# Usporedba učinka normoksije i hipoksije na astrocite miša

**Stančin, Paula**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:108582

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Paula Stančin

# USPOREDBA UČINKA NORMOKSIJE I HIPOKSIJE NA ASTROCITE MIŠA

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

«Ovaj rad izrađen je na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. Dinka Mitrečića, dr. med. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.»

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek Diplomski rad

# USPOREDBA UČINKA NORMOKSIJE I HIPOKSIJE NA ASTROCITE MIŠA

Paula Stančin

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Hipoksija se nalazi u patofiziološkoj pozadini nekih od najčešćih bolest čovjeka, kao što su srčani i moždani udar. Budući da osim živčanih stanica, neurona, u normalnom funkcioniranju živčanog sustava brojne uloge imaju i astrociti, u ovom istraživanju istražen je izražaj dva intermedijarna filamentna citoskeletna proteina astrocita: nestina, koji se smatra markerom živčanih matičnih stanica i glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (GFAP) koji je marker zrelih astrocita. Izražaj je istražen u uvjetima normoksije (21% kisika) i hipoksije (1% kisika). Također je cilj bio usporediti primjenu dva programa za poluatomatsku analizu slika, *Cell profiler* i *Fiji* u obradi jačine imunohistokemijskog signala. Nakon 8 dana diferencijacije od živčanih matičnih stanica su dobiveni zreli astrociti. Dio stanica je premješten u inkubator s 1 % kisika na 24 sata, dok je drugi dio stanica ostao u inkubatoru na ambijentalnoj koncentraciji kisika kao kontrola. Imunhistokemijska metoda je pokazala kako je nestin najviše izražen na početku diferencijacije, a dalje postupno opada. Hipoksija je statistički značajno smanjila izražaj nestina. Istovremeno, izražaj GFAP-a raste sa stupnjem diferencijacije astrocita. Hipoksija nije djelovala na izražaj GFAP. Usporedba rezultata mjerenja jačina imunohistokemijskog signala dobivenih računalnim programima *Cell profiler* i *Fiji* je pokazala kako oba programa daju gotovo identične razine statističkih razlika između uspoređivanih skupina.

29 stranica, 9 slika, 5 tablica, 40 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: GFAP, nestin, astrociti, imunohistokemija, ishemija

Voditelj: izv. prof. Dinko Mitrečić, dr. med.

Suvoditelj: prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Dubravka Hranilović, izv. prof. dr. sc. Mirta Tkalec, doc. dr. sc. Sandra Hudina

Rad prihvaćen: 8.7.2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

# COMPARISON OF THE EFFECT OF NORMOXIA AND HYPOXIA ON MOUSE ASTROCYTES

Paula Stančin

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Hypoxia stands in the pathophysiological background of some of the most common human diseases, such as heart attack and stroke. Since in addition to neurons, astrocytes also play a number of roles in the normal functioning of the nervous system, in this paper is investigated the expression of two intermediate filamentous cytoskeletal proteins of astrocytes: nestin, which is considered a marker of neural stem cells and glial fibrillar acidic protein (GFAP) which is a marker of mature astrocytes. Expression was investigated under conditions of normoxia (21% oxygen) and hypoxia (1% oxygen). In addition, the aim of this study was to investigate the application of two programs for semi-automatic signal analysis, *Cell profiler* and *Fiji* and to compare the results of quantification of the signal obtained by immunohistochemistry. After 8 days of differentiation from nerve stem cells, mature astrocytes were obtained. Half of these cells were transferred to an incubator with 1% oxygen for 24 hours while another part of the cells remained in the incubator at ambient oxygen concentration as a control. The immunohistochemical method revealed that the expression of nestin peaked at the beginning of differentiation and then gradually decreased. Hypoxia influenced expression of nestin and it was reduced. At the same time, the expression of GFAP increased in parallel to astrocyte differentiation. Hypoxia did not affect GFAP expression. Comparison of the results of immunohistochemical signal measurements obtained by the computer programs *Cell profiler* and *Fiji* showed that both programs give almost identical levels of statistical differences between the compared groups.

29 pages, 9 figures, 5 tables, 40 references, original in: Croatian

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: GFAP, nestin, astrocytes, immunohistochemistry, ischemia

Supervisor: izv. prof. Dinko Mitrečić, dr. med.

