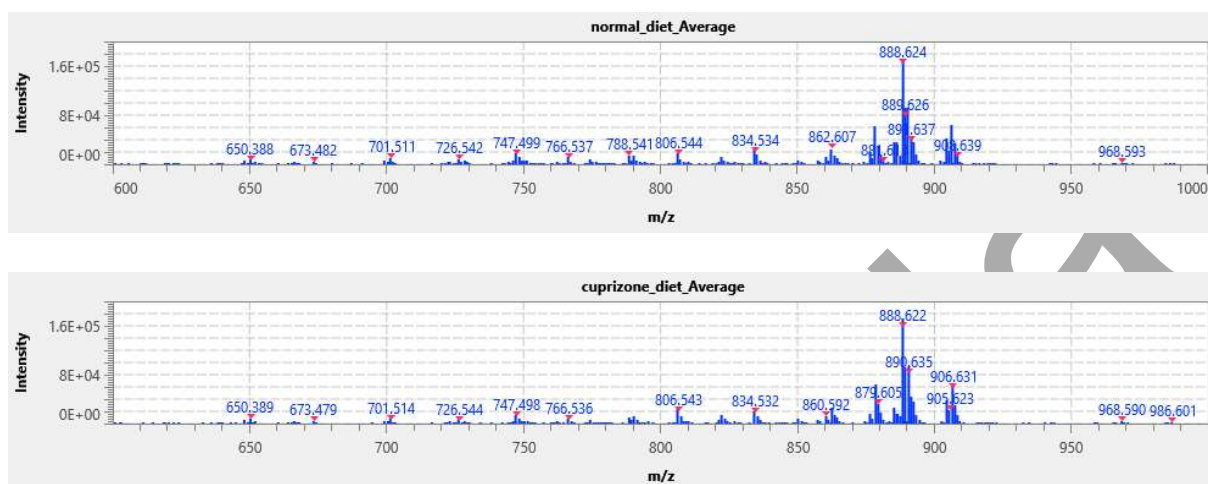
Analiza doprinosa m/z značajki pokazala je da je za prvu i drugu komponentu izdvojeno po 77 m/z značajki koje najviše pridonose razdvajanju skupina (Slika 4.57 A i B). Na prvoj komponenti prevladavaju značajke povezane s CPZ skupinom, dok je na drugoj komponenti raspodjela nešto uravnoteženija. Većina diferencijalnih m/z vrijednosti nalazi se u rasponu od 650 do 900 Da.



Slika 4.56. PLS-DA analiza strijatuma (CPu) miševa starosti 3 mjeseca. A) PLS-DA prikaz distribucije signala i heterogenosti skupa podataka kontrolne (CTRL) i kuprizonom tretirane skupine miševa (CPZ). B) Točnost klasifikacije signala CPu miševa starih 3 mjeseca u odgovarajuće skupine unutar masenog raspona od 600 do 1000 Da.



Slika 4.57. Doprinos pojedinih m/z značajki razdvajanju skupina u strijatumu (CPu) miševa starih 3 mjeseca na prvoj (A) i drugoj (B) glavnoj komponenti u PLS-DA analizi. Duljina trake označava relativnu važnost značajke za razdvajanje skupina; boja označava smjer učinka (narančasto = CPZ, plavo = CTRL), a m/z vrijednosti značajki navedene su uz osi.

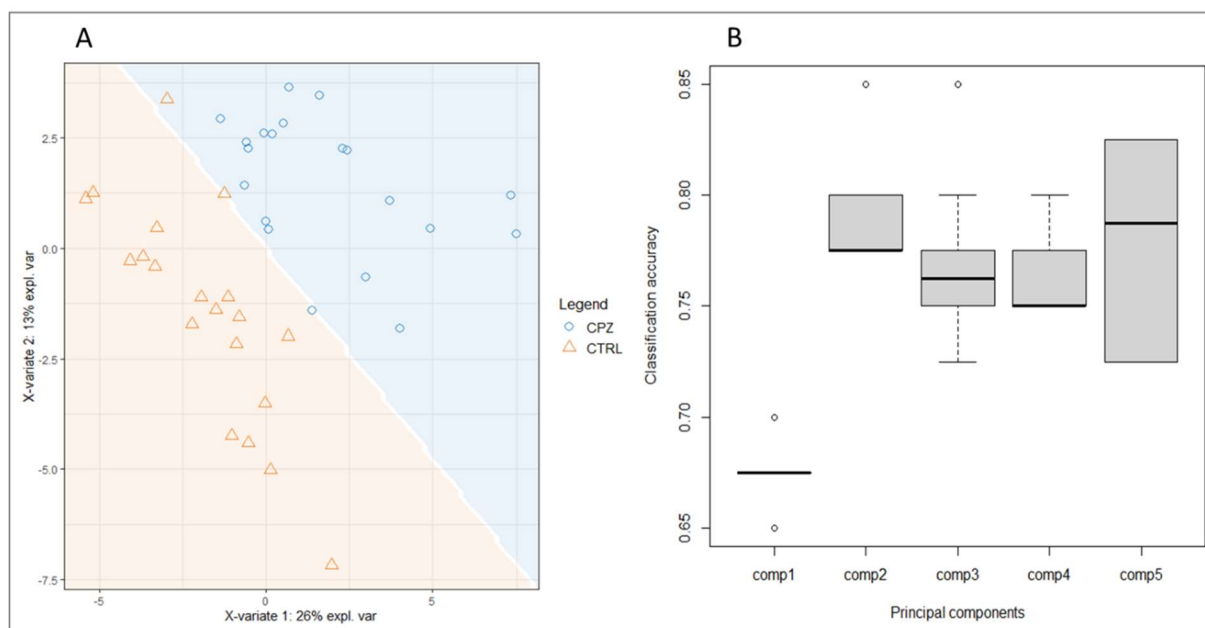


Slika 4.58. TIC normalizirani prosječni spektri masa (600–1000 m/z) odabranih ROI-ja strijatuma (CPu) kontrolnih miševa (*normal diet*) i miševa tretiranih kuprizonom (*cuprizone diet*) 6 mjeseci starosti. TIC – ukupni intenzitet signala m/z kvocijenata.

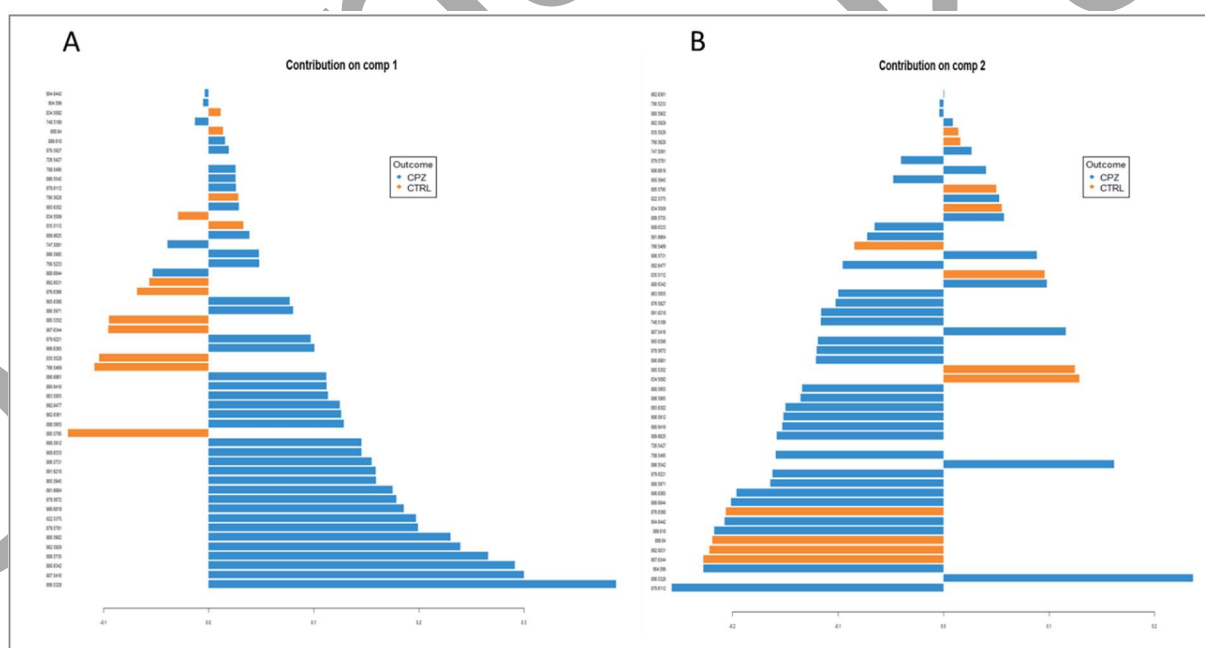
PLS-DA analizom dobiveno je jasno razdvajanje uzoraka između kontrolne i eksperimentalne skupine unutar masenog raspona od 600 do 1000 Da, što upućuje na izražene razlike u lipidnom sastavu CPu miševa 6 mjeseci starosti (Slika 4.59 A). Kod skupine tretirane kuprizonom ponovno je uočena veća varijabilnost podataka u odnosu na kontrolnu skupinu (plavo područje na Slici 4.59 A).

Analiza klasifikacijske točnosti pokazala je da se dovoljan stupanj razdvajanja postiže korištenjem prve dvije glavne komponente (77 %) (Slika 4.59 B). Klasifikacijski model pokazuje dobru sposobnost razlikovanja između skupina.

Analiza doprinosa m/z značajki pokazala je da je za prvu i drugu komponentu izdvojeno po 53 m/z značajke koje najviše pridonose razdvajanju (Slika 4.60 A i B). Na piramidalnim prikazima vidljivo je da većina diferencijalnih značajki pokazuje više intenzitete u CPZ skupini (plavo), dok je manji broj značajki izraženiji u kontrolnoj skupini (narančasto). Najveći doprinos razlikovanju skupina dolazi iz m/z raspona između 650 i 900 Da.

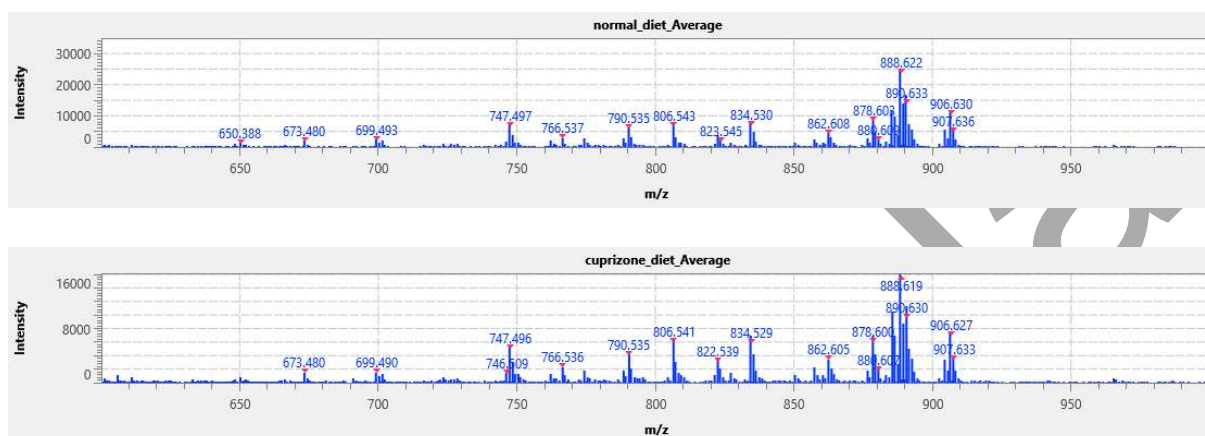


Slika 4.59. PLS-DA analiza strijatuma (CPu) miševa starosti 6 mjeseci. A) PLS-DA prikaz distribucije signala i heterogenosti skupa podataka kontrolne (CTRL) i kuprizonom tretirane skupine miševa (CPZ). Točnost klasifikacije signala CPu miševa starih 6 mjeseci u odgovarajuće skupine unutar masenog raspona od 600 do 1000 Da.



Slika 4.60. Doprinos pojedinih m/z značajki razdvajanju skupina u strijatumu (CPu) miševa starih 6 mjeseci na prvoj (A) i drugoj (B) glavnoj komponenti u PLS-DA analizi. Duljina trake označava relativnu važnost značajke za razdvajanje skupina; boja označava smjer učinka (narančasto = CPZ, plavo = CTRL), a m/z vrijednosti značajki navedene su uz osi.

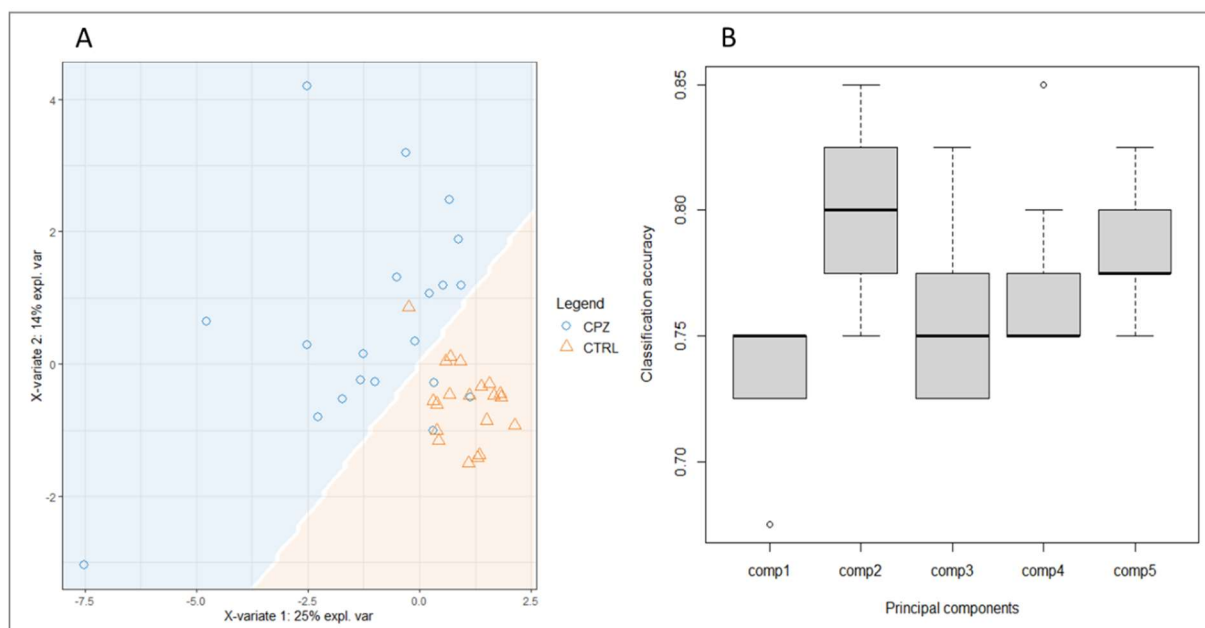
4.4.4. IMS analiza M



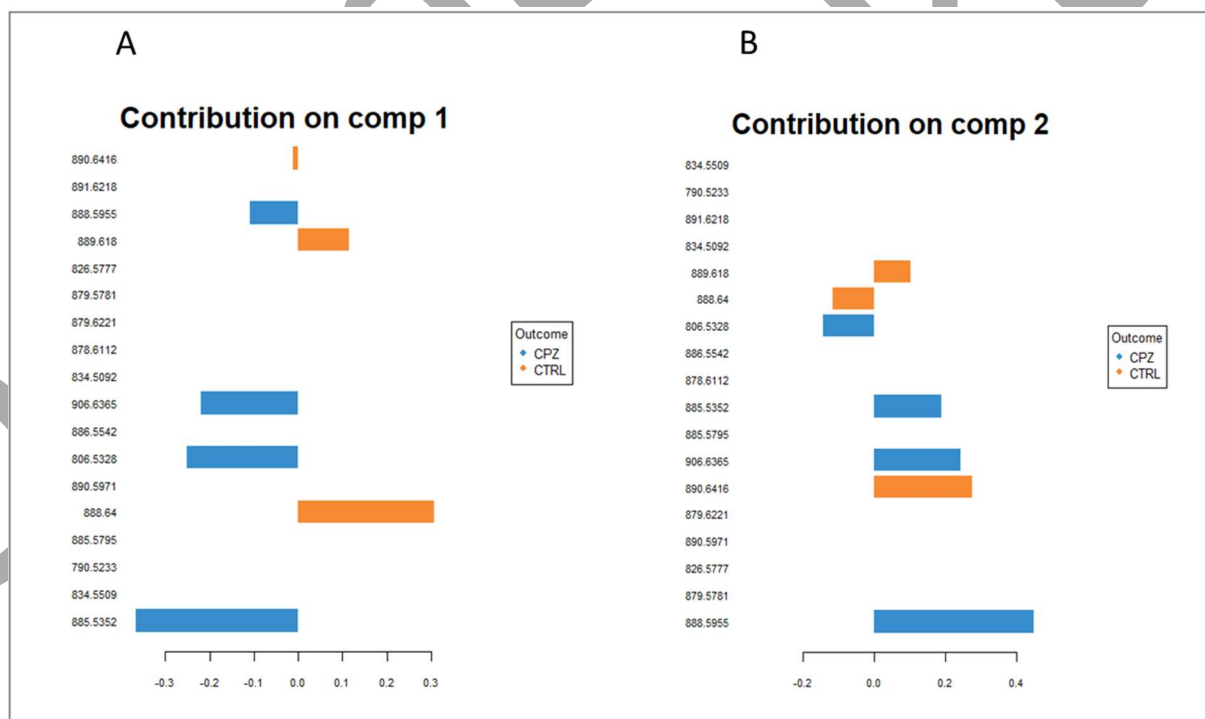
Slika 4.61. TIC normalizirani prosječni spektri masa (600–1000 m/z) odabranih ROI-ja motoričkog korteksa (M) kontrolnih miševa (*normal diet*) i miševa tretiranih kuprizonom (*cuprizone diet*) 3 mjeseca starosti. TIC – ukupni intenzitet signala m/z kvocijenata.