Cosupervisor: prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

Reviewers: prof. dr. sc. Dubravka Hranilović, izv. prof. dr. sc. Mirta Tkalec, doc. dr. sc. Sandra Hudina

Thesis accepted: 8.7. 2020

# SADRŽAJ

1. UVOD ..... 1

1.1. Živčani sustav ..... 1

1.2. Moždani udar ..... 2

1.3. Hipoksija ..... 2

1.4. Intermedijarni filamenti, nestin i GFAP ..... 3

1.5. Poluautomatizirani programi za analizu slika: *Cell profiler* i *Fiji* ..... 4

2. CILJ ISTRAŽIVANJA ..... 6

3. MATERIJALI I METODE ..... 7

3.1. Uspostava stanične kulture živčanih matičnih stanica ..... 7

3.2. Diferencijacija živčanih matičnih stanica u astrocite ..... 8

3.3. Imunohistokemija ..... 8

3.4. Fotografiranje preparata ..... 9

3.5. Analiza slika pomoću računalnih programa: *Cell profiler* i *Fiji* ..... 9

4. REZULTATI ..... 11

4.1. Živčane matične stanice se mogu uspješno diferencirati u astrocite ..... 11

4.2. GFAP je u jednakoj količini prisutan u astrocitima i u normoksiji i u hipoksiji ..... 13

4.3. Nestin je primarno prisutan u nediferenciranim stanicama, a izlaganje hipoksiji smanjuje njegovu prisutnost u stanicama ..... 14

4.4. Analiza ekspresije nestina i GFAP-a pomoću *Cell profilera* i *Fijia* dala je isti rezltat ..... 19

5. RASPRAVA ..... 22

6. ZAKLJUČAK ..... 25

7. LITERATURA ..... 26

8. ŽIVOTOPIS ..... 29

# POPIS KRATICA

ATP – adenozin trifosfat

DAPI – boja za jezgru (4' , 6-Diamidino-2-fenilindol)

DMEM/F-12 - Dulbecco modificirani hranjivi medij (eng. *Dulbecco Modified Eagle Medium*)

EFG – epidermalni faktor rasta (eng. *Recombinant Mouse Epidermal Growth Factor*)

FGFb – fibroblastni faktor rasta (engl. *Recombinant Mouse Fibroblast Growth Factor-basic*)

FSB – fetalni serum (eng. *Fetal Bovine Serum*)

GFAP – glijalni fibrilarni kiseli protein (eng. *glial fibrillary acidic protein*)

IF – intermedijarni filamenti

IgG – imunoglobulin G

PBS – otopina puferirana fosfatima (eng. *Phosphate Buffer Saline*)

PDL – poli-D-lizin (eng. *Poly-D-lysine hydrobromide*)

PFA - paraformaldehid

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

SŽS – središnji živčani sustav

NSC – živčane matične stanice (eng. *neural stem cells*)

# 1. UVOD

## 1.1. Živčani sustav

Živčani sustav sisavaca sastoji se od dvije glavne vrste stanica: neurona i glija stanica. Riječ je o kompleksnoj strukturi u kojoj neuroni i glija stanice međusobno komuniciraju i organiziraju mrežu za izvođenje složenih funkcija. Uloga živčanog sustava se primarno ogleda u podražljivosti i provođenju impulsa i signala koji upravljaju cijelim tijelom. Prekusori neurona i glija stanica se razvijaju iz neuroepitelnih stanica neuralne cijevi (Baba i sur. 1997). Neuroni su glavna strukturna i funkcijska jedinica živčanog sustava, čija je primarna uloga stvaranje, provođenje i primanje živčanog signala. Glija stanice su zastupljenije od neurona, čine 90 % stanica u ljudskom mozgu, a obavljaju niz funkcija koje omogućuju aktivnost neurona (He i Sun 2007). Postoje četiri osnovne vrste glija stanica u središnjem živčanom sustavu: astrociti, oligodendrociti, mikroglije i ependimske stanice. Zajedno, ove stanice obavljaju razne uloge koje su bitne za razvoj živčanog sustava, od imunološke (mikroglija), preko trofičke podrške neuronima (astrociti) do omatanja aksona kako bi se omogućilo brzo provođenje živčanog impulsa (oligodendrociti). Također, ove stanice sudjeluju u moduliranju sinaptičke povezanosti i učinkovitosti (astrociti) (Freeman 2010). Nedavno su istraživanja pokazala kako glija stanice mogu također funkcionirati kao živčane matične stanice i pridonijeti neurogenezi ili neuroregeneraciji kod odraslih (Tan i sur. 2017).

Astrociti su najzastupljenije glijalne stanice s nepravilnim staničnim tijelima u obliku zvijezde. Oni intenzivno komuniciraju s neuronima i pružaju im strukturnu i metaboličku podršku (He i Sun 2007). Vrše funkcije na staničnoj razini, poput stvaranja, sazrijevanja i uklanjanja sinapsi, održavanja ionske homeostaze, čišćenja neurotransmitera, regulacije izvanstaničnog prostora i modulacije sinaptičke aktivnosti i plastičnosti. Jedna od važnijih funkcija astrocita je opskrba neurona energijom pomoću laktatnog okidača astrocit-neuron (Siracusa i sur. 2019). Pokazalo se da su astrociti uključeni u dugoročno potenciranje što je važno za sinaptičku plastičnost, učenje i pamćenje (Hol i Pekny 2015). Isto tako, važnost astrocita je i u tome što se pokazalo da igraju važnu ulogu u brojnim bolestima, uključujući traume mozga, ishemiju i neurodegeneraciju. Tako npr. u amiotrofičnoj lateralnoj sklerozi astrociti utječu na sinaptički glutamat, krvno-moždanu barijeru i metaboličku i trofičku potporu (Perić i Mitrečić 2017). Budući da astrociti sisavaca sadržavaju intermedijarne filamentne (IF) proteine: nestin, vimentin i glijalni fibrilarni kiseli protein (engl. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP) (Thomsen i sur. 2013), a ti proteini imaju cijeli niz važnih uloga, osnovni cilj ovog rada je bio istražiti kako se mijenja prisutnost proteina GFAP i nestina u stanjima hipoksije.