Maseni spektri moždanog tkiva regije M miševa starosti 3 mjeseca analizirani su PLS-DA metodom s ciljem razlikovanja lipidnih profila između kontrolne skupine i skupine tretirane kuprizonom. Na Slici 4.61 prikazano je razdvajanje uzoraka unutar masenog raspona od 600 do 1000 Da, što ukazuje na razlike u sastavu lipidoma između skupina. Uočena je veća heterogenost spektralnih profila kod skupine tretirane kuprizonom (plavo područje) u odnosu na kontrolnu skupinu, što je vidljivo na Slici 4.62 A. Između skupina postoji i određeni stupanj preklapanja signala, što odražava djelomičnu sličnost pojedinih lipidnih značajki.

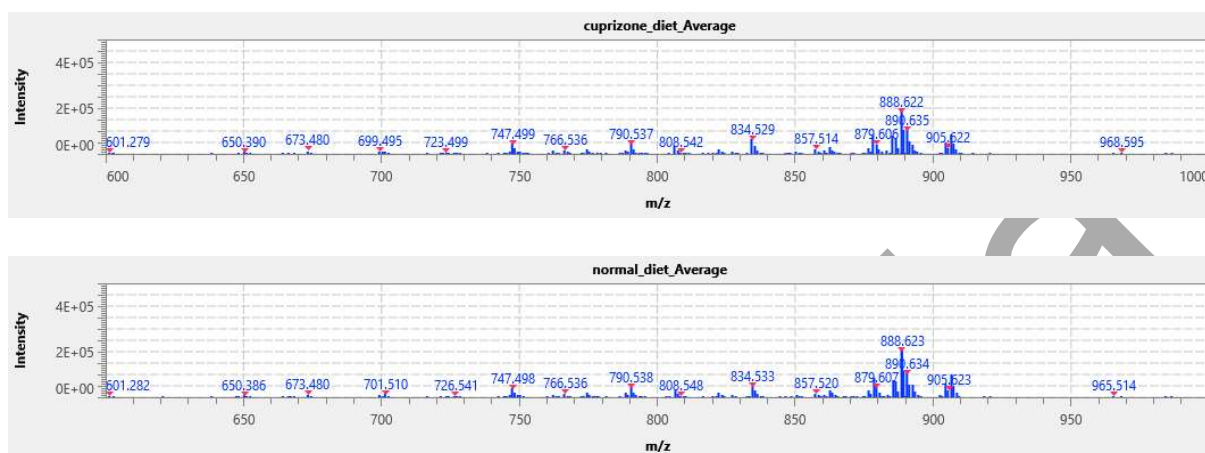
Analiza klasifikacijske točnosti pokazala je da se dovoljan stupanj razdvajanja postiže korištenjem prve dvije komponente, uz klasifikacijsku točnost od približno 80 % (Slika 4.62 B). Analiza doprinosa m/z značajki pokazala je da je za prvu i drugu komponentu izdvojeno po 18 m/z značajki koje najviše pridonose razdvajanju skupina (Slika 4.63 A i B). Na piramidalnim prikazima vidljivo je da dio značajki ima povišene intenzitete u CPZ skupini (plavo), dok je manji broj izraženiji u kontrolnoj skupini (narančasto). Za razliku od prethodnih regija, ovdje je primjetno i veće preklapanje u m/z vrijednostima između skupina.



Slika 4.62. PLS-DA analiza motoričke kore (M) miševa starosti 3 mjeseca. A) PLS-DA prikaz distribucije signala i heterogenosti skupa podataka kontrolne (CTRL) i kuprizonom tretirane skupine miševa (CPZ). B) Točnost klasifikacije signala M miševa starih 3 mjeseca u odgovarajuće skupine unutar masenog raspona od 600 do 1000 Da.



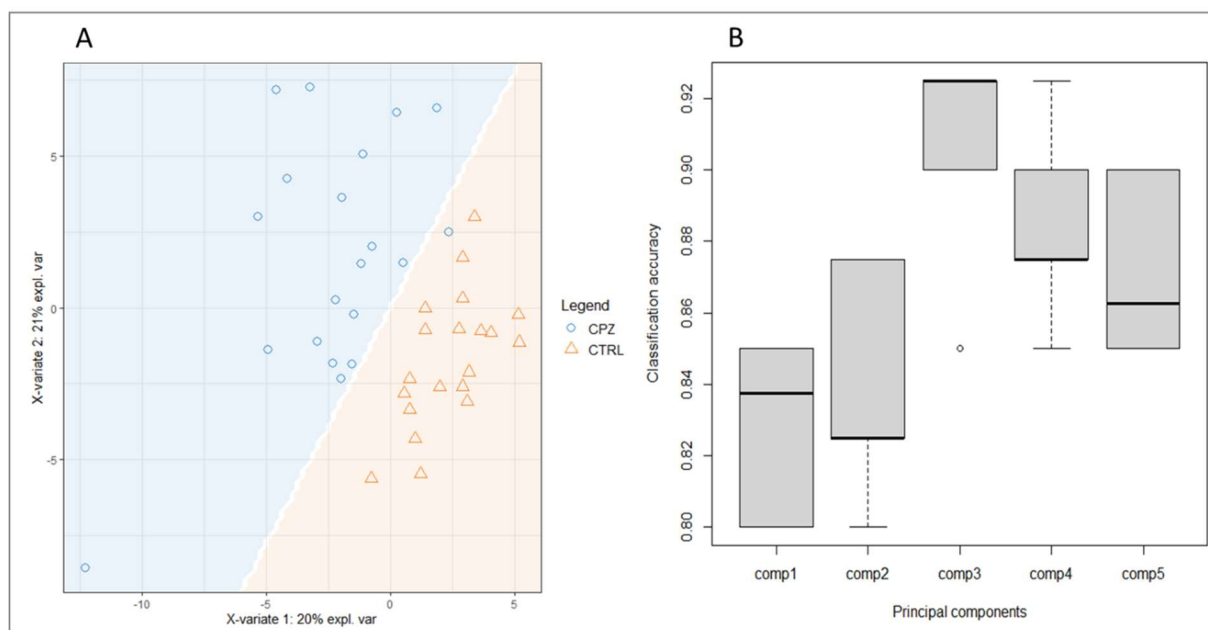
Slika 4.63. Doprinos pojedinih m/z značajki razdvajanju skupina u motoričkoj kori (M) miševa starih 3 mjeseca na prvoj (A) i drugoj (B) glavnoj komponenti u PLS-DA analizi. Duljina trake označava relativnu važnost značajke za razdvajanje skupina; boja označava smjer učinka (narančasto = CPZ, plavo = CTRL), a m/z vrijednosti značajki navedene su uz osi.



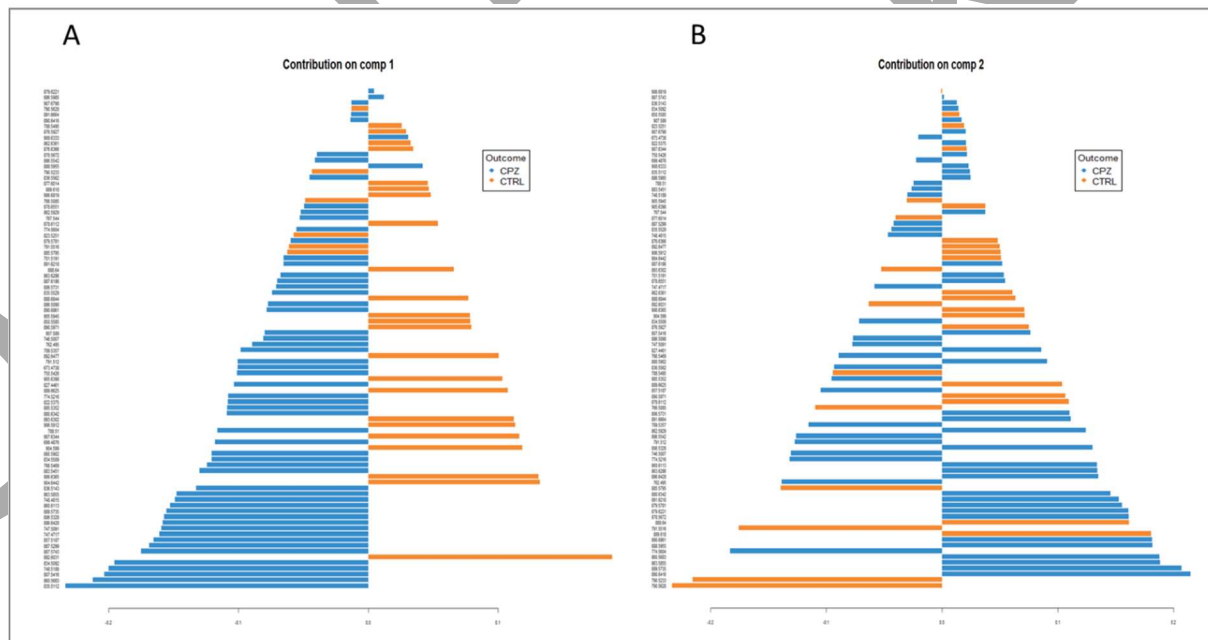
Slika 4.64. TIC normalizirani prosječni spektri masa (600–1000 m/z) odabranih ROI-ja motoričke kore (M) kontrolnih miševa (*normal diet*) i miševa tretiranih kuprizonom (*cuprizone diet*) 6 mjeseci starosti. TIC – ukupni intenzitet signala m/z kvocijenata.

Lipidni profili moždanog tkiva miševa starosti 6 mjeseci analizirani su primjenom PLS-DA metode na IMS podatke u masenom rasponu od 600 do 1000 Da, kako bi se utvrdile razlike između kontrolne skupine i skupine tretirane kuprizonom. Na Slici 4.64 prikazano je jasno razdvajanje skupina, pri čemu uzorci tretirani kuprizonom pokazuju veću varijabilnost skupa u odnosu na kontrolne uzorke (Slika 4.65 A). Također je prisutno određeno preklapanje signala između skupina, što upućuje na djelomičnu sličnost pojedinih lipidnih značajki.

Točnost klasifikacije metabolita u odgovarajuće skupine prikazana je na Slici 4.65 B. Analiza točnosti klasifikacije pokazuje da se dovoljna razdvojenost skupina postiže korištenjem prve dvije glavne komponente (83%). Doprinos pojedinih m/z vrijednosti prikazan je na Slici 4.66 A i B. Za prvu i drugu komponentu izdvojeno je po 87 m/z vrijednosti koje najviše doprinose razdvajanju skupina. Piramidalni prikazi pokazuju da su povišeni intenziteti zabilježeni u obje skupine, s time da je veći broj m/z vrijednosti izražen u CPZ skupini (plavo), dok manji broj pokazuje viši intenzitet signala u kontrolnoj skupini (narančasto).



Slika 4.65. PLS-DA analiza motoričke kore (M) miševa starosti 6 mjeseci. A) PLS-DA prikaz distribucije signala i heterogenosti skupa podataka kontrolne (CTRL) i kuprizonom tretirane skupine miševa (CPZ). B) Točnost klasifikacije signala M miševa starih 6 mjeseci u odgovarajuće skupine unutar masenog raspona od 600 do 1000 Da.



Slika 4.66. Doprinos pojedinih m/z značajki razdvajanju skupina u motoričkoj kori (M) miševa starih 6 mjeseci na prvoj (A) i drugoj (B) glavnoj komponenti u PLS-DA analizi. Duljina trake označava relativnu važnost značajke za razdvajanje skupina; boja označava smjer učinka (narančasto = CPZ, plavo = CTRL), a m/z vrijednosti značajki navedene su uz osi.

Na PLS-DA score plotovima uočen je jasan obrazac razdvajanja intenziteta signala između kontrolnih i kuprizonom tretiranih skupina u svim analiziranim moždanim regijama i dobnim skupinama. Potpuna separacija uzoraka bez preklapanja signala zabilježena je u regijama cc (3 mjeseca), aca (3 i 6 mjeseci) te CPu (3 mjeseca). U cc (6 mjeseci) prisutno je minimalno preklapanje između skupina, dok su kod CPu (6 mjeseci) zabilježena dva signala na granici razdvajanja. U regiji M zabilježeno je blago preklapanje — nekoliko signala kod 3 mjeseca i jedan signal kod 6 mjeseci. Ovi rezultati potvrđuju jasne razlike u lipidnim profilima između promatranih skupina, pri čemu je separacija najizraženija u cc, aca i CPu regijama mlađih životinja, dok se kod starijih uzoraka u nekim regijama bilježi blago preklapanje, što može odražavati povećanu biološku varijabilnost s dobi.

4.4.5. Analiza statistički značajnih m/z signala

Nakon potvrde separacije signala između skupina analizirani su loading vektori, odnosno statistički značajni m/z signali koje su najviše doprinosili razdvajanju skupina. Najveći doprinos imale su ionske vrste u višem masenom rasponu (> 800 m/z), što odgovara fosfolipidima i glikosfingolipidima — molekulama koje su poznati markeri demijelinizacije i procesa starenja u kuprizonskom modelu.

Iz svake piramidalne analize prema prvoj i drugoj komponenti odabrano je po deset najznačajnijih m/z značajki, što je ukupno činilo 160 m/z vrijednosti. Te su vrijednosti zatim pretražene u Metaspace platformi kako bi se dobila okvirna identifikacija potencijalnih molekula. U masenom rasponu od 600 do 1000 m/z anotiran je veći broj signala, pri čemu je za 7 m/z vrijednosti postignut jednoznačan pogodak (tzv. *single hit*), što omogućuje njihovu provizornu identifikaciju s visokom pouzdanošću (Tablica 4.1). Za više od 30 m/z vrijednosti dobiveno je više mogućih identiteta (tzv. *multiple hits*), što je očekivano zbog prisutnosti strukturnih izomera unutar istih klasa lipida. U takvim slučajevima interpretacija se može provoditi na razini lipidne klase, bez određivanja točnog položaja dvostruke veze ili izomernog oblika.