## 1.2. Moždani udar

Moždani udar je uz srčani udar najvažniji uzrok smrti u čovjeka. Jedna je od najčešćih neuroloških bolesti širom svijeta koja izaziva invalidnost i smrt. Oko milijun stanovnika Europe doživi moždani udar svake godine, a smatra se kako će do 2025. godine premašiti brojku od milijun i pol stanovnika. Učestalost moždanog udara je svakih 90–300 slučajeva na 100 000 stanovnika, a smrtnost prvih mjeseci je 15–35% (Feigin i sur. 2009). Moždani udar se definira kao brzi razvoj žarišnog neurološkog deficita uzrokovan poremećajem opskrbe krvlju odgovarajućih područja mozga. Postoje dvije vrste moždanog udara: ishemijski koji je učestaliji i javlja se u 87% slučajeva i hemoragijski koji se javlja u ostalih 23% (Grysiewicz i sur. 2008). Ishemijski moždani udar je rezultat začepljenja krvnih žila embolom ili trombom. Smanjeni ili blokirani dotok krvi uzrukuje gubitak kisika i glukoze, a samim time i sintezu ATP-a. Takvi uvjeti dovode do ekscitotoksičnosti i aktivacije reaktivnih astrocita koji se nalaze u žarišnim lezijama i uzrukuju neuroinflamaciju, gijalne ožiljke i aktivaciju protuupalnih citokina (Siracusa i sur. 2019). Astrociti su uključeni u održavanje staničnih funkcija mozga u fiziološkim i patološkim uvjetima, uklanjaju reaktivne kisikove vrste (eng. *reactive oxygen species*, ROS) i upravljaju transportnim mehanizmima kroz krvno–moždanu barijeru. Nakon aktivacije, reaktivni astrociti podliježu morfološkim i funkcionalnim promjenama. Funkcionalni fenotip aktiviranih astrocita može biti štetan ili imati zaštitnu ulogu. Proupalni astrociti gube sposobnost održavanja neurona, rasta, sinaptogeneze i fagocitoze, ali isto tako mogu potaknuti regeneraciju aksona i plastičnosti neurona (Ranjbar Taklimie i sur. 2019).

## 1.3. Hipoksija

Hipoksija je medicinski termin za stanje smanjene razine kisika u krvi. Kako bi ispravno funkcionirao, naš organizam treba stalnu razinu kisika u krvi koja teče do stanica i tkiva. Kada razina kisika padne ispod određene granice, javlja se hipoksija. Fiziološka razina kisika u organizmu je znatno niža od koncentracije kisika u okolini (21%) i varira u različitim tkivima kako bi se prilagodila zahtjevima potrošnje kisika različitih tipova stanica. Živčane matične stanice (eng. *neural stem cells*, NSC) su glavni izvori iz kojih nastaju neuroni i glija stanice središnjeg živčanog sustava tijekom embrionalnog i postnatalnog razvoja i održavaju se u specifičnim regijama tijekom odrasle dobi. One doprinose regeneraciji živčanog tkiva nakon akutne ozljede mozga ili leđne moždine. Budući da je poznato da blaga hipoksija potiče širenje NSC-a, teška hipoksija u patološkim stanjima ima obrnuti učinak (Yan i sur. 2019). Neurogene niše, koje predstavljaju mikro okruženje za samoobnovu i diferencijaciju NSC-a, sadrže relativno širok raspon koncentracije kisika od < 1 do 8% (Mohyeldin i sur. 2010). Blaga hipoksija značajno potiče proliferaciju NSC-a, a teška hipoksija suzbija njihov rast i održava ih u statusu mirovanja. Osim toga, različit stupanj težine hipoksije može imati i suprotne učinke na diferencijaciju i neurogenezu. Stoga, precizna kontrola hipoksičnog okruženja je kritična za regulaciju aktiviranja NSC-a, njihov izlazak iz neurogene niše, te za regulaciju njihove diferencijacije.

Tradicionalno u laboratorijima standardna koncentracija kisika za staničnu kulturu (uključujući NSC kulturu) *in vitro* iznosi 21% (Yan i sur. 2019).

### 1.4. Intermedijarni filamenti, nestin i GFAP

Mehanička svojstva kralježnjaka uglavnom su definirana sustavom intermedijarnih filamenata (IF) koji su sastavni dio stanične strukture većine životinjskih stanica. Sastoje se od jednog ili više članova velike porodice visoko netopljivih proteina kodiranih višestrukim genima (više od 70 u čovjeka). Podjeljeni su na 5 podtipova (I, II, III, IV, V) u koje spadaju različiti proteini sa izvršnim stanicama (Robert i Hookway 2016). Svi proteini IF tipa III su uključeni u strukturu i funkciju citoskeleta stanice. Najprominentnija uloga tih filamenata je osiguravanje mehaničke podrške membrani gdje dolazi u kontakt s drugim stanicama ili s izvanstaničnim matriksom (Middeldorp i Hol 2011). IF u reaktivnim astrocitima sastoji se od GFAP-a, vimentina, nestina i u dijelu reaktivnih astrocita, prisutan je i sininmin (Hol i sur. 2015). Nestin i vimentin su glavni IF nezrelih, a GFAP i vimentin zrelih astrocita (Tamagno i Schiffer 2006 ).

Glijalni fibrilarni kiselinski protein se eksprimira isključivo u astrocitima u središnjem živčanom sustavu (Kassubek i sur. 2017). Glavni je proteinski filament u zrelim astrocitima, ali također je važna komponenta citoskeleta u astrocita tijekom razvoja gdje održava mehaničku čvrstoću i oblik stanice (Middeldorp i Hol 2011). Prvi puta je izoliran iz moždane lezije bolesnika s multiplom sklerozom (Pekny i Pekna 2004). Pokazalo se da je GFAP uključen u procese regeneracije i sinaptičke plastičnosti. Klasični je marker za astrocite, za koje se zna da se induciraju nakon oštećenja mozga ili tijekom degeneracije SŽS-a. Visoko je regulirani protein, čija se ekspresija inducira pomoću više faktora kao što su ozljeda mozga i bolesti. Točna dob u kojoj počinje ekspresija proteina GFAP nije utvrđena no nekoliko studija je izvijestilo da se GFAP prvo pojavljuje u radijalnoj gliji tijekom gestacijskog razdoblja (Middeldorp i Hol 2011). Tijekom sazrijevanja stanica prekursora u astrocite događa se smanjenje izražaja vimentina, a porast izražaja GFAP-a. Istovremeno ekspresija GFAP-a se postupno povećava sa starenjem u ljudi. Iako se stanični volumen astrocita povećava tijekom starenja, broj astrocita koji izražavaju GFAP pokazuje mnogo skromnije promjene. Pojačana ekspresija GFAP tijekom starenja nastaje zbog povećane transkripcije. Razlike u stupnju ekspresije GFAP-a tijekom razvoja i starenja mozga ukazuje na različite funkcije astrocita kao i promjene u funkcijama astrocita tijekom vremena. Osim toga, promjene u ekspresiji GFAP-a mogu izmijeniti morfologiju astrocita, koji bi mogli neizravno utjecati na ostale tipove stanica i strukture mozga (Brenner 2014).

Neuroepitelni protein matičnih stanica ili nestin, međuprodukt je citoskeleta koji se nalazi u živčanim matičnim stanicama gdje je povezan s osnovnim funkcijama, kao što su regeneracija, proliferacija, diferencijacija i migracija. Klasificiran je kao IF protein tipa IV te ima glavnu ulogu u građi citoskeleta. Smatra se biomarkerom invazivnog fenotipa, a povezan je s infiltriranjem

glioblastoma, angiogenezom u brojnim malignim bolestima i širenjem neepitelnog i epitelnog tumora, a općenito se smatra markerom živčanih matičnih stanica (Bernal i Arranz 2018, Thomsen i sur. 2013, Cho i sur. 2013). Stanje u kojem su stanice sposobne diferencirati se iz nezrelog u zreli oblik, najčešće po potrebi (npr. nakon ozljede) se definira kao matičnost. Ekspresija nestina je zapažena kod radijalnih glija stanica u embrionalnom mozgu, ali ga malo sadržavaju i zreli astrociti. Smanjivanje ekspresije nestina u astrocitima se zbiva paralelno s porastom ekspresije GFAP–a. U odraslom mozgu, nestin se značajno izražava samo u astroglijalnim živčanim matičnim stanicama u dvije neurogene regije za koje se vjeruje da nastavljaju neurogenezu nakon rođenja: subventrikularna zona lateralnih komora i subgranularna zona hipokampusa. Također je pokazano kako se nestin pojavljuje u reaktivnim astrocitima nakon neuropatoloških poremećaja, uključujući ishemiju mozga (Tamagno i Schiffer 2006).

## 1.5. Poluautomatizirani programi za analizu slika: *Cell profiler* i *Fiji*

Računalni programi za analizu slika u ovom istraživanju su bili *Cell profiler* i *Fiji.* Oba programa pružaju automatsku analizu velikog broja slika. Jednom kada se predmeti prepoznaju na slikama, računalo izravno prepoznaje i kvantificira njihova svojstva kao što su oblik, veličina i fluorescencija. Postoje dva osnovna pristupa segmentaciji: ručni i automatski. Ako postoji samo ograničen broj slika koje se mogu analizirati, korisnik tada objekte može ručno prepoznati. Ako se mora analizirati veliki broj slika, kao što je to često slučaj pri korištenju slika za biološke analize, bitno je koristiti poluautomatske ili potpuno automatizirane protokol segmentacije. Stanice jednoličnog intenziteta i dobro odvojene jedna od druge mogu se razdvojiti jednostavnim algoritmima praga ili sliva. Takvi algoritmi mogu biti uspješni na stanicama uzgojenim u kulturi, ali općenito djeluju slabo na stanicama u tkivu jer stanice mogu imati neujednačen intenzitet. Često je lakše segmentirati stanične jezgre, a ne cijele stanice jer su jezgre uglavnom jednoličnijeg oblika i manje se prividno preklapaju sa susjednim stanicama, no segmentacija cijelih stanica je potrebna za mnoge eksperimente kao što je kvantificiranje oblika stanica ili ukupna fluorescencija (Megason i Fraser 2007).