U zabilježenim spektrima dominantno su bile prisutne molekule koje pripadaju glicerofosfolipidima (fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, fosfatidilglicerol) i

sfingolipidima (posebno sulfatidima), što je u skladu s poznatim promjenama lipidne kompozicije u uvjetima demijelinizacije.

Tablica 4.1. Provizorno anotirani m/z vrijednosti s jednoznačnim pogotkom (*single hits*) dobivene IMS analizom mozga miševa tretiranih kuprizonom i kontrolnih miševa. Sve pare usporedbe pokazale su statistički značajne razlike između skupina (Mann-Whitney U test, $P < 0,001$).

Izmjereni m/z	Parna usporedba ($P < 0,001$)	Organizam	Metabolit	Formula	Biološki značaj
807,54	cc: 3CPZ vs 3CTRL, aca: 3CPZ vs 3CTRL, aca: 6CPZ vs 6CTRL, CPu: 6CPZ vs 6CTRL, M: 6CPZ vs 6CTRL	Čovjek	Fosfatidna kiselina	$C_{44}H_{81}O_8P$	prekursor membranskih fosfolipida
888,64	cc: 3CPZ vs 3CTRL, cc: 6CPZ vs 6CTRL, aca: 3CPZ vs 3CTRL, CPu: 6CPZ vs 6CTRL M: 3CPZ vs 3CTRL	Miš	Galabiozilceramid		
			Laktozilceramid		
806,53	cc: 6CPZ vs 6CTRL, aca: 3CPZ vs 3CTRL, M: 6CPZ vs 6CTRL	Miš	3-O-Sulfogalaktozilceramid		
834,51	M: 6CPZ vs 6CTRL	Miš	Fosfatidiletanolamin		
747,51	M: 6CPZ vs 3CTRL	Miš	Fosfatidna kiselina	$C_{44}H_{81}O_8P$	prekursor membranskih fosfolipida
878,57	cc: 3CPZ vs 3CTRL, cc: 6CPZ vs 6CTRL, aca: 3CPZ vs 3CTRL, aca: 6CPZ vs 6CTRL, CPu: 3 CPZ vs 3CTRL, CPu: 6 CPZ vs 6CTRL	Miš	Fosfatidilkolin		

cc – *corpus callosum*; aca – prednja komisura; CPu – strijatum; M – motorička kora; 3CTRL i 6CTRL – kontrolna skupina 3 i 6 mjeseci starosti; 3CPZ i 6CPZ – skupine tretirane kuprizonom 3 i 6 mjeseci starosti.

Osim navedenih molekula s jednoznačnim pogotkom, uočeni su i signali kod kojih je zabilježeno postojanje strukturnih izomera unutar iste klase lipida, takozvani *multiple hits*. Primjeri uključuju fosfatidnu kiselinu s m/z 823.52 i tri izomera, fosfatidilserin s m/z 890.59 i deset izomera, fosfatidilglicerol s m/z 795.52 i trinaest izomera te fosfatidilkoline s m/z 822.54 i 904.59 i trideset dva, odnosno šest izomera. Kod ovih molekula nije bilo moguće razlikovati pojedinačne izomere zbog ograničenja masene spektrometrije u pogledu određivanja položaja dvostrukih veza i rasporeda masnih kiselina. Stoga se promjene ovih molekula mogu prikazati

isključivo na razini lipidne klase, bez točne strukturalne atribucije pojedinih izomera (Tablica 4.2).

Tablica 4.2. Provizorno anotirane m/z vrijednosti s višestrukim mogućim identitetima (*multiple hits*) dobivene IMS analizom mozga miševa tretiranih kuprizonom i kontrolnih miševa. Sve parne usporedbe pokazale su statistički značajne razlike između skupina (Mann–Whitney U test, $P < 0,0001$).

Izmjereni m/z	Parna usporedba	Organizam	Metabolit	Broj izomera	Formula	Biološki značaj
823,52	cc: 3CPZ vs 3CTRL, aca: 6CPZ vs 6CTRL	Miš	Fosfatidna kiselina	3	$C_{47}H_{77}O_8P$	strukturalna i signalizacijska uloga u membrani
890,59	cc: 3CPZ vs 3CTRL, cc: 6CPZ vs 6CTRL, aca: 3CPZ vs 3CTRL, M: 3CPZ vs 3CTRL	Miš	Fosfatidilserin	10	$C_{50}H_{86}NO_{10}P$	strukturalna i fluidnost membrana, sinaptička signalizacija
795,52	aca: 3CPZ vs 3CTRL	Miš	Fosfatidilglicerol	13	$C_{44}H_{77}O_{10}P$	strukturalna i fluidnost membrane
822,54	cc: 6CPZ vs 6CTRL	Miš	Fosfatidilkolin	32	$C_{44}H_{82}NO_8P$	strukturalna membrane, signalizacija
904,59	aca: 6CPZ vs 6CTRL, CPu: 3CPZ vs 3CTRL, CPu: 6CPZ vs 6CTRL	Miš	Fosfatidilkolin	6	$C_{52}H_{84}NO_8P$	strukturalna i fluidnost membrane
822,53	cc: 3CPZ vs 3CTRL, aca: 3CPZ vs 3CTRL, aca: 6CPZ vs 6CTRL, CPu: 3CPZ vs 3CTRL, CPu: 6CPZ vs 6CTRL	Miš	Fosfatidiletanolamin	28	$C_{45}H_{78}NO_{10}P$	strukturalna i fluidnost membrane
810,53	cc: 3CPZ vs 3CTRL, CPu: 3CPZ vs 3CTRL	Miš	Fosfatidilserin	22	$C_{44}H_{78}NO_{10}P$	strukturalna i fluidnost membrana, sinaptička signalizacija
886,55	cc: 3CPZ vs 3CTRL, M: 3CPZ vs 3CTRL	Miš	Fosfatidilserin	14	$C_{48}H_{82}NO_{10}P$	strukturalna membrana, signalizacija
834,55	M: 3CPZ vs 3CTRL	Miš	Fosfatidilkolin	43	$C_{45}H_{82}NO_8P$	strukturalna i fluidnost membrane
790,52	M: 3CPZ vs 3CTRL, M: 6CPZ vs 6CTRL	Miš	Fosfatidiletanolamin	13	$C_{43}H_{78}NO_7P$	strukturalna i fluidnost membrane, metabolizam
885,57	M: 3CPZ vs 3CTRL	Miš	Fosfatidilglicerofosfat	2	$C_{44}H_{88}O_{13}P_2$	strukturalna membrane
888,64	cc: 6CPZ vs 6CTRL, aca: 3CPZ vs 3CTRL, CPu: 6CPZ vs 6CTRL, M: 3CPZ vs 3CTRL	Miš	Fosfatidilkolin	16	$C_{52}H_{92}NO_8P$	strukturalna i fluidnost membrane
906,63	cc: 3CPZ vs 3CTRL, aca: 3CPZ vs 3CTRL, M: 3CPZ vs 3CTRL	Miš	Fosfatidiletanolamin	14	$C_{49}H_{74}NO_8P$	strukturalna i fluidnost membrane, metabolizam
889,66	aca: 3CPZ vs 3CTRL	Miš	Triglicerid dipalmitoleinske kiseline	50	$C_{55}H_{94}O_6$	izvor energije

806,57	aca: 3CPZ vs 3CTRL	Miš	Fosfatidilkolin	48	C ₄₆ H ₈₀ NO ₈ P	struktura i fluidnost membrane
795,52	aca: 3CPZ vs 3CTRL	Miš	Fosfatidilglicerol	13	C ₄₄ H ₇₇ O ₁₀ P	struktura i fluidnost membrane
824,55	CPU: 3CPZ vs 3CTRL	Miš	Fosfatidilkolin	31	C ₄₄ H ₈₄ NO ₈ P	struktura i fluidnost membrane
889,57	cc: 3CPZ vs 3CTRL, aca: 3CPZ vs 3CTRL, CPu: 3CPZ vs 3CTRL, CPu: 6CPZ vs 6CTRL, M: 6CPZ vs 6CTRL	Miš	Fosfatidilinozitol	3	C ₄₅ H ₈₇ O ₁₃ P	struktura membrane, prekursor signalnih fosfoinozitida
880,59	CPu: 3CPZ vs 3CTRL, CPu: 6CPZ vs 6CTRL	Miš	Fosfatidilkolin	6	C ₅₂ H ₈₄ NO ₈ P	struktura i fluidnost membrane
891,66	cc: 6CPZ vs 6CTRL	Miš	Distearidonska kiselina	2	C ₅₉ H ₈₈ O ₆	metabolizam lipida
822,54	cc: 6CPZ vs 6CTRL	Miš	Fosfatidilkolin	32	C ₄₄ H ₈₂ NO ₈ P	struktura i fluidnost membrane
876,59	cc: 6CPZ vs 6CTRL	Miš	Fosfatidilkolin	37	C ₄₈ H ₈₈ NO ₈ P	struktura i fluidnost membrane
860,56	cc: 6CPZ vs 6CTRL	Štakor	Fosfatidiletanolamin	42	C ₄₇ H ₈₄ NO ₈ P	struktura i fluidnost membrane, metabolizam
748,52	M: 6CPZ vs 6CTRL	Čovjek	Fosfatidilserin	2	C ₃₉ H ₇₆ NO ₁₀ P	struktura membrane, signalizacija
892,60	M: 6CPZ vs 6CTRL	Miš	Fosfatidiletanolamin	33	C ₅₀ H ₈₈ NO ₁₀ P	struktura i fluidnost membrane, metabolizam
887,57	M: 6CPZ vs 6CTRL	Miš	Fosfatidilinozitol	8	C ₄₇ H ₈₅ O ₁₃ P	struktura membrane, prekursor signalnih fosfoinozitida
857,51	M: 6CPZ vs 6CTRL	Miš	Fosfatidilinozitol	14	C ₄₅ H ₇₉ O ₁₃ P	struktura membrane, prekursor signalnih fosfoinozitida
747,50	M: 6CPZ vs 6CTRL	Miš	Fosfatidilglicerol	6	C ₄₀ H ₇₇ O ₁₀ P	struktura i fluidnost membrane
904,59	aca: 6CPZ vs 6CTRL	Miš	Fosfatidilkolin	6	C ₅₂ H ₈₄ NO ₈ P	struktura i fluidnost membrane
893,67	aca: 6CPZ vs 6CTRL	Miš	Triglicerid monodokozaheksaenske kiseline	13	C ₅₉ H ₉₀ O ₆	metabolizam lipida, energija
906,59	cc: 3CPZ vs 3CTRL, aca: 3CPZ vs 3CTRL	Miš	Fosfatidilkolin	4	C ₅₂ H ₈₆ NO ₈ P	struktura i fluidnost membrane
881,60	cc: 3CPZ vs 3CTRL	Miš	Triglicerid monoekozapentaenske kiseline	3	C ₅₅ H ₈₆ O ₆	metabolizam lipida, energija
888,59	M: 3CPZ vs 3CTRL, M: 6CPZ vs 6CTRL	Miš	Fosfatidiletanolamin	30	C ₄₉ H ₈₈ NO ₈ P	struktura i fluidnost membrane, metabolizam
885,57	M: 3CPZ vs 3CTRL	Miš	Fosfatidilglicerofosfat	2	C ₄₄ H ₈₈ O ₁₃ P ₂	struktura i fluidnost membrane

908,63	cc: 6CPZ vs 6CTRL, aca: 3CPZ vs 3CTRL, aca: 6CPZ vs 6CTRL	Miš	Fosfatidiletanolamin	14	C ₅₁ H ₉₀ NO ₁₀ P	struktura i fluidnost membrane, metabolizam
888,55	aca: 3CPZ vs 3CTRL	Miš	Dimetilfosfatidiletanola min	4	C ₅₁ H ₈₀ NO ₈ P	struktura i fluidnost membrane, metabolizam
889,66	CPu: 3CPZ vs 3CTRL	Miš	Triglicerid dipalmitoleinske kiseline	50	C ₅₅ H ₉₄ O ₆	metabolizam lipida, energija
751,55	CPu: 3CPZ vs 3CTRL	Miš	Fosfatidilglicerol	7	C ₄₀ H ₇₉ O ₁₀ P	struktura i fluidnost membrane, metabolizam
775,52	CPu: 3CPZ vs 3CTRL	Miš	Fosfatidna kiselina	12	C ₄₅ H ₇₅ O ₈ P	struktura i fluidnost membrane, metabolizam
907,63	cc: 6CPZ vs 6CTRL, CPu: 6CPZ vs 6CTRL	Miš	Fosfatidilkolin	10	C ₅₁ H ₉₁ NO ₁₀ P	struktura i fluidnost membrane, metabolizam
905,59	cc: 6CPZ vs 6CTRL	Miš	Fosfatidiletanolamin	14	C ₄₁ H ₇₄ NO ₇ P	struktura i fluidnost membrane, metabolizam
862,63	cc: 6CPZ vs 6CTRL	Štakor	Fosfatidilkolin	24	C ₅₀ H ₈₈ NO ₈ P	struktura i fluidnost membrane, metabolizam
788,54	cc: 6CPZ vs 6CTRL	Miš	Fosfatidilserin	12	C ₄₂ H ₈₀ NO ₁₀ P	struktura membrane, signalizacija
790,56	M: 6CPZ vs 6CTRL	Miš	Fosfatidilserin	12	C ₄₂ H ₈₀ NO ₁₀ P	struktura membrane, signalizacija
774,56	M: 6CPZ vs 6CTRL	Miš	Fosfatidilserin	5	C ₄₂ H ₈₂ NO ₁₀ P	struktura membrane, signalizacija
892,60	aca: 6CPZ vs 6CTRL, CPu: 6CPZ vs 6CTRL	Miš	Fosfatidiletanolamin	33	C ₅₀ H ₈₈ NO ₁₀ P	struktura i fluidnost membrane, metabolizam
823,56	aca: 6CPZ vs 6CTRL	Čovjek	Fosfatidna kiselina	12	C ₄₅ H ₈₅ O ₈ P	struktura i fluidnost membrane, metabolizam
878,61	CPu: 6CPZ vs 6CTRL	Čovjek	Fosfatidilkolin	30	C ₄₈ H ₉₀ NO ₈ P	struktura i fluidnost membrane, metabolizam
876,63	CPu: 6CPZ vs 6CTRL	Čovjek	Fosfatidilkolin	25	C ₄₈ H ₉₂ NO ₈ P	struktura i fluidnost membrane, metabolizam

cc – *corpus callosum*; aca – prednja komisura; CPu – strijatum; M – motorička kora; 3CTRL i 6CTRL – kontrolna skupina 3 i 6 mjeseci starosti; 3CPZ i 6CPZ – skupine tretirane kuprizonom 3 i 6 mjeseci starosti.

5. RASPRAVA

Kuprizonski model predstavlja standardiziran i reproducibilan sustav za proučavanje demijelinizacije i spontanog oporavka (remijelinizacije) u SŽS-u, bez izravne aktivacije adaptivnog imunskog odgovora. Na taj način omogućuje razdvajanje toksično-metaboličkih učinaka na oligodendrocite od sekundarne neuroinflamacije i neuronske degeneracije, uz jasnu izraženu regionalnu osjetljivost, osobito u području žuljevitog tijela i moždane kore (93). Dob životinja pri tome značajno modulira tijek oštećenja i oporavka, starija dob povezana je s većim gubitkom aksona i slabijom remijelinizacijom nakon prestanka izlaganja kuprizonu (94). Zbog jasno definiranih etioloških mehanizama, ovaj model je prikladan za integraciju funkcionalnih, histoloških, imunohistokemijskih i lipidomskih analiza (95). Posebna pažnja je posvećena kompleksnim gangliozidima kao ključnim komponentnama lipidnih splavi, mikrodomena koje organiziraju membranske proteine i posredno stabiliziraju aksone i mijelinsku ovojnici. (61, 96). Budući da su GM1 te GD1a/GT1b ligandi za MAG u akson-glijalnim spojevima paranodalne regije, promjene u njihovom rasporedu ili distribuciji mogu osjetljivo signalizirati narušenu membransku arhitekturu i paranodalnu organizaciju, što remeti razdvajanje ionskih kanala i usporava saltatornu provodljivost, često i prije grubih morfoloških promjena mijelina (21). Također, dobro je poznato da kuprizon izaziva mjerljive motoričke deficite, primjerice na rotarodu, koji odražavaju disfunkciju mreža za ravnotežu i koordinaciju, pri čemu je dio tih promjena reverzibilan s vremenom (97).

U okviru ovog istraživanja integrirani su bihevioralni testovi (analiza otiska stopala, rotarod i activity cage), histološka i imunohistokemijska analiza te slikovna spektrometrija masa (MALDI-TOF IMS) uz primjenu nadzirane multivarijatne analize (PLS-DA) u više regija (cc, aca, Cpu i M) i u dvije dobne skupine (3 i 6 mjeseci). Time se omogućilo ispitivanje povezanosti funkcionalnih odstupanja i molekularnih profila u dobnim kontekstima različite plastičnosti. PLS-DA modeli dosljedno razdvajaju uzorke kontrolnih i kuprizonom tretiranih životinja, uz veću heterogenost u CPZ skupinama, što podupire postojanje jasno razlučivih metabolomskih potpisa nakon izlaganja kuprizonu (98).

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati specifične učinke kuprizona u različitim dobnim skupinama na funkcionalne promjene, molekularne markere i lipidni profil u mozgu miševa. Kuprizon kao često korišteni model demijelinizacije omogućuje proučavanje mehanizama gubitka mijelina i potencijala oporavka u različitim regijama mozga. Primjenom integriranog

pristupa koji uključuje bihevioralne testove, histološku i imunohistokemijsku analizu te MALDI-TOF IMS, sustavno su povezane funkcionalne promjene s histološkim i molekularnim pokazateljima. Iako je poznato da starija dob predstavlja važan čimbenik rizika za smanjenu regeneraciju i izraženije neurodegenerativne promjene (98), većina dosadašnjih istraživanja nije sustavno razmatrala razlike između dobnih skupina u kontekstu demijelinizacije i reorganizacije membranskih komponenti. Ovo istraživanje nadopunjuje to područje integriranim pristupom i analizom podataka u više moždanih regija, čime se dobiva cjelovit uvid u obrasce oštećenja i ranog oporavka nakon izlaganja kuprizonu.

5.1. Bihavioralni testovi

Kako bi se procijenio učinak kuprizona na motoričke funkcije, provedena su tri komplementarna bihevioralna testa: analiza otiska šapica, rotarod i *activity cage*, u različitim vremenskim točkama nakon završetka tretmana. Ovi testovi omogućuju detaljnu procjenu koordinacije pokreta, ravnoteže, izdržljivosti i spontanog kretanja čime se dobiva uvid u funkcionalne promjene izazvane demijelinizacijom (97).

Analiza otiska šapica pokazala je da kuprizon uzrokuje prolazne promjene u obrascu hoda, koje su bile najuočljivije drugog dana nakon završetka tretmana, dok su se u kasnijim vremenskim točkama (10. i 20. dan) razlike među skupinama postupno smanjivale. Skraćenje duljine koraka bilo je najuočljivije u mlađoj kuprizonskoj skupini (3CPZ) u usporedbi sa starijom kontrolnom skupinom (6CTRL), dok širina hoda nije pokazala značajne razlike između skupina ni u jednoj vremenskoj točki. Ovakav obrazac upućuje na to da kuprizon ponajprije utječe na koordinaciju pokreta i stabilnost koraka, a ne na strategiju hoda u cjelini. Budući da su parametri hoda osjetljivi na poremećaje u kortikospinalno–cerebelarnim krugovima, promjene duljine koraka mogu poslužiti kao raniji i osjetljiviji pokazatelj funkcionalnih poremećaja prije pojave izraženijih motoričkih deficita (99). Prolazna priroda ovih promjena može odražavati reverzibilne funkcionalne učinke nakon prestanka tretmana, što je u skladu s prijašnjim istraživanjima kuprizonskog modela koja pokazuju da su motorički deficiti najizraženiji neposredno nakon demijelinizacije, uz postupni oporavak tijekom remijelinizacije (61, 100). No također je moguće da se radi i o akutnom toksičnom učinku kuprizona. Zanimljivo je da su razlike su bile izraženije između mlađih tretiranih i starijih kontrolnih životinja dok u starijih skupina kuprizon nije dodatno pogoršao duljinu koraka. Ovakav obrazac može odražavati činjenicu da starija dob sama po sebi utječe na motoričke

obrasce, što relativni učinak kuprizona u toj dobnoj skupini čini manje izraženim (101). Odsutnost trajnih promjena u širini koraka upućuje na to da životinje nisu razvile kompenzacijske strategije za održavanje ravnoteže, već je deficit bio prolazan i selektivno zahvatio duljinu koraka, što je u skladu s idejom da su promjene u duljini koraka indirektan, ali koristan pokazatelj poremećene integracije kortikospinalnih puteva i cerebelarne kontrole motoričkih funkcija (102).

Rotarod test, koji istodobno procjenjuje ravnotežu, koordinaciju, izdržljivost i sposobnost prilagodbe ubrzanju, osjetljiv je na poremećaje unutar motoričkih neuronskih krugova, uključujući interhemisferne veze preko žuljevitog tijela, projekcije iz motoričkog korteksa i cerebelarne izlazne puteve (103). Analizom podataka uočene su jasne dobne razlike u odgovoru na kuprizon: starija skupina izložena kuprizonu (6CPZ) pokazuje značajno kraće vrijeme zadržavanja na rotarodu u usporedbi s odgovarajućom kontrolnom skupinom (6CTRL) 2. i 10. dana nakon završetka tretmana, dok su se razlike do 20. dana izgubile. U mlađoj dobi (3CPZ) zabilježen je trend kraćeg vremena zadržavanja u odnosu na 3CTRL, ali bez statističke značajnosti. Ovaj obrazac upućuje na to da rotarod detektira akutne i subakutne funkcionalne posljedice izlaganja kuprizonu, uz postupnu normalizaciju izvedbe do trećeg tjedna nakon tretmana. Opaženi tijek može odražavati reverzibilne toksične učinke kuprizona na energetske metabolizam i homeostazu metala (posebno bakra) te posljedično smanjenu izdržljivost i lošiju posturalnu kontrolu koji se povlače nakon prekida tretmana uz mogući doprinos početnih procesa remijelinizacije u motoričkim mrežama (104).

Izraženiji i dugotrajniji deficit u starijoj skupini upućuje na važnu ulogu dobi u moduliranju funkcionalnog učinka kuprizona. Starije životinje imaju veću bazalnu varijabilnost, manju plastičnost i sporiji oporavak, što može produljiti i pojačati funkcionalni učinak i uz sličan stupanj početnog oštećenja. Postavljanje gornje granice od 300 sekundi (tzv. *ceiling* efekt) kod kontrolnih životinja mogao je donekle smanjiti osjetljivost testa u mlađih skupina (103). Unatoč tome, značajne razlike u starijoj skupini u ranim vremenskim točkama jasno ukazuju na biološki relevantan učinak. U kombinaciji s testom otiska šapica, rezultati rotaroda potvrđuju prisutnost ranih motoričkih deficita nakon izlaganja kuprizonu koji su izraženiji u starijih životinja.

Test motoričke aktivnosti pruža uvid u spontano kretanje i istraživačko ponašanje u novom okruženju te nadopunjuje test otiska šapica i rotarod test. Ova metoda omogućuje razlikovanje inicijalnog odgovora na novo okruženje (1. minuta) od održavanja aktivnosti (4. minuta mjerenja), čime se dobiva precizniji uvid u dinamiku lokomotorike i adaptacije (105).

Drugog dana nakon završetka tretmana, 3CPZ skupina pokazala je značajno veću horizontalnu aktivnost u odnosu na odgovarajuću kontrolu i obje starije skupine. Ovakav pojačani inicijalni odgovor može odražavati pojačanu eksploraciju prostora i/ili disinhibiciju motoričkih krugova, što je ranije opisano u modelima reverzibilne toksičnosti i akutne funkcionalne deregulacije (106). Budući da u istoj fazi nisu zabilježene razlike u vertikalnoj aktivnosti, učinak kuprizona očituje se prvenstveno na horizontalnom kretanju (107). Patofiziološki bi ovaj rani porast aktivnosti mogao biti posljedica reverzibilnih toksičnih učinaka kuprizona na sustave koji reguliraju tonus i budnost (npr. energetski metabolizam i neuroglijalnu homeostazu), ali i funkcionalne deregulacije motoričkih krugova uključenih u orijentaciju i inicijaciju kretanja. Nakon početnog porasta aktivnosti, već u četvrtoj minuti 3CPZ pokazuje smanjenu horizontalnu aktivnost u odnosu na 3CTRL i 6CTRL (2. dan), dok u starijih skupina razlike nisu bile prisutne. Ovakav preokret ukazuje na ubranu habituaciju i/ili povećan umor, odnosno kompromitiranu sposobnost održavanja aktivnosti. Sličan obrazac vidljiv je i u rotarod testu gdje mlađe životinje pokazuju blaže i prolazne promjene, dok je kod starijih izraženiji i dugotrajniji funkcionalni deficit (61).

Vertikalna aktivnost pokazala je zanimljiv obrazac: u prvoj minuti nije bilo razlika među skupinama, dok je u četvrtoj minuti 3CPZ skupina zadržala višu razinu vertikalne aktivnosti u usporedbi sa 6CPZ. To može ukazivati na razlike u istraživačkom pogonu i/ili posturalnim kapacitetima ovisne o dobi. Starije životinje pokazuju nižu vertikalnu aktivnost neovisno o tretmanu, što je u skladu s ranijim istraživanjima koja opisuju smanjenu eksploraciju i posturalnu kontrolu s dobi (108). Izostanak razlika između 6CTRL i 6CPZ upućuje na to da kuprizon nije dodatno smanjio već bazalno nižu vertikalnu aktivnost starijih životinja.

U kasnijim vremenskim točkama (10. i 20. dan) razlike u horizontalnoj i vertikalnoj aktivnosti više nisu bile prisutne. Ovakav rezultat odgovara obrascu prolazne disfunkcije spontane motorike nakon izlaganja kuprizonu, uz naknadnu normalizaciju kako prestaju akutni toksični učinci i aktiviraju se kompenzacijski mehanizmi poput habituacije i učinkovitije regulacije pobuđenosti (109). Važno je napomenuti da odsutnost kasnih razlika u *activity cageu* ne isključuje postojanje suptilnih deficita u zadacima koji zahtjevaju veću koordinaciju i ravnotežu (npr. rotarod), već ukazuje na bržu funkcionalnu normalizaciju spontanog kretanja u odnosu na koordinirane motoričke zadatke.

Kada se svi bihevioralni testovi promotre zajedno, dobiva se konzistentan obrazac: rani poremećaji su prisutni u svim testovima, ali se njihov profil i trajanje razlikuju ovisno o dobi i zahtjevnosti zadatka. U mlađih životinja prevladavaju fenomeni disinhibicije i brze habituacije,

dok starije životinje pokazuju izraženiji i dulgotrajniji deficit u složenijim zadacima. Većina razlika nestaje do 20. dana, što podupire tumačenje o reverzibilnim funkcionalnim učincima kuprizona i dobnim razlikama u kapacitetu za oporavak (61).

5.2. Histološka i imunohistokemijska analiza mijelina

Histološko bojanje LFB i imunohistokemijska analiza mijelinskih proteina (MAG i MBP) korišteni su komplementarno kako bi se procijenile morfološke i molekularne promjene mijelina nakon izlaganja kuprizonu. Dok LFB prikazuje globalni integritet i distribuciju mijelina u mozgu, imunohistokemijsko bojanje MAG-a i MBP-a omogućuje detekciju specifičnih aspekata mijelinske strukture i organizacije. MAG je lokaliziran u periaksonalnom području i paranodijima te je osjetljiv na rane promjene u interakcijama aksona i glija stanica, dok MBP pokazuje kompaktnost mijelinske ovojnice (14, 21). Kombinacija ovih metoda omogućila je detaljniju interpretaciju promjena uzrokovanih kuprizonom od one koja bi bila moguća primjenom samo jedne tehnike.

Rezultati histološkog bojanja pokazali su da kuprizon izaziva promjene intenziteta LFB bojenja koje odražavaju gubitak mijelina najizraženije u moždanim strukturama cc i aca što je u skladu s poznatom regionalnom selektivnošću modela (93). U CPu su promjene bile prisutne, ali umjerenijeg intenziteta, dok je u M detektirana manja varijabilnost i slabiji kontrast. To se može objasniti činjenicom da je LFB manje osjetljiv u područjima s nižim sadržajem mijelina. Kvantifikacija intenziteta bojenja potvrdila je značajne razlike između kontrolnih i kuprizonom tretiranih skupina, uz izraženije sniženje signala u starijoj dobi.

Rezultati imunohistokemijske analize MAG-a i MBP-a uvelike podupiru histološke rezultate, ali daju dodatne uvide u prostorne i starosne obrasce promjena. Smanjena imunoreaktivnost MAG-a zabilježena je u cc i aca nakon tretmana kuprizonom, što ukazuje na ranu destabilizaciju interakcija aksona i glije, dok je smanjenje MBP-a vidljivo u istim regijama i odražava gubitak kompaktne mijelinske ovojnice. Ovi obrasci su izraženiji u starijih životinja, što je u skladu s ranijim nalazima da starija dob modulira intenzitet demijelinizacije i ograničava učinkovitost remijelinizacijskih procesa (94). U CPu su promjene MAG-a i MBP-a bile slabije izražene, dok je u M zabilježen heterogen i blaži signal, što vjerojatno odražava niži bazalni sadržaj mijelina i manju osjetljivost metode.

Usporedba LFB i imunohistokemijskih nalaza pokazuje da regije s najnižim intenzitetom LFB bojanja pokazuju i izražene promjene MAG-a i MBP-a, dok su u područjima

s manjim histološkim promjenama imunohistokemijski signali osjetljiviji i detektiraju slabije poremećaje (npr. MAG u ranom stadiju). Ovakav rezultat je u skladu s prijašnjim istraživanjima koja ukazuju na veću osjetljivost imunohistokemijskih biljega za detekciju ranih ili djelomičnih promjena u mijelinskoj arhitekturi u usporedbi s klasičnim histološkim bojenjem (95).

Zajednički LFB i imunohistokemijska analiza MAG-a i MBP-a pružju komplementarne informacije: LFB omogućuje uvid u globalne obrasce demijelinizacije, dok imunohistokemija otkriva rane i dobno uvjetovane promjene u specifičnim mijelinskim komponentama. Ovi podaci čine osnovu za kasnije tumačenje rezultata gangliozida i IMS analize, jer mijelinski integritet izravno utječe na sastav lipidnih domena i organizaciju membranskih struktura.