*Fiji* program je napredna verzija popularnog softvera *ImageJ-a* usredotočenog na analizu biološke slike. Održava kompatibilnost s *ImageJ*-om i dopunjuje ga u funkcionalnosti te uključuje veliku raznolikost organiziranih knjižnica i dodataka koji su relevantni za biološka istraživanja (Megason i Fraser 2007).

*Cell profiler* je zamišljen kao program koji se koristi u biomedicinskim istraživanjima kako bi se smanjila subjektivna pristranost i omogućila kvantifikacija pri radu s miroskopskim slikama. Riječ je o relativno novom programu, objavljenom 2005. godine. Dizajniran je za dobivanje informacija sa visokim sadržajem za svaku stanicu ili neki drugi predmet od interesa. Sam program nudi napredne algoritme za analizu slika, organizirane kao pojedinačni moduli koji se mogu smjestiti u redoslijedu kako bi formirali tzv. *pipeline* ili hodogram (McQuin i sur. 2018). Tipičan hodogram se sastoji od

učitavanja slika, ispravljanja neujednačenog osvjetljenja, identifikacije objekta i mjerenja na tim objektima. Ti moduli se lako mogu dodati, otkloniti ili preurediti te se onda koristiti za prepoznavanje i mjerenje stanica ili drugih bioloških predmeta i njihovih morfoloških značajka (Lamprecht i sur. 2007).

# 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj ovog istraživanja bio je proučiti prisutnost markera GFAP i nestina u astrocitima u uvjetima normoksije (21% kisika) i hipoksije (1% kisika).

Kako bi se ostvario glavni zadani cilj, određeni su specifični ciljevi:

1. uspostaviti kulturu astrocita miša dobivenu diferencijacijom živčanih matičnih stanica

2. vizualizirati izražaj biljega astrocita (GFAP) i matičnosti (nestin)

3. uspostaviti dvije različite metode kvantifikacije imunohistokemijskog signala pomoću programa za poluautomatsku analizu te usporediti dobivene rezultate.

# 3. MATERIJALI I METODE

## 3.1. Uspostava stanične kulture živčanih matičnih stanica

U ovom istraživanju korištene su živčane matične stanice koje su usmjerene prema diferencijaciji u astrocite. Korištena kultura živčanih matičnih stanica je već postojala zamrznuta tako da je za potrebe ovog istraživanja bila odmrznuta i kultura ponovno uspostavljena. Korištene odmrznute živčane matične stanice dobivene su izolacijom iz telencefalona embrija miša soja C57BL6 Albino starih 14 dana, kako je opisano (Alić i sur. 2016) te smrznute u pasaži 1 (P1). Stanice su se odmrznule, a za istraživanje su bile korištene stanice između pasaža jedan (P1) i pasaža pet (P5) koje su se održavale u mediju za rast koji se sastojao od Dulbecco modificiranog hranjivog medija (eng. *Dulbecco Modified Eagle Medium*, DMEM/F-12) uz dodatak Glutamax™ (dipeptid L-alanine-L-glutamine), 1x N2 (Gibco, Life Technologies, 17502-048, 100x), 1x B27 (Gibco, Life Technologies, 17504-044, 50x), 1x otopine antibiotia i antimikotika Penicilin/Streptomicin (Gibco, Life Technologies, 15070-063, 100x), 20 ng/ml rekombinatnog mišjeg epidermalnog faktora rasta (eng. *Recombinant Mouse Epidermal Growth Factor*, EFG, PMG8041), 10 ng/ml rekombinatnog mišjeg fibroblastnog faktora rasta (eng. *Recombinant Mouse Fibroblast Growth Factor-basic*, FGFb, PMG0035). Radi se o kombinaciji medija za stanične kulture i čimbenika rasta koji su dobro poznati i redovito koršteni u biomedicinskim istraživanjima (Alić i sur. 2016). Stanice su odmrznute na sobnoj temperaturi, a nakon toga prebačene u epruvetu od 15 ml gdje se već nalazilo 9 ml medija za rast. Centrifugirane su 5 minuta pri 200×g. Supernatant je bio pažljivo maknut pomoću pipete, a istaložene stanice nježno resuspendirane s 2 ml medija za rast. Stanice su rasle u suspenziji i kako su se dijelile ostajale su zajedno i stvarale kuglaste nakupine neurosfere. Kada su neurosfere dosegnule veličinu između 150 i 200 $\mu$m, morale su se disocirati, tj. bile su razbijene na pojedinačne stanice jer u protivnom daljnjim rastom neurosfere, stanice u sredini ne bi imale pristup kisiku i hranjivim tvarima. Suspenzija stanica je bila prebačena u epruvetu i stavljena na centrifugiranje pri 400×g tijekom 6 minuta. Supernatant je bio odliven, a istaloženim stanicama dodano 3 ml temperirane akutaze (StemPro Acutase Cell Dissociation Reagent, Gibco by life Technologies) pomoću koje je bila obavljena disocijacija. Koncentracija enzima je bila 5%. Epruvete su se zatim stavljale u vodenu kupelj na 37°C na ukupno 10 minuta. Nakon 5 minuta sadržaj epruvete je bio lagano resuspendiran pomoću pipete 15-tak puta i vraćen ponovno u kupelj na 5 minuta. Nakon provedenih 10 minuta u kupelji, sadržaj epruvete je bio ponovno resuspendiran i prebačen u čistu epruvetu. Kako bi se neutralizirala akutaza, bilo je dodano 9 ml medija DMEM/F-12 i epruvete su stavljene na centrifugiranje pri 400×g tijekom 6 minuta. Za vrijeme centrifugiranja, pripreman je medij za rast živčanih stanica: 22 ml medija DMEM/F-12, 220 µl N2, 220 µl otopine antibiotika i antimikotika Penicilin/Streptomicin, 440 µl B-27, 44 µl EFG, 44 µl FGFb. Nakon centrifugiranja, supernatant je odliven, a talog resuspendiran s 2 ml medija za rast. Za daljnu pasažu, stanice su nasađene u koncentraciji 50 000 stanica

po mililitru medija za rast u 20 ml medija u posudi za uzgoj stanica T75. Stanice su uzgajane u inkubatoru pri 37℃, u 5% ugljikova (IV) oksida.

### 3.2. Diferencijacija živčanih matičnih stanica u astrocite

Kako bi diferencijacija stanica bila usmjerena prema astrocitima, pojedinačne stanice su se nakon disocijacije nasadile na sterilna staklaca promjera 12 mm, prekrivena poli-D-lizinom (eng. *Poly-D-lysine hydrobromide*, PDL, SIGMA) smještena u ploči sa 24 bazenčića u mediju za diferencijaciju kojeg čini DMEM/F12, 5% FSB (fetalni serum), 1% otopina antibiotika i antimikotika Penicilin/Streptomicin. Okrugla pokrovna mikroskopska staklaca bilo je potrebno sterilizirati pa su stoga namočena u 70% etanol i pomoću sterilne pincente provučena kroz plamenik. Nakon što su se ohladila, stakalca su bila postavljena u bazenčiće. Dodano je 400 µl poli-D-lizina (10 µg/ml u vodi) u bazenčiće te stavljeno na inkubaciju preko noći na sobnoj temperaturi. PDL je bio ispran 3×5 minuta s 500 µl sterilne vode, dodano je 400 µl laminina koji potiće rast stanica (10 µg/ml u otopini puferiranoj fosfatima (eng. *Phosphate Buffer Saline*- PBS, pH 7.4, sterilan; Sigma Aldrich) te je stavljeno na inkubaciju 1 sat na 4℃ . Ponovno se ispiralo 2×5 minuta s 500 µl DMEM/F-12. U jednom bazenčiću bilo je 30 000 stanica u 600 µl medija za diferencijaciju. Svaka 3-4 dana pola medija je zamjenjeno sa novim medijem. Stanične kulture su se svakodnevno pregledavale pod mikroskopom kako bi se vidio njihov napredak u diferencijaciji. Nakon 8 dana diferencijacije pod mikroskopom su utvrđeni zreli razgranati astrociti stoga je jedna ploča sa stanicama je bila premještena u inkubator sa 1% kisika (hipoksija) na 24 sata, dok je druga ploča ostavljena u inkubatoru na ambijetalnoj koncentraciji kisika kao kontrola. Nakon 24 sata provedena u inkubatoru, stanice su bile fiksirane 4% paraformaldhidom (PFA) na 15 minuta te isprane 3×5 minuta s 500 µl PBS-a. Pokus je ponovljen dva puta.