5.3. Imunohistokemijska analiza kompleksnih gangliozida

Gangliozidi su sijalizirani glikosfingolipidi koji čine ključne strukturne i funkcionalne komponente staničnih membrana u SŽS (95). Esencijalni su za organizaciju membranskih mikrodomena (lipidnih splavi) u neuronima i gliji u kojima su usidreni i proteini važni za stabilnost mijelinske ovojnice, komunikaciju između aksona i glije te sinaptičku signalizaciju. GM1 i GD1a često se ističu kao strukturni organizatori ovih domena povezanih s paranodalnim i internodalnim područjima te sudjeluju u interakcijama s mijelinskim proteinom MAG, dok GD1b i GT1b češće pokazuju stabilnije obrasce i regionalno specifično ponašanje povezano s aksonalno-paranodalnim strukturama (110). Upravo zbog tih različitih funkcionalnih uloga, promjene u izražaju GM1 i GD1a mogu ukazivati na rane poremećaje arhitekture membranskih domena i deregulaciju procesa ovisnih o lipidnim splanima, što se može odraziti na stabilnost mijelina, provođenje impulsa i neuronsku komunikaciju (21). Nasuprot tome, stabilnost GD1b i GT1b može upućivati na očuvanje strukturno postojanijih membranskih domena u aksonalno-paranodalnim područjima, koje su manje podložne ranim toksičnim učincima kuprizona. U ovom istraživanju imunohistokemijski je analiziran uzorak GM1, GD1a, GD1b i GT1b u više moždanih regija kako bi se prepoznale selektivne promjene membranskih mikrodomena nakon izlaganja kuprizonu. U rezultatima se kroz više regija dosljedno ponavlja selektivno smanjenja GM1 i GD1a, dok su GD1b i GT1b uglavnom stabilni ili pokazuju manje izražene promjene. Takav obrazac ukazuje na to da kuprizon primarno zahvaća određene, funkcionalno ključne domene (GM1 i GD1a), umjesto da neselektivno utječe na sve kompleksne gangliozide. Selektivnost promjena važna je jer može poslužiti kao osjetljiv pokazatelj ranih membranskih

disfunkcija u kuprizonskom modelu, koje prethode ili prate morfološke i funkcionalne promjene mijelina.

U cc obje dobne skupine tretirane kuprizonom (3CPZ i 6 CPZ) pokazuju sniženje razina GM1 i GD1a u usporedbi sa kontrolama dok za GD1b i GT1b nisu uočene značajne promjene. Takav obrazac ukazuje na selektivnu osjetljivost membranskih mikrodomena bogatih GM1 i GD1a u aksonima cc koje su ključne za organizaciju lipidnih splavi i signalne komplekse umjesto na globalnu depleciju kompleksnih gangliozida. Funkcionalno gledano, sniženje GM1 i GD1a vjerojatno narušava interakcije aksona i oligodendrocita, osobito organizaciju paranoda i stabilnost mijelinske ovojnice što posljedično može utjecati na saltatornu provodljivost duž dugodosežnih vlakana (111). Već i relativno male promjene u sastavu lipidnih splavi mogu se nesrazmjerno odraziti na sinkronizaciju i brzinu prijenosa signala između hemisfera (60). Budući da kalozalne projekcije imaju ključnu ulogu u usklađivanju bilateralnih motoričkih obrazaca, poremećaji u cc mogu se funkcionalno manifestirati kao suptilni koordinacijski deficiti (112). Takvo tumačenje je u skladu s bihevioralnim testovima: u testu otiska stopala se vidi skraćanje duljine koraka bez širenja baze (odnosno bez trajne posturalne kompenzacije), dok rotarod u ranoj fazi detektira osjetljivost na narušavanje ravnoteže i izdržljivost. Drugim riječima, promjene u cc pružaju biološki uvjerljiv mehanizam koji povezuje molekularne i funkcionalne razine rezultata pri čemu je narušena komunikacija između hemisfera. Dob dodatno modulira ove učinke. Iako je obrazac smanjenja GM1 i GD1a prisutan u obje dobne skupine, starije životinje polaze od drukčijeg polaznog membranskog profila uz manje rezerve plastičnosti što se u konačnici odražava na dulje zadržavanje funkcionalnih deficita u zahtjevnijim zadacima (rotarod 2. i 10. dan) (113). Mlađe životinje pokazuju bržu funkcionalnu normalizaciju koordinacije, iako rani poremećaji hoda upućuju da je i u njima cc osjetljiv segment motoričke mreže neposredno nakon izlaganja. Važno je istaknuti i selektivnost učinka. Činjenica da GD1b i GT1b ne pokazuju značajne preomjene podupire hipotezu o ciljanoj reorganizaciji domena ovisnih o lipidnim splavima umjesto o nespecifičnom gubitku ukupnih gangliozida. U kombinaciji s bihevioralnim podacima to upućuje na model u kojem rani funkcionalni pomaci nakon kuprizona proizlaze i/ili iz reverzibilne toksičnosti (energetski i membranski stres s kratkotrajnom disfunkcijom provođenja) i početnih procesa funkcionalnog oporavka, pri čemu cc ostaje ključni ograničavajući faktor interhemisferne koordinacije pokreta (114).

U aca su zabilježene značajne razlike među skupinama u razini GM1, dok GD1a, GD1b i GT1b ne odstupaju statistički značajno. Ovakav rezultat sugerira da kuprizon u aca ne dovodi do globalne depleciju kompleksnih gangliozida, već primarno zahvaća membranske mikrodomene ovisne o GM1. To je u skladu s ulogom GM1 kao organizatora lipidnih splavi i koregulatora interakcije aksona i glije, osobito u području paranoda (115). Ova interpretacija je odgovara regionalnoj osjetljivosti u kuprizonskom modelu: dok je cc struktura koja je najosjetljivija na izlaganje kuprizonu i najizraženije zahvaćena demijelinizacijom, aca je u većini standardnih protokola relativno pošteđena ili pokazuje blaže promjene (67). Stoga je očekivano da u aca detektiramo promjene GM1 bez značajnih promjena ostalih gangliozida, što može ukazivati na mikrodomensku reorganizaciju prije nego grube morfološke lezije mijelina (96). Potencijalni dobni učinak u aca treba promatrati i u kontekstu bazalnih, o dobi ovisnih promjena u gangliozidima. U dobivenim podacima GM1 pokazuje jasan dobno specifični obrazac, uz sniženje u skupini 3CPZ prisutna je i razlika između 3CTRL i 6CTRL što je u skladu sa studijama o padu GM1 i GD1a (116). Što se tiče funkcionalnih implikacija, aca je kao i cc interhemisferni snop koji, uz dodatnu ulogu u olfaktornim i limbičkim neuralnim krugovima, može usklađivati elemente lokomotorike, uzbuđenosti i širih obrasca ponašanja (npr. reaktivnost na novo okruženje) (117), iako nije glavni motorički put poput kalozalnih projekcija motoričkog korteksa. Zabilježene promjene GM1 u aca stoga se mogu tumačiti kao suptilni modulatori (npr. početne eksploracije i/ili disinhibicije), a ne kao glavni uzrok poremećaja koordinacije i izdržljivosti (117, 118). Smanjenje razine GM1 može poremetiti organizaciju paranoda ovisnu o lipidnim splanima i MAG-om posredovanu adheziju, čime se narušava stabilnost kompleksa akson-mijelin i provodljivost čak i bez značajne demijelinizacije (117). U tom okviru, rezultat dobiven za aca se uklapa u širu sliku, dok cc pokazuje opsežnije histološke promjene na učinak kuprizna, aca reflektira osjetljivost GM1-ovisnih domena. Zaključno, GM1 se u aca pokazao osjetljivijim markerom promjena od GD1a, GD1b i GT1b, što je u skladu s regionalnom selektivnošću kuprizonskog modela. U konačnici funkcionalno gledano, promjene u aca je razumnije vezati uz suptilno podešavanje reaktivnosti nego uz primarne motoričke deficite.

U CPu su promjene najizraženije za GM1 i GD1a, dok su za GD1b i GT1b manje prisutne. Ovakva selektivnost upućuje na reorganizaciju membranskih mikrodomena ovisnih o GM1 i GD1a prije nego na neselektivnu depleciju kompleksnih gangliozida. To je u skladu s ulogom GM1 kao organizatora splavi i modulatora sinaptičke signalizacije, te s činjenicom da

su GD1a i GT1b aksonalni ligandi MAG-a u paranodalnim regijama, ključnima za održavanje stabilnosti interakcije aksonalna i glije (119). Iako je cc najosjetljiviji na kuprizon, Cpu kao područje sive tvari, pokazuje blaže, pretežno membranske i glijalne promjene uz ograničeni stupanj demijelinizacije. U takvom tkivnom kontekstu, promjene u izražaju GM1 i GD1a mogu odražavati disfunkciju splavi i lokalne kontakte aksona i glije, bez nužno grubih histoloških lezija, što je u skladu s dobivenim rezultatima (42, 65). S funkcionalnog gledišta, strijatalni krugovi modiliraju započinjanje, dinamiku i održavanje lokomotorne aktivnosti, kao i dinamiku habituacije na novi sadržaj. U testovima motoričke aktivnosti horizontalno kretanje je uobičajeno pojačano na početku, a zatim opada kako se životinja habitura, dok vertikalna aktivnost odražava istraživački pogon, pobuđenost i senzornu orijentaciju (65). U tom okviru, uočeni rani porast spontane lokomocije nakon kojeg slijedi ubrzano smanjenje aktivnosti može se tumačiti kao posljedica kratkotrajnih, reverzibilnih učinaka kuprizona na energetiku i glijalnu homeostazu, uz moguće i blage promjene u strijatalnoj dopaminskoj signalizaciji (120). Naime, GM1 je izravno povezan s dopaminskim sustavom, može povećati afinitet dopaminskog transportera u strijatalnim sinaptosomima i pojačati neurotrofnu signalizaciju putem receptorske tirozin kinaze. Eksperimentalno je dokazano da primjena GM1 ima zaštitni učinak na nigrostrijatalni dopaminski sustav i ublažavaju manjak dopamina u Cpu (116, 121, 122). Stoga smanjenje GM1 u Cpu pruža biološki okvir za opažene promjene spontane lokomocije - početno naglo povećanje aktivnosti, nakon čega slijedi brži pad - uz napomenu da se strijatalni doprinos vjerojatno preklapa s promjenama u kalozalnim i kortikalnim projekcijama koje sudjeluju u motoričkoj koordinaciji. Zaključno se može reći da selektivni pad GM1 i GD1a u Cpu upućuje na membransku disfunkciju ovisnu o lipidnim splanima što je u skladu s poznatom ulogom ovih gangliozida u kontaktima aksona i glija stanica i dopaminskoj signalizaciji. Funkcionalno se može očitovati kao rani porast, a potom ubrzano smanjenje spontane aktivnosti, uz ograničene ili varijabilne promjene ostalih gangliozida.

U M uočena je selektivna promjena gangliozida na tretman kuprizonom. GM1 pokazuje razlike među skupinama pri čemu je razlika prisutna između kontrola različite starosti, dok GD1a i GD1b ostaju stabilni. GT1b je snižen u mlađoj kuprizonskoj skupini (3CPZ naspram 3CTRL). Takva distribucija upućuje na ciljanu reorganizaciju membranskih domena ovisnih o lipidnim splanima, umjesto općeg gubitka kompleksnih gangliozida. To je u skladu s ranije navedenom ulogom GM1 kao ključne komponente lipidnih splavi i modulatora sinaptičke plastičnosti, te s činjenicom da GD1a i GT1b služe kao aksonalni ligandi za MAG u području

paranoda gdje pridonose stabilnosti aksona i mijelina te provođenju impulsa (122). Moždana kora je od ranije prepoznata kao osjetljiva regija u kuprizonskom modelu pri čemu se u standardnim protokolima redovito bilježi kortikalna demijelinizacija i gubitak oligodendrocita, uključujući i M. Stoga se blage promjene gangliozida u ovoj regiji mogu tumačiti kao rani događaj koji prethodi grubljim histološkim promjenama (123). Dob dodatno modulira rezultate, razlika GM1 između 3CTRL i 6CTRL skupina u skladu je s literaturom koja opisuje regionalno specifične promjene gangliozidnog profila koje su ovisne o starosti. Tijekom rane i srednje odrasle dobi javljaju se razvojne promjene u udjelima GM1 i GD1, dok se u starijoj dobi često bilježi pad GM1 i GD1a uz pomake prema drugim vrstama. Takve polazne razine koje ovise o starosti mogu pojačati ili ublažiti učinak kuprizona u pojedinoj regiji (14). S funkcionalnog aspekta, smanjenje GT1b u mlađoj skupini kompatibilno je s paranodalnom disfunkcijom, s obzirom da je GT1b poznat kao ligand za MAG. Takva promjena može usporiti saltatornu provodljivost i narušiti sinkronizaciju u motoričkim projekcijama. Budući da je M jasno zahvaćen u kuprizonskom modelu, ove promjene mogu doprinijeti ranim deficitima koordinacije i izdržljivosti opaženima u bihevioralnim testovima (124).

5.4. Rezultati MALDI-TOF IMS analize

MALDI-TOF IMS omogućio je prostorno mapiranje lipidnih profila u regijama koje su prethodno analizirane histološki i imunohistokemiji, pri čemu je korišten negativni ionski mod u rasponu 600 – 1000 m/z (125). Takav pristup omogućuje istodobno praćenje prostorne komponente (odabrani ROI-jevi po regijama) i promjena u skupinama lipida koje su ključne za mijelin i membransku signalizaciju (126, 127). Sličan pristup već je ranije primijenjen u *shiverer* i kuprizonskom modelu gdje su uz pomoć IMS-a detektirane promjene sastava i raspodjele lipida u mozgu (128). Odabir negativnog moda i m/z raspona bio je usmjeren na fosfo- i sfingolipide, kao glavne strukturne komponente mijelinske ovojnice koje sudjeluju u komunikaciji aksona i glije (129, 130).

Analiza PLS-DA modelima pokazala je jasno razdvajanje između CPZ i CTRL skupina u svim analiziranim regijama te je u većini slučajeva prva komponenta više je utjecala na klasifikaciju (131). U cc tromjesečnih životinja postignuta je visoka točnost klasifikacijske ($\approx 97\%$) uz veću unutargrupnu varijabilnost u CPZ skupinama, odnosno širi raspon profila, što ukazuje na heterogenost odgovora na kuprizon i/ili različite faze oporavka neposredno nakon prestanka izlaganja. Sličan obrazac – jasno razdvajanje i veća varijabilnost u CPZ – zabilježen

je i u ostalim regijama, uz ponegdje nešto nižu (no i dalje vrlo visoku, više od 80%) klasifikacijsku točnost kod starijih skupina (npr. M $\approx$ 83%). U aca je razdvajanje bilo vrlo izraženo u obje dobne skupine ($\approx$ 100% kod 3 mj; $\approx$ 90% kod 6 mj). Ovi rezultati upućuju da kuprizon značajno utječe na lipidni profil mijelina i membranskih struktura, pri čemu su opseg i zadržavanje promjena ovisne o dobi i analiziranoj regiji (132).

Analize loading vektora ukazuju da najveći doprinos razdvajanju skupina dolazi od signala u višem masenom rasponu (>800 m/z), u kojem dominiraju glicerofosfolipidi - fosfatidilkolini (PC, eng. *phosphatidylcholine*), fosfatidiletanolamini (PE, eng. *phosphatidylethanolamine*), fosfatidilserini (PS, eng. *phosphatidylserine*), fosfatidilgliceroli (PG, eng. *phosphatidylglycerol*) i sfingolipidi, osobito sulfatidi. Ove klase lipida imaju ključnu ulogu u stabilnosti mijelinske ovojnice, organizaciji membranskih mikrodomena i signalnoj komunikaciji, što objašnjava njihovu važnost u klasifikacijskim modelima.

Iz odabranog skupa najdiskriminantnijih m/z značajki izdvojeno je sedam *single hit* signala s jednoznačnom atribucijom (fosfatidna kiselina (PA, eng. *phosphatide acid*) 807.54 i 747.51; PE 834.51; PC 878.56; sulfatidi galabiozilceramid i laktosilceramid 888.64 te sulfogalaktozilceramid 806.53), te veći broj *multiple hits* signala (npr. PS 890.59; PG 795.52; PC 822.54 i 904.59; PE 822.53 itd.) kod kojih se zbog strukturnog izomerizma interpretacija temelji na razini skupine (133). To znači da zaključivanje o promjenama treba biti usmjereno na razini skupina (npr. fosfatidilkolini, fosfatidilserini), a ne pojedinačnih molekula s precizno određenim acilnim lancima.