### 3.3. Imunohistokemija

Fiksirane i isprane stanice bile su permeabilizirane s 500 µl 0.2% deterđentom Tritonom (Triton, Sigma; 44 µl u 22 ml PBS-a) na 10 minuta. Permeabilizacija je učinjena kako bi membrana postala propusna i omogućila ulazak protutijela. Nakon 10 minuta, stanice su se ponovno ispirale 3×5 minuta s 500 µl PBS-a. Stanice su bile blokirane u 3% kozjem serumu (Sigma) kroz 2 sata kako bi nespecifično vezanje protutijela bilo spriječeno te su isprane PBS-om. Korištena primarna protutijela su bila nestin (iz miša, Milipore, MAB353) razrijeđen u omjeru 1:200 i GFAP (iz kokoši, abcam, ab4674) razrijeđen 1:100. Inkubacija je bila obavljena pri 4 ℃ preko noći. Idućeg dana, stanice su bile isprane PBS-om 3×5 minuta i inkubirane sa sekundarnim protutijelima: za nestin (Alexa Fluor 488 kozje protutijelo protiv mišjih protutijela IgG (LifeTechologies, A11001)) i za GFAP (Alexa Fluor 546 kozje protutijelo IgG protiv mišjih protutijela (LifeTechologies, A11040)) koja su bila razrijeđena u omjeru 1:500 te stavljena

na inkubaciju na ukupno 2 sata. Ponovno su bila isprane PBS-om i inkubirala 10 minuta s fluorescentnom bojom za jezgru DAPI (4' , 6-diamidino-2-fenilindol) koncentracije 2 µg/ml. Stanice su isprane nakon 10 minuta, a staklaca postavljena na predmetnicu pomoću Dako medija za fluorescentno preklapanje (Dako Fluorescent Mounting Medium, S3023). Na jednu predmetnicu su postavljena dva stakalca jer je odrađen dvostruko ponovljeni pokus, a radi jednostavnosti su smještena na istu predmetnicu. Preparati su bili ostavljeni na sušenje u hladnjaku pri 4 ºC. Imunohistokemija je rađena 1., 5. i 8. dan diferencijacije.

### 3.4. Fotografiranje preparata

Nakon što su se fiksirani preparati osušili, bili su spremni za fotografiranje pomoću fluorescentnog mikroskopa (Zeiss, Axio Observer 7). Preparati su bili fotografirani pri povećanju 10×, a vrijeme ekspozicije je bilo 800 milisekunda. Ovi parametri su svugdje bili isti kako bi kasnije slike mogle biti uspoređivane u intenzitetima jer oni direktno utječu na jačinu signala. Preparati su bili fotografirani na ukupno 120 vidnih polja.

### 3.5. Analiza slika pomoću računalnih programa: *Cell profiler* i *Fiji*

Za analizu imunohistokemijskog signala dobivenog slikanjem preparata korišteni su računalni program za analizu slika *Cell profiler* (preuzeto: https://cellprofiler.org/releases/) i *Fiji* (preuzeto: https://imagej.net/Fiji/Downloads ). Oba programa omogućuju analizu velikog broja slika. Analizirano je ukupno 120 setova slika pri čemu jedan set čine 3 slike (DAPI, nestin, GFAP). DAPI je predstavljen plavom bojom, nestin zelenom, a GFAP crvenom bojom.

*Fiji* programom je bilo analizirano ukupno 20 setova slika kako bi poslužile za usporedbu sa *Cell profilerom,* dok je drugim programom bilo analizirano 120 setova slika zbog velike brzine analize.

Kod *Fiji* programa, bilo je potrebno analizirati jednu po jednu sliku i za svaku je bio drugačiji protokol. Prilikom analize prve slike od tri u setu, za određivanje broja jezgra obojanih DAPI bojom za jezgre bilo je potrebno prvo namjestiti da slika bude 8 bit-na. Nakon toga bilo je potrebno namjestiti prag (eng. *treshold*). Prag je granična vrijednost koja kaže da će svi intenziteti piksela iznad tog praga biti brojani kao signal, a svi ispod će biti odbačeni kao pozadina. Nakon mnogo testiranja različitih algoritama za određivanje praga, odabran je onaj po Otsu. Nakon što je računalo odredilo minimalni i maksimalni prag inteziteta signala, dodatno je još ručno podešen. Kada je na slici bio određen prag, vršila se analiza čestica (eng. *analyze particles*) gdje je beskonačnost (eng. *infinity*) najbolje odrediti između 10 i 100, a u ovom istraživanju korišten je svugdje broj 50 te je bila namještena opcija opcrtavanja (eng. *outlines*) stanica na slici. Računalo je izbacivalo srednje vrijednosti inteziteta za svaku stanicu i ta tablica je bila ručno spremljena.

Prilikom analize slika za nestin i GFAP bilo je važno da su pragovi svih slika stanica koje su se nalazile u uvjetima normoksije (21%) i pragovi svih slika stanica koje su se nalazile u uvjetima hipoksije (1%) za promatrani biljeg nestin bili isti kako bi bila moguća usporedna analiza. To je isto tako vrijedilo za biljeg GFAP. Zbog toga je prag kod analize slike stanica za nestina bio namješten na 20, a kod analize slike stanica za GFAP na 24. Prilikom analize, sve je bilo isto kao i za DAPI te je još dodatno vršena analiza mjerenja (eng. *mesure*). Prvo je u setu mjera (eng. *set mesurements*) podešeno da se tražila analiza područja (eng. *area*), analiza minimuma i maksimuma, analiza vrijednosti sivog inteziteta (eng. *gray value*) te srednja ili prosječna vrijednost sivog inteziteta (eng. *mean gray indensity*). Program je izbacivao tablicu s vrijednostima koja je bila ručno spremljena.