Promjene u lipidnim profilima pokazale su izraženu regionalnu specifičnost. U cc je razdvajanje skupina bilo najjasnije, s vrlo visokom točnošću klasifikacije kod mlađih životinja, ali visokom i kod starijih životinja uz veću varijabilnost CPZ skupina. Značajne m/z vrijednosti koncentrirane su u rasponu 700–900 Da, što ukazuje na promjene u fosfo- i sfingolipidima. U skupini *single hit* ističu se PC (npr. 878.57) i sulfatidi (npr. 888.64), dok su među *multiple hits* signalima najzastupljeniji PS (890.59; 810.53; 886.55) i PE (822.53). Ovakav lipidni profil upućuje na remodeliranje membrana mijeliniziranih aksona i mijelinske ovojnice, u skladu s poznatom ulogom PC i PE u fosfolipidnom dvosloju, PS u citoplazmatskoj strani membrane i sulfatida kao markera mijelinskog statusa (134, 135, 136). cc se tako pokazao kao najosjetljivija regija na promjene inducirane kuprizonom što odgovara njegovoj poznatoj osjetljivosti u standardnim protokolima kuprizona.

aca je pokazala snažno razdvajanje CTRL i CPZ skupina u obje dobne skupine ($\approx 100\%$ u 3 mjeseca; $\approx 90\%$ u 6 mjeseci) uz naglašene promjene u rasponu 700–900 Da. U anotacijama se ističe PA 807,54 i PC 878,57 (*single hit*; razlike prisutne i u 3- i u 6-mjesečnim usporedbama) te višestruki PC/PG/PE/PS *multiple hits* signali (npr. PC 904,59; PG 795,52; PS 890,59; PE 822,53). Ovaj profil ukazuje na promjene u skupinama koje određuju mijelinsku stabilnost i organizaciju membranskih mikrodomena (PC, PE, PS). Učinak dobi se u aca vidi po različitim m/z signalima koji su najznačajniji za razdvajanje kod starijih životinja što je u skladu s pretpostavkom da početni sastav membrane modulira smjer i trajanje CPZ učinka.

U CPu životinja starih 3 mjeseca skupine su jasno razdvojene uz točnost klasifikacije $\approx 95\%$ i prevagu diskriminantnih vrijednosti u CPZ skupini i dominantan raspon 650–900 Da. U anotacijama je posebno zanimljiv PC 878,57 (*single hit*, u obje dobne skupine), a u *multiple hit* skupini učestali su PC 904,59 i PE 822,53 (razlike u obje dobne skupine). Ovakav lipidni profil u kojem prevladavaju PC i PE sugerira restrukturiranje membrana, budući da PC određuje oblik i zakrivljenost membrane te pomaže u organizaciji sinaptičkih mikrodomena (137, 138). CPu je važna komponenta bazalnih ganglija uključena u pokretanje i održavanje lokomotorike i upravo zbog toga ove promjene u fosfolipidima, ponajprije PC i PE, u CPZ skupinama imaju poveznicu s opaženim obrascima u *activity cage* testu (početno pojačano kretanje koje brzo opada) i na rotarodu (kraća izdržljivost), odnosno s poremećajima energetske zahtjevnosti i fino koordiniranih aspekata motorike.

Kod analize M, u životinja 3 mjeseca starosti PLS-DA jasno odvaja CTRL od CPZ, dok je u životinja 6 mjeseci starosti razdvajanje prisutno, ali uz nešto manju točnost ($\approx 83\%$) i djelomično preklapanje profila. Među *single hit* signalima ističu se PE 834,51 (razlike u starijoj skupini), sulfatidi 806,53 i 886,64 (razlike u 6 i u 3 mjesecnih životinja) te PA 791,55 (razlike u 6 mj. Ovaj obrazac je u skladu s činjenicom da moždana kora sadržava znatan udio intrakortikalnih mijeliniziranih vlakana i da promjene u PE/PA/sulfatidima povezane s reorganizacijom membranskih domena važnih za održavanje funkcionalnih spojeva u paranodalnim i jukstapanodalnim zonama. U M promjene su blaže i vremenski različito modulirane što odgovara opaženom bržem oporavku aktivnosti u *activity cage* testu u odnosu na zadatke koji uključuju koordinaciju i izdržljivost (130).

Kada se rezultati interpretiraju na razini skupina lipida, kroz sve regije i starosne skupine može se uočiti obrazac promjena. Najveći doprinos razdvajanju CTRL i CPZ skupina daju glicerofosfolipidi (PC, PE, PS i PG), pri čemu su promjene najizraženije u cc i aca, a potom u

CPu. Ovi rezultati ukazuju da dolazi do preoblikovanje membranske strukture koja određuje organizaciju lipidnih splavi i stabilnost mijelinske strukture. Sulfatidi su više puta dobiveni kao *single hit* signali u različitim regijama i dobnim skupinama, što je u skladu s njihovom osjetljivošću na demijelinizacijske procese i statusa mijelina. Rjeđe detektirane promjene u PA i PGP upućuju na promjene u putovima biosinteze glicerofosfolipida, pri čemu je PA ključni prekursor (139, 140). Usporedba skupina prema dobi pokazuje da starije životinje imaju veću varijabilnost unutar CPZ skupina, što bi moglo pokazivati širi raspon individualnih odgovora povezanih s demijelinizacijom, remijelinizacijom i metaboličkim statusom. U cc i aca razlike između skupina ostaju izražene i u starijoj dobi, dok se u motoričkom korteksu vidi djelomično preklapanje, što bi moglo ukazivati na brži ili varijabilniji povratak kortikalnog lipidoma prema kontrolnom profilu u odnosu na bijelu tvar.

Povezivanje IMS rezultata s bihevioralnim i imunohistokemijskim rezultatima pokazuje podudaranje na funkcionalnoj i histološkoj razini. U cc zabilježeni su izraženi pomaci u fosfo- i sfingolipidima, što odgovara poznatoj osjetljivosti dugodosežnih mijeliniziranih aksona na učinak kuprizona i funkcionalnim ishodima u zadacima koji zahtijevaju koordinaciju i ravnotežu (rotarod, test otiska šapica). U CPu dominiraju promjene u PC i PE što se podudara s ranim promjenama spontanog kretanja zabilježenima u *activity cage* testu. U M promjene su prisutne, ali blaže i prostorno manje izražene, što je u skladu s njegovim miješanim sastavom i relativno bržim oporavkom funkcije u odnosu na bijelu tvar. Zbog mogućeg izomerizma unutar skupina PC, PE, PS i PG, anotacije višestrukih pogodaka ograničene su na razinu skupine pa se promjene mogu pouzdano tumačiti na razini skupina lipida, a ne pojedinačnih molekula. Unatoč tome, dosljednost rezultata kroz regije i dobne skupine - jasno razdvajanje skupina u PLS-DA modelima, prevaga signala iznad 800 m/z i prisutnost sulfatida među jednoznačno identificiranim signalima - upućuju na to da kuprizon uzrokuje značajno remodeliranje mijelinskih i membranskih domena.

Ovo istraživanje donosi dodatne spoznaje o razlikama u odgovoru mlađih i starijih životinj na djelovanje kuprizona. Kombinacijom bihevioralnih testova, histoloških i imunohistokemijskih analiza te MALDI-TOF IMS u više moždanih regija povezani su funkcionalni poremećaji s promjenama u mijelinu i membranskim komponentama.

Unatoč tome, postoje određena ograničenja koja je važno uzeti u obzir pri interpretaciji rezultata. Analize su provedene u jednoj vremenskoj točki, 20 dana nakon završetka tretmana, što otežava razlikovanje faze aktivne demijelinizacije od početka remijelinizacije. Uključivanje više vremenskih točaka tijekom samog izlaganja kuprizonu omogućilo bi preciznije praćenje tijeka promjena i njihovo jasnije povezivanje između bihevioralnih, histoloških i lipidomskih nalaza. IMS analiza provedena je u negativnom ionskom modu, što ograničava detekciju dijela fosfolipidnih i neutralnih lipida. Kombiniranje pozitivnog i negativnog moda u budućim istraživanjima dalo bi potpuniju sliku promjena u lipidima i njihovu povezanost s drugim parametrima. Dodatno, imunohistokemijska detekcija neuroplastina nije dala očekivane rezultate. Mogući razlozi uključuju ograničenu primjenjivost korištenog primarnog protutijela za imunohistokemijske analize, jer je vjerojatno bolje prilagođeno za Western blot analize, što može dovesti do slabe dostupnosti epitopa u intaktnom tkivu i/ili nedovoljne penetracije kroz mijelinizirane strukture. Regionalno niža razina ekspresije neuroplastina u analiziranim područjima mogla je dodatno pridonijeti nedostatku specifičnog signala, čime je ograničena mogućnost njegove interpretacije kao pokazatelja akso-glijalnih spojeva u ovom eksperimentalnom kontekstu. Unatoč navedenim ograničenjima, rezultati ove studije daju vrijedan doprinos razumijevanju ranih promjena u kuprizonskom modelu, s naglaskom na ulogu membranskih komponenti i utjecaj životne dobi, te mogu poslužiti kao temelj za daljnja istraživanja mehanizama demijelinizacije i remijelinizacije.

6. ZAKLJUČAK

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da bihevioralni testovi, analiza gangliozida i MALDI-TOF IMS zajednički upućuju na to da kuprizon narušava membransku organizaciju povezanu s mijelinom u regijama ključnim za motoričku funkciju, pri čemu životna dob modulira intenzitet promjena. Specifični zaključci koji proizlaze iz rezultata studije su:

1. Kuprizon dovodi do promjena u spontanoj lokomotornoj aktivnosti i koordinaciji pokreta. U *activity cage* testu zabilježeno je početno pojačano kretanje koje brzo opada, dok su u rotarod testu i analizi otiska šapica uočeni poremećaji u održavanju ravnoteže i skraćenje koraka. Ove promjene odražavaju zahvaćenost struktura važnih za inicijaciju i koordinaciju pokreta, osobito cc i CPu.

2. Histološko bojenje LFB i imunohistokemijska analiza mijelinskih proteina potvrdili su demijelinizaciju nakon tretmana kuprizonom najizraženiju u cc i aca, uz blaže promjene u M. Smanjenje LFB signala i MBP-a ukazuje na gubitak kompaktnog mijelina, dok promjene MAG-a odražavaju stanje periaxonskog sloja i interakcije aksona i glija stanica.

3. Analiza gangliozida pokazala je da je izražaj GM1 promijenjen u svim analiziranim regijama. U mlađim životinjama GM1 je snižen u odnosu na kontrole, dok su u starijih životinja promjene prisutne, ali različito među regijama. GD1a pokazuje promjene u pojedinim regijama (CPu), dok su GD1b i GT1b uglavnom nepromijenjeni. Ovi rezultati ukazuju na promjene u organizaciji membranskih mikrodomena povezane s dobi i stadijem demijelinizacije, pri čemu GM1 predstavlja najosjetljiviji pokazatelj ovih procesa.

4. IMS analiza pokazala je da kuprizon uzrokuje regionalno specifične promjene u lipidnom profilu mozga. Najizraženije promjene zabilježene su u cc i aca gdje glicerofosfolipidi (PC, PE, PS) i sulfatidi najviše doprinose razlikovanju kontrolnih i tretiranih skupina. U CPu i M promjene su također prisutne, ali imaju drukčiji regionalni obrazac. Ovi rezultati ukazuju na promjene u sastavu i organizaciji membrana te mijelinskoj građi nakon izlaganja kuprizonu.

5. Promjene utvrđene IMS analizom su u skladu s bihevioralnim i imunohistokemijskim rezultatima čime je potvrđena povezanost molekularne i funkcionalne razine. Interhemisferne strukture (cc i aca) te CPu, regije ključne za koordinaciju i održavanje lokomotorike, pokazuju izražene promjene u lipidnom profilu koje podudaraju s rezultatima bihevioralnih testiranja. U mlađih životinja razlike između kontrolnih i kuprizonskih skupina su izraženije, uz brži

funkcionalni oporavak, dok su starije životinje pokazuju veću varijabilnost i dulje trajanje promjena. Ovi rezultati ukazuju na različite obrasce odgovora i regeneracijskog potencijala ovisno o dobi životinja.

Ocjena rada
u tijeku

7. REFERENCE

1. Simons M, Nave KA. Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;8(1):a020479.
2. Salzer JL. Schwann cell myelination. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(8):a020529.
3. Rasband MN, Peles E. The Nodes of Ranvier: Molecular Assembly and Maintenance. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;8(3):a020495.
4. Lubetzki C, Sol-Foulon N, Desmazières A. Nodes of Ranvier during development and repair in the CNS. *Nat Rev Neurol.* 2020;16(8):426-39.
5. Poitelon Y, Kopec AM, Belin S. Myelin Fat Facts: An Overview of Lipids and Fatty Acid Metabolism. *Cells.* 2020;9(4).
6. Xu Z, He S, Begum MM, Han X. Myelin Lipid Alterations in Neurodegenerative Diseases: Landscape and Pathogenic Implications. *Antioxid Redox Signal.* 2024;41(16-18):1073-99.
7. Kister A, Kister I. Overview of myelin, major myelin lipids, and myelin-associated proteins. *Front Chem.* 2022;10:1041961.
8. Aggarwal S, Yurlova L, Simons M. Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends Cell Biol.* 2011;21(10):585-93.
9. Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev.* 2001;81(2):871-927.
10. Jahn O, Tenzer S, Werner HB. Myelin proteomics: molecular anatomy of an insulating sheath. *Mol Neurobiol.* 2009;40(1):55-72.
11. Anselmo S, Bonaccorso E, Gangemi C, Sancataldo G, Conti Nibali V, D'Angelo G. Lipid Rafts in Signalling, Diseases, and Infections: What Can Be Learned from Fluorescence Techniques? *Membranes (Basel).* 2025;15(1).
12. Viljetić B, Blažetić S, Labak I, Ivić V, Zjalić M, Heffer M, et al. Lipid Rafts: The Maestros of Normal Brain Development. *Biomolecules.* 2024;14(3).
13. Mlinac-Jerković K, Kalanj-Bognar S, Heffer M, Blažetić S. Methodological Pitfalls of Investigating Lipid Rafts in the Brain: What Are We Still Missing? *Biomolecules.* 2024;14(2).
14. Sipione S, Monyror J, Galleguillos D, Steinberg N, Kadam V. Gangliosides in the Brain: Physiology, Pathophysiology and Therapeutic Applications. *Front Neurosci.* 2020;14:572965.
15. Vyas AA, Patel HV, Fromholt SE, Heffer-Laue M, Vyas KA, Dang J, et al. Gangliosides are functional nerve cell ligands for myelin-associated glycoprotein (MAG), an inhibitor of nerve regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(12):8412-7.
16. Ledeen R, Wu G. Gangliosides of the Nervous System. *Methods Mol Biol.* 2018;1804:19-55.
17. Grassi S, Giussani P, Mauri L, Prioni S, Sonnino S, Prinetti A. Lipid rafts and neurodegeneration: structural and functional roles in physiologic aging and neurodegenerative diseases. *J Lipid Res.* 2020;61(5):636-54.
18. Schnaar RL, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiol Rev.* 2014;94(2):461-518.
19. Sturgill ER, Aoki K, Lopez PH, Colacurcio D, Vajn K, Lorenzini I, et al. Biosynthesis of the major brain gangliosides GD1a and GT1b. *Glycobiology.* 2012;22(10):1289-301.
20. Vinson M, Stribos PJ, Rowles A, Facci L, Moore SE, Simmons DL, et al. Myelin-associated glycoprotein interacts with ganglioside GT1b. A mechanism for neurite outgrowth inhibition. *J Biol Chem.* 2001;276(23):20280-5.
21. Susuki K, Baba H, Tohyama K, Kanai K, Kuwabara S, Hirata K, et al. Gangliosides contribute to stability of paranodal junctions and ion channel clusters in myelinated nerve fibers. *Glia.* 2007;55(7):746-57.

22. Sysoev EI, Shenfeld AA, Belashova TA, Valina AA, Zadorsky SP, Galkin AP. Amyloid fibrils of the myelin basic protein are an integral component of myelin in the vertebrate brain. *Sci Rep*. 2025;15(1):29053.
23. Ilic K, Lin X, Malci A, Stojanović M, Puljko B, Rožman M, et al. Plasma Membrane Calcium ATPase-Neuroplastin Complexes Are Selectively Stabilized in GM1-Containing Lipid Rafts. *Int J Mol Sci*. 2021;22(24).
24. Jahn O, Siems SB, Kusch K, Hesse D, Jung RB, Liepold T, et al. The CNS Myelin Proteome: Deep Profile and Persistence After Post-mortem Delay. *Front Cell Neurosci*. 2020;14:239.
25. Schmidt N, Kollwe A, Constantin CE, Henrich S, Ritzau-Jost A, Bildl W, et al. Neuroplastin and Basigin Are Essential Auxiliary Subunits of Plasma Membrane Ca(2+)-ATPases and Key Regulators of Ca(2+) Clearance. *Neuron*. 2017;96(4):827-38.e9.
26. Furukawa K, Ohmi Y, Tajima O, Ohkawa Y, Kondo Y, Shuting J, et al. Gangliosides in Inflammation and Neurodegeneration. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2018;156:265-87.
27. Ikegawa M, Kakuda N, Miyasaka T, Toyama Y, Nirasawa T, Minta K, et al. Mass Spectrometry Imaging in Alzheimer's Disease. *Brain Connect*. 2023;13(6):319-33.
28. Ngamukote S, Yanagisawa M, Ariga T, Ando S, Yu RK. Developmental changes of glycosphingolipids and expression of glycogenes in mouse brains. *J Neurochem*. 2007;103(6):2327-41.
29. Dustin E, Suarez-Pozos E, Stotesberry C, Qiu S, Palavicini JP, Han X, et al. Compromised Myelin and Axonal Molecular Organization Following Adult-Onset Sulfatide Depletion. *Biomedicines*. 2023;11(5).
30. Vinson M, Rausch O, Maycox PR, Prinjha RK, Chapman D, Morrow R, et al. Lipid rafts mediate the interaction between myelin-associated glycoprotein (MAG) on myelin and MAG-receptors on neurons. *Mol Cell Neurosci*. 2003;22(3):344-52.
31. Lassmann H, Bradl M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 2017;133(2):223-44.
32. Torre-Fuentes L, Moreno-Jiménez L, Pytel V, Matías-Guiu JA, Gómez-Pinedo U, Matías-Guiu J. Experimental models of demyelination and remyelination. *Neurologia (Engl Ed)*. 2020;35(1):32-9.
33. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol*. 2011;164(4):1079-106.
34. Bittner S, Afzali AM, Wiendl H, Meuth SG. Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. *J Vis Exp*. 2014(86).
35. Pike SC, Welsh N, Linzey M, Gilli F. Theiler's virus-induced demyelinating disease as an infectious model of progressive multiple sclerosis. *Front Mol Neurosci*. 2022;15:1019799.
36. Houtman JJ, Fleming JO. Pathogenesis of mouse hepatitis virus-induced demyelination. *J Neurovirol*. 1996;2(6):361-76.
37. Dedoni S, Scherma M, Camoglio C, Siddi C, Dazzi L, Puliga R, et al. An overall view of the most common experimental models for multiple sclerosis. *Neurobiol Dis*. 2023;184:106230.
38. Bachmann H, Vandemoortele B, Vermeirssen V, Carrette E, Vonck K, Boon P, et al. Vagus nerve stimulation enhances remyelination and decreases innate neuroinflammation in lysolecithin-induced demyelination. *Brain Stimul*. 2024;17(3):575-87.
39. Hooijmans CR, Hlavica M, Schuler FAF, Good N, Good A, Baumgartner L, et al. Remyelination promoting therapies in multiple sclerosis animal models: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2019;9(1):822.
40. Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, et al. Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science*. 1998;280(5369):1610-3.
41. Rosenbluth J. Central myelin in the mouse mutant shiverer. *J Comp Neurol*. 1980;194(3):639-48.
42. Praet J, Guglielmetti C, Berneman Z, Van der Linden A, Ponsaerts P. Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014;47:485-505.

43. Packer D, Fresenko EE, Harrington EP. Remyelination in animal models of multiple sclerosis: finding the elusive grail of regeneration. *Front Mol Neurosci*. 2023;16:1207007.
44. Bondan EF, Custódio PR, Lallo MA, Bentubo HD, Graça DL. Ethidium bromide-induced demyelination in the sciatic nerve of diabetic rats. *Arq Neuropsiquiatr*. 2009;67(4):1066-70.
45. Skripuletz T, Gudi V, Hackstette D, Stangel M. De- and remyelination in the CNS white and grey matter induced by cuprizone: the old, the new, and the unexpected. *Histol Histopathol*. 2011;26(12):1585-97.
46. Wang N, Zhuang J, Wei H, Dibb R, Qi Y, Liu C. Probing demyelination and remyelination of the cuprizone mouse model using multimodality MRI. *J Magn Reson Imaging*. 2019;50(6):1852-65.
47. 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;9(4).
48. Pushie MJ, Summers KL, Nienaber KH, Pickering IJ, George GN. Synthesis and structural characterization of copper-cuprizone complexes. *Dalton Trans*. 2022;51(27):10361-76.
49. Jhelum P, David S. Ferroptosis: copper-iron connection in cuprizone-induced demyelination. *Neural Regen Res*. 2022;17(1):89-90.
50. Benetti F, Ventura M, Salmini B, Ceola S, Carbonera D, Mammi S, et al. Cuprizone neurotoxicity, copper deficiency and neurodegeneration. *Neurotoxicology*. 2010;31(5):509-17.
51. Zatta P, Raso M, Zambenedetti P, Wittkowski W, Messori L, Piccioli F, et al. Copper and zinc dismetabolism in the mouse brain upon chronic cuprizone treatment. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(13):1502-13.
52. Hashem M, Shafqat Q, Wu Y, Rho JM, Dunn JF. Abnormal oxidative metabolism in the cuprizone mouse model of demyelination: An in vivo NIRS-MRI study. *Neuroimage*. 2022;250:118935.
53. Mason JL, Toews A, Hostettler JD, Morell P, Suzuki K, Goldman JE, et al. Oligodendrocytes and progenitors become progressively depleted within chronically demyelinated lesions. *Am J Pathol*. 2004;164(5):1673-82.
54. Abdel-Maged AE, Gad AM, Rashed LA, Azab SS, Mohamed EA, Awad AS. Repurposing of Secukinumab as Neuroprotective in Cuprizone-Induced Multiple Sclerosis Experimental Model via Inhibition of Oxidative, Inflammatory, and Neurodegenerative Signaling. *Mol Neurobiol*. 2020;57(8):3291-306.
55. Xuan Y, Yan G, Wu R, Huang Q, Li X, Xu H. The cuprizone-induced changes in (1)H-MRS metabolites and oxidative parameters in C57BL/6 mouse brain: Effects of quetiapine. *Neurochem Int*. 2015;90:185-92.
56. Xavier S, Younesi S, Sominsky L, Spencer SJ. Inhibiting microglia exacerbates the early effects of cuprizone in males in a rat model of multiple sclerosis, with no effect in females. *Front Neurol*. 2023;14:989132.
57. Leo H, Kipp M. Remyelination in Multiple Sclerosis: Findings in the Cuprizone Model. *Int J Mol Sci*. 2022;23(24).
58. Islam MS, Tatsumi K, Okuda H, Shiosaka S, Wanaka A. Olig2-expressing progenitor cells preferentially differentiate into oligodendrocytes in cuprizone-induced demyelinated lesions. *Neurochem Int*. 2009;54(3-4):192-8.
59. He Y, Xu Z, He Y, Liu J, Li J, Wang S, et al. Preventing production of new oligodendrocytes impairs remyelination and sustains behavioural deficits after demyelination. *Biochem Biophys Res Commun*. 2024;733:150592.
60. Hibbits N, Pannu R, Wu TJ, Armstrong RC. Cuprizone demyelination of the corpus callosum in mice correlates with altered social interaction and impaired bilateral sensorimotor coordination. *ASN Neuro*. 2009;1(3).
61. 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. *Mol Neurodegener*. 2022;17(1):34.
62. Palavicini JP, Wang C, Chen L, Ahmar S, Higuera JD, Dupree JL, et al. Novel molecular insights into the critical role of sulfatide in myelin maintenance/function. *J Neurochem*. 2016;139(1):40-54.

63. Bonetto G, Di Scala C. Importance of Lipids for Nervous System Integrity: Cooperation between Gangliosides and Sulfatides in Myelin Stability. *J Neurosci*. 2019;39(32):6218-20.
64. Zhen W, Liu A, Lu J, Zhang W, Tattersall D, Wang J. An Alternative Cuprizone-Induced Demyelination and Remyelination Mouse Model. *ASN Neuro*. 2017;9(4):1759091417725174.
65. Gudi V, Gingele S, Skripuletz T, Stangel M. Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:73.
66. Buonvicino D, Ranieri G, Chiarugi A. Cuprizone-Dependent De/Remyelination Responses and Functional Correlates in Mouse Strains Adopted to Model Relapsing, Chronic and Progressive Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Neurotox Res*. 2021;39(3):658-66.
67. Tagge I, O'Connor A, Chaudhary P, Pollaro J, Berlow Y, Chalupsky M, et al. Spatio-Temporal Patterns of Demyelination and Remyelination in the Cuprizone Mouse Model. *PLoS One*. 2016;11(4):e0152480.
68. Steelman AJ, Thompson JP, Li J. Demyelination and remyelination in anatomically distinct regions of the corpus callosum following cuprizone intoxication. *Neurosci Res*. 2012;72(1):32-42.
69. Koutsoudaki PN, Skripuletz T, Gudi V, Moharreh-Khiabani D, Hildebrandt H, Trebst C, et al. Demyelination of the hippocampus is prominent in the cuprizone model. *Neurosci Lett*. 2009;451(1):83-8.
70. Kipp M. Astrocytes: Lessons Learned from the Cuprizone Model. *Int J Mol Sci*. 2023;24(22).
71. Yu Q, Hui R, Park J, Huang Y, Kusnecov AW, Dreyfus CF, et al. Strain differences in cuprizone induced demyelination. *Cell Biosci*. 2017;7:59.
72. Paton KF, Hong S, Biggerstaff A, Kivell BM. Sex Differences in the Behavioural Aspects of the Cuprizone-Induced Demyelination Model in Mice. *Brain Sci*. 2022;12(12).
73. Rawji KS, Neumann B, Franklin RJM. Glial aging and its impact on central nervous system myelin regeneration. *Ann N Y Acad Sci*. 2023;1519(1):34-45.
74. Tewari BP, Chaunsali L, Prim CE, Sontheimer H. A glial perspective on the extracellular matrix and perineuronal net remodeling in the central nervous system. *Front Cell Neurosci*. 2022;16:1022754.
75. Neumann B, Segel M, Chalut KJ, Franklin RJ. Remyelination and ageing: Reversing the ravages of time. *Mult Scler*. 2019;25(14):1835-41.
76. Sams EC. Oligodendrocytes in the aging brain. *Neuronal Signal*. 2021;5(3):Ns20210008.
77. Saher G. Cholesterol Metabolism in Aging and Age-Related Disorders. *Annu Rev Neurosci*. 2023;46:59-78.
78. Kawade N, Yamanaka K. Novel insights into brain lipid metabolism in Alzheimer's disease: Oligodendrocytes and white matter abnormalities. *FEBS Open Bio*. 2024;14(2):194-216.
79. Zhang X, Huang N, Xiao L, Wang F, Li T. Replenishing the Aged Brains: Targeting Oligodendrocytes and Myelination? *Front Aging Neurosci*. 2021;13:760200.
80. Zou P, Wu C, Liu TC, Duan R, Yang L. Oligodendrocyte progenitor cells in Alzheimer's disease: from physiology to pathology. *Transl Neurodegener*. 2023;12(1):52.
81. Sim FJ, Zhao C, Penderis J, Franklin RJ. The age-related decrease in CNS remyelination efficiency is attributable to an impairment of both oligodendrocyte progenitor recruitment and differentiation. *J Neurosci*. 2002;22(7):2451-9.
82. Segel M, Neumann B, Hill MFE, Weber IP, Viscomi C, Zhao C, et al. Niche stiffness underlies the ageing of central nervous system progenitor cells. *Nature*. 2019;573(7772):130-4.
83. Pfeifenbring S, Nessler S, Wegner C, Stadelmann C, Brück W. Remyelination After Cuprizone-Induced Demyelination Is Accelerated in Juvenile Mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2015;74(8):756-66.
84. Sen MK, Mahns DA, Coorssen JR, Shortland PJ. The roles of microglia and astrocytes in phagocytosis and myelination: Insights from the cuprizone model of multiple sclerosis. *Glia*. 2022;70(7):1215-50.
85. Klein B, Mrowetz H, Barker CM, Lange S, Rivera FJ, Aigner L. Age Influences Microglial Activation After Cuprizone-Induced Demyelination. *Front Aging Neurosci*. 2018;10:278.
86. Wang JL, Xu CJ. Astrocytes autophagy in aging and neurodegenerative disorders. *Biomed Pharmacother*. 2020;122:109691.

87. Science AtB. Reference Atlas — Allen Mouse Brain Atlas.
88. Hammer ØH, D. A. T.; Ryan, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. 2001.
89. Software G. GraphPad Prism, Version 10.6.0.
90. Team RC. R: A language and environment for statistical computing (Version 4.2.0).
91. Jolliffe IT, Cadima J. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* 2016;374(2016):20150202.
92. Ruiz-Perez D, Guan H, Madhivanan P, Mathee K, Narasimhan G. So you think you can PLS-DA? *BMC Bioinformatics.* 2020;21(Suppl 1):2.
93. Matsushima GK, Morell P. The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol.* 2001;11(1):107-16.
94. Irvine KA, Blakemore WF. Age increases axon loss associated with primary demyelination in cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol.* 2006;175(1-2):69-76.
95. Vega-Riquer JM, Mendez-Victoriano G, Morales-Luckie RA, Gonzalez-Perez O. Five Decades of Cuprizone, an Updated Model to Replicate Demyelinating Diseases. *Curr Neuropharmacol.* 2019;17(2):129-41.
96. Schnaar RL. Brain gangliosides in axon-myelin stability and axon regeneration. *FEBS Lett.* 2010;584(9):1741-7.
97. Lubrich C, Giesler P, Kipp M. Motor Behavioral Deficits in the Cuprizone Model: Validity of the Rotarod Test Paradigm. *Int J Mol Sci.* 2022;23(19).
98. Opielka M, Urbanowicz K, Konieczna-Wolska K, Müller E, Krajewski O, Feucherolles M, et al. Spatial lipidomics reveals demyelination and remyelination dynamics in the mouse brain. *J Lipid Res.* 2025;100912.
99. Broom L, Ellison BA, Worley A, Wagenaar L, Sörberg E, Ashton C, et al. A translational approach to capture gait signatures of neurological disorders in mice and humans. *Sci Rep.* 2017;7(1):3225.
100. Martínez-Pinilla E, Rubio-Sardón N, Villar-Conde S, Navarro G, Del Valle E, Tolivia J, et al. Cuprizone-Induced Neurotoxicity in Human Neural Cell Lines Is Mediated by a Reversible Mitochondrial Dysfunction: Relevance for Demyelination Models. *Brain Sci.* 2021;11(2).
101. Wang H, Li C, Wang H, Mei F, Liu Z, Shen HY, et al. Cuprizone-induced demyelination in mice: age-related vulnerability and exploratory behavior deficit. *Neurosci Bull.* 2013;29(2):251-9.
102. Giesler P, Kipp M, Hawlitschka A. High-Speed-Ventral-Plane Videography Identifies Specific Gait Pattern Changes in Cuprizone-Induced Demyelination in Mice. *Cells.* 2025;14(13).
103. Shan HM, Maurer MA, Schwab ME. Four-parameter analysis in modified Rotarod test for detecting minor motor deficits in mice. *BMC Biol.* 2023;21(1):177.
104. Emamnejad R, Pagnin M, Petratos S. The iron maiden: Oligodendroglial metabolic dysfunction in multiple sclerosis and mitochondrial signaling. *Neurosci Biobehav Rev.* 2024;164:105788.
105. Leussis MP, Bolivar VJ. Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. *Neurosci Biobehav Rev.* 2006;30(7):1045-64.
106. Tomas-Roig J, Torrente M, Cabré M, Vilella E, Colomina MT. Long lasting behavioural effects on cuprizone fed mice after neurotoxicant withdrawal. *Behav Brain Res.* 2019;363:38-44.
107. Chen Y, Liu J, Yao Y, Yan H, Su R. Rearing behaviour in the mouse behavioural pattern monitor distinguishes the effects of psychedelics from those of lisuride and TBG. *Front Pharmacol.* 2023;14:1021729.
108. Shoji H, Miyakawa T. Age-related behavioral changes from young to old age in male mice of a C57BL/6J strain maintained under a genetic stability program. *Neuropsychopharmacol Rep.* 2019;39(2):100-18.
109. Palavra F, Viana SD, Henriques S, Dinis J, Martins J, Madeira MH, et al. Defining milestones for the study of remyelination using the cuprizone mouse model: How early is early? *Mult Scler Relat Disord.* 2022;63:103886.
110. Schnaar RL, Lopez PH. Myelin-associated glycoprotein and its axonal receptors. *J Neurosci Res.* 2009;87(15):3267-76.

111. Gao Y, Kong L, Liu S, Liu K, Zhu J. Impact of Neurofascin on Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy via Changing the Node of Ranvier Function: A Review. *Front Mol Neurosci.* 2021;14:779385.
112. Ni Z, Leodori G, Vial F, Zhang Y, Avram AV, Pajevic S, et al. Measuring latency distribution of transcallosal fibers using transcranial magnetic stimulation. *Brain Stimul.* 2020;13(5):1453-60.
113. Correale J, Ysraelit MC. Multiple Sclerosis and Aging: The Dynamics of Demyelination and Remyelination. *ASN Neuro.* 2022;14:17590914221118502.
114. Wang Y, Chen Z, Ma G, Wang L, Liu Y, Qin M, et al. A frontal transcallosal inhibition loop mediates interhemispheric balance in visuospatial processing. *Nat Commun.* 2023;14(1):5213.
115. McGonigal R, Willison HJ. The role of gangliosides in the organisation of the node of Ranvier examined in glycosyltransferase transgenic mice. *J Anat.* 2022;241(5):1259-71.
116. Guo Z. Ganglioside GM1 and the Central Nervous System. *Int J Mol Sci.* 2023;24(11).
117. Hsu TT, Huang TN, Hsueh YP. Anterior Commissure Regulates Neuronal Activity of Amygdalae and Influences Locomotor Activity, Social Interaction and Fear Memory in Mice. *Front Mol Neurosci.* 2020;13:47.
118. Fenlon LR, Suarez R, Lynton Z, Richards LJ. The evolution, formation and connectivity of the anterior commissure. *Semin Cell Dev Biol.* 2021;118:50-9.
119. Yang LJ, Zeller CB, Shaper NL, Kiso M, Hasegawa A, Shapiro RE, et al. Gangliosides are neuronal ligands for myelin-associated glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(2):814-8.
120. Babbs RK, Beierle JA, Yao EJ, Kelliher JC, Medeiros AR, Anandakumar J, et al. The effect of the demyelinating agent cuprizone on binge-like eating of sweetened palatable food in female and male C57BL/6 substrains. *Appetite.* 2020;150:104678.
121. Newburn EN, Duchemin AM, Neff NH, Hadjiconstantinou M. GM1 ganglioside enhances Ret signaling in striatum. *J Neurochem.* 2014;130(4):541-54.
122. Schneider JS, Cambi F, Gollomp SM, Kuwabara H, Brašić JR, Leiby B, et al. GM1 ganglioside in Parkinson's disease: Pilot study of effects on dopamine transporter binding. *J Neurol Sci.* 2015;356(1-2):118-23.
123. Caughlin S, Maheshwari S, Weishaupt N, Yeung KK, Cechetto DF, Whitehead SN. Age-dependent and regional heterogeneity in the long-chain base of A-series gangliosides observed in the rat brain using MALDI Imaging. *Sci Rep.* 2017;7(1):16135.
124. Kunisawa K, Hatanaka N, Shimizu T, Kobayashi K, Osanai Y, Mouri A, et al. Focal loss of the paranodal domain protein Neurofascin155 in the internal capsule impairs cortically induced muscle activity in vivo. *Mol Brain.* 2020;13(1):159.
125. Jha D, Blennow K, Zetterberg H, Savas JN, Hanrieder J. Spatial neurolipidomics-MALDI mass spectrometry imaging of lipids in brain pathologies. *J Mass Spectrom.* 2024;59(3):e5008.
126. Zhang H, Lu KH, Ebbini M, Huang P, Lu H, Li L. Mass spectrometry imaging for spatially resolved multi-omics molecular mapping. *Npj Imaging.* 2024;2(1):20.
127. Li D, Ouyang Z, Ma X. Mass Spectrometry Imaging for Single-Cell or Subcellular Lipidomics: A Review of Recent Advancements and Future Development. *Molecules.* 2023;28(6).
128. Maganti RJ, Hronowski XL, Dunstan RW, Wipke BT, Zhang X, Jandreski L, et al. Defining Changes in the Spatial Distribution and Composition of Brain Lipids in the Shiverer and Cuprizone Mouse Models of Myelin Disease. *J Histochem Cytochem.* 2019;67(3):203-19.
129. Jackson SN, Barbacci D, Egan T, Lewis EK, Schultz JA, Woods AS. MALDI-Ion Mobility Mass Spectrometry of Lipids in Negative Ion Mode. *Anal Methods.* 2014;6(14):5001-7.
130. Phulara NR, Rege A, Bieberich CJ, Seneviratne HK. Mass Spectrometry Imaging Reveals Region-Specific Lipid Alterations in the Mouse Brain in Response to Efavirenz Treatment. *ACS Pharmacol Transl Sci.* 2024;7(8):2379-90.
131. Züllig T, Trötz Müller M, Köfeler HC. Lipidomics from sample preparation to data analysis: a primer. *Anal Bioanal Chem.* 2020;412(10):2191-209.

132. Zhao X, Niu L, Clerici C, Russo R, Byrd M, Setchell KDR. Data analysis of MS-based clinical lipidomics studies with crossover design: A tutorial mini-review of statistical methods. *Clin Mass Spectrom*. 2019;13:5-17.
133. Züllig T, Köfeler HC. HIGH RESOLUTION MASS SPECTROMETRY IN LIPIDOMICS. *Mass Spectrom Rev*. 2021;40(3):162-76.
134. Eckhardt M. The role and metabolism of sulfatide in the nervous system. *Mol Neurobiol*. 2008;37(2-3):93-103.
135. Blomqvist M, Zetterberg H, Blennow K, Månsson JE. Sulfatide in health and disease. The evaluation of sulfatide in cerebrospinal fluid as a possible biomarker for neurodegeneration. *Mol Cell Neurosci*. 2021;116:103670.
136. He S, Qiu S, Pan M, Palavicini JP, Wang H, Li X, et al. Central nervous system sulfatide deficiency as a causal factor for bladder disorder in Alzheimer's disease. *Clin Transl Med*. 2023;13(7):e1332.
137. Bennett SA, Valenzuela N, Xu H, Franko B, Fai S, Figeys D. Using neurolipidomics to identify phospholipid mediators of synaptic (dys)function in Alzheimer's Disease. *Front Physiol*. 2013;4:168.
138. Tulodziecka K, Diaz-Rohrer BB, Farley MM, Chan RB, Di Paolo G, Levental KR, et al. Remodeling of the postsynaptic plasma membrane during neural development. *Mol Biol Cell*. 2016;27(22):3480-9.
139. Zhang Q, Li Y, Sui P, Sun XH, Gao Y, Wang CY. MALDI mass spectrometry imaging discloses the decline of sulfoglycosphingolipid and glycerophosphoinositol species in the brain regions related to cognition in a mouse model of Alzheimer's disease. *Talanta*. 2024;266(Pt 2):125022.
140. Gao J, Guo Z, Zhao M, Cheng X, Jiang X, Liu Y, et al. Lipidomics and mass spectrometry imaging unveil alterations in mice hippocampus lipid composition exposed to hypoxia. *J Lipid Res*. 2024;65(7):100575.

8. SAŽETAK

Mijelinska ovojnica je specijalizirana membrana koja obavlja akson i omogućuje saltatorno provođenje živčanih impulsa i ključna je za normalno funkcioniranje neuronskih mreža. Oštećenje mijelina, kao što se događa u demijelinizacijskim bolestima poput multiple skleroze, dovodi do ozbiljnih neuroloških poremećaja. Kuprizonski model, koji se temelji na dodavanju kelatora bakra kuprizona u prehranu miševa soja C57BL/6, jedan je od najčešće korištenih eksperimentalnih pristupa za proučavanje procesa demijelinizacije i kasnije remijelinizacije.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj životne dobi na funkcionalne, histološke i molekularne promjene u različitim moždanim regijama nakon izlaganja kuprizonu. Primijenjen je integrirani pristup koji je uključivao bihevioralne testove (analiza otiska šapica, rotarod i *activity cage*), histološku i imunohistokemijsku analizu mijelinskih proteina (MAG i MBP) i kompleksnih gangliozida te MALDI-TOF IMS u negativnom ionskom modu. Analizirane su četiri regije mozga (*corpus callosum*, prednja komisura, strijatum i motorička kora) u mlađih i starijih životinja.

Zabilježeni su rani, većinom prolazni motorički poremećaji koji se podudaraju s izraženim histološkim i lipidomskim promjenama, najistaknutije u *corpus callosumu* i prednjoj komisuri. MAG je pokazao izraženije promjene u odnosu na MBP, što odražava njegovu veću osjetljivost na poremećaje interakcija aksona i glija stanica u analiziranoj fazi. Imunohistokemijska analiza gangliozida ukazala je na selektivno smanjenje GM1 i GD1a, dok je IMS otkrio regionalno specifične promjene u glicerofosfolipidima i sulfatidima, uz razlike između dobnih skupina u profilu i varijabilnosti odgovora.

Ovi rezultati pružaju nove spoznaje o povezanosti funkcionalnih, histoloških i lipidomskih promjena u ranom razdoblju nakon izlaganja kuprizonu te ističu važnost životne dobi u moduliranju odgovora. Time istraživanje pridonosi boljem razumijevanju mehanizama demijelinizacije i remijelinizacije te postavlja podlogu za daljnja istraživanja u ovom području.

Ključne riječi: mijelinska ovojnica, kuprizonski model, demijelinizacija, MALDI-TOF IMS, gangliozidi, mijelinski proteini, starosna dob

9. SUMMARY

The myelin sheath is a specialized membrane that wraps around axons, enables saltatory conduction of nerve impulses, and is essential for the proper functioning of neuronal networks. Disruption of myelin structure, as occurs in demyelinating diseases such as multiple sclerosis, leads to severe neurological deficits. The cuprizone model, based on the dietary administration of the copper chelator cuprizone to C57BL/6 mice, is one of the most commonly used experimental approaches to study demyelination and subsequent remyelination.

The aim of this study was to investigate the effect of age on functional, histological, and molecular changes in different brain regions following cuprizone exposure. An integrated approach was applied, including behavioral tests (footprint analysis, rotarod, and activity cage), histological and immunohistochemical analysis of myelin proteins (MAG and MBP) and complex gangliosides, as well as MALDI-TOF IMS in negative ion mode. Four brain regions were analyzed (corpus callosum, anterior commissure, striatum, and motor cortex) in young and aged animals.

Early, mostly transient motor impairments were observed, coinciding with pronounced histological and lipidomic changes, most prominently in the corpus callosum and anterior commissure. MAG showed more pronounced alterations than MBP, reflecting its higher sensitivity to disturbances in axon–glia interactions at the analyzed stage. Immunohistochemical analysis of gangliosides revealed a selective reduction of GM1 and GD1a, while IMS detected region-specific changes in glycerophospholipids and sulfatides, with differences between age groups in the profile and variability of responses.

These findings provide new insights into the relationship between functional, histological, and lipidomic changes in the early phase after cuprizone exposure and highlight the role of age in modulating these responses. The study contributes to a better understanding of the mechanisms of demyelination and remyelination and lays the groundwork for further research in this field.

Key words: myelin sheath, cuprizone model, demyelination, MALDI-TOF IMS, gangliosides, myelin proteins, age

10. ŽIVOTOPIS

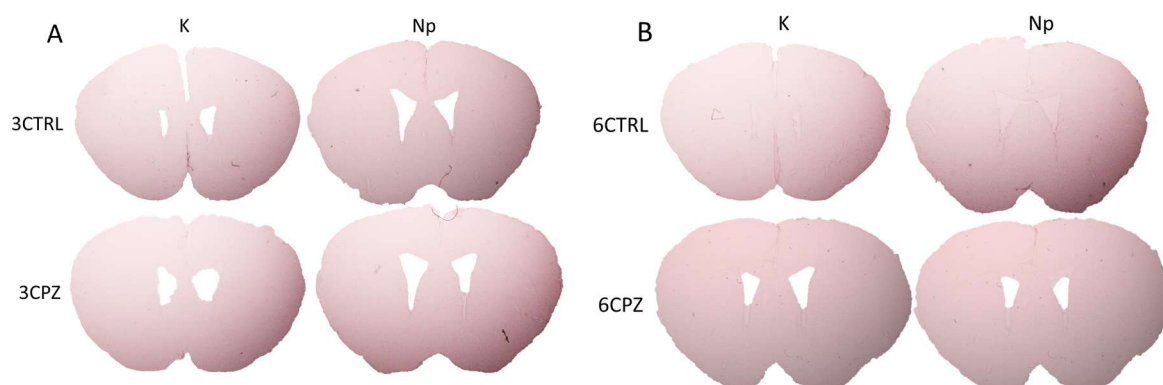
Robert Rončević rođen je 27.10.1993. u Našicama. Osnovnu školu završio je u Vukovaru 2008. godine. Iste godine upisuje Opću Gimnaziju u Vukovaru, koju završava 2012. godine. Titulu doktora medicine stječe diplomiranjem 2018. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku. Pripravnički staž obavio je u Općoj županijskoj bolnici Vukovar (danas Nacionalna memorijalna bolnica „dr. Juraj Njavro“) tijekom 2018.-2019. godine.

Stručni ispit položio je 2018. godine te se potom zaposlio na Zavodu za hitnu medicinu Vukovarsko- srijemske županije. 2019. godine započinje specijalizaciju u Klinički zavod za dijagnostičku i intervencijsku radiologiju KBC-a Osijek.

2020. godine upisuje poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij „Molekularne bioznanosti“ koji se provodi u suradnji Sveučilišta J. J. Strossmayera, Instituta Ruđera Boškovića u Zagrebu i Sveučilišta u Dubrovniku. 2025. godine obranio je temu doktorata: „Utjecaj kuprizona na lipidni profil i funkcionalne promjene u mozgu miševa različite dobi“, pod mentorstvom doc.dr.sc. Barbare Viljetić.

Od 2023. godine izabran je na mjesto naslovnog asistenta na Katedri za anatomiju i neuroznanost Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku. Sudjeluje u izvođenju nastave iz predmeta Anatomija, koji se provodi na diplomskom studiju medicine. Također, od 2018. godine Robert Rončević član je Hrvatske liječničke komore, a 2020. godine postaje aktivan član Hrvatskog društva radiologa.

11. DODATAK



Slika D.1. Imunohistokemijska analiza neuroplastina miševa starih 3 (A) i 6 (B) mjeseci. Prikazana su reprezentativna bojanja za Np-65 u kontrolnim skupinama (3CTRL i 6CTRL) i skupinama tretiranim kuprizonom (3CPZ i 6CPZ). Negativna kontrola (K) prikazuje odsutnost specifičnog bojenja u nedostatku primarnog protutijela.