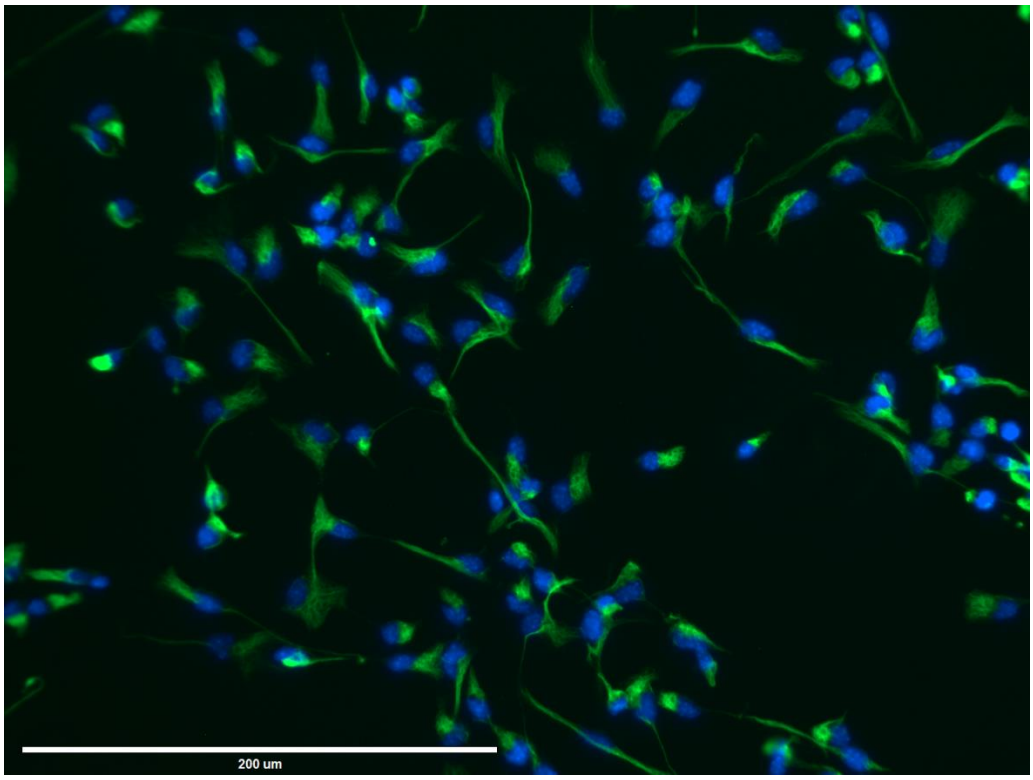
*Cell profiler* je program za koji nije bila potrebna zasebna analiza svake slike, nego se mogao analizirati cijeli set ili svi setovi odjednom. Prilikom analize, ovisno je li bila riječ o slikama dobivenim slikanjem stanica u normoksiji ili hipoksiji za svaku je postojao hodogram. On je bio sastavljen od sljedećih modula: sive boje (eng. *color to gray*), mjerenja kolokalizacije (eng. *measure colocalization*), mjerenja inteziteta objekta (eng. *measure object intensity*), mjerenja inteziteta slike (eng. *measure image intensity*), brojanja jezgri (eng. *nuclei objects*), brojanja stanica koje eksprimiraju nestin (eng. *nestin objects*), brojanja stanica koje eksprimiraju GFAP (eng. GFAP *object*). Dobiveni rezultati su bili spremani ručno i kasnije korišteni u statističkoj obradi.

Statistička obrada podataka napravljena je Mann-Whitney U testom u programu *GrfaphPad Prism*. Riječ je o neparametrijskom testu koji omogućuje usporedbu dviju skupina ili uvjeta ili tretmana bez pretpostavke da su vrijednosti normalno raspoređene. Ovim testom je bila napravljena usporedba srednjih vrijednosti inteziteta (eng. *mean intensity*) GFAP-a u normoksiji i hipoksiji za 60 mjerenja te kod nestina u normoksiji i hipoksiji za 60 mjerenja. Korištene su P vrijednosti koje su dobivene navedenim testom. One predstavljaju opaženu razinu značajnosti za neku testnu hipotezu. Za svaku promatranu vrijednost je pretpostavka modela da je ona bila točna, uključujući i testnu hipotezu. Dobivanjem P vrijednosti manje od 0.05 uočavamo da postoji statistički značajna razlika u promatranim vrijednostima, a P vrijednost veća od 0.05 ukazuje na to da statistički podaci nisu različiti prema statističkom modelu. Prema tome imamo sljedeće vrijednosti i oznake: ns- statistički nije značajno, $p > 0.05$ (eng. *not significant),* * statistički značajno, $p \leq 0.05$ (eng. *statistical significance*), ** statistički velika značajnost, $p \leq 0.01$ (eng. *statistical significance*), *** statistički ekstremna značajnost, $p \leq 0.001$ (eng. *extreme statistical significance*) i **** statistički ekstremna značajnost, $p \leq 0.0001$ (eng. *extreme statistical significance*).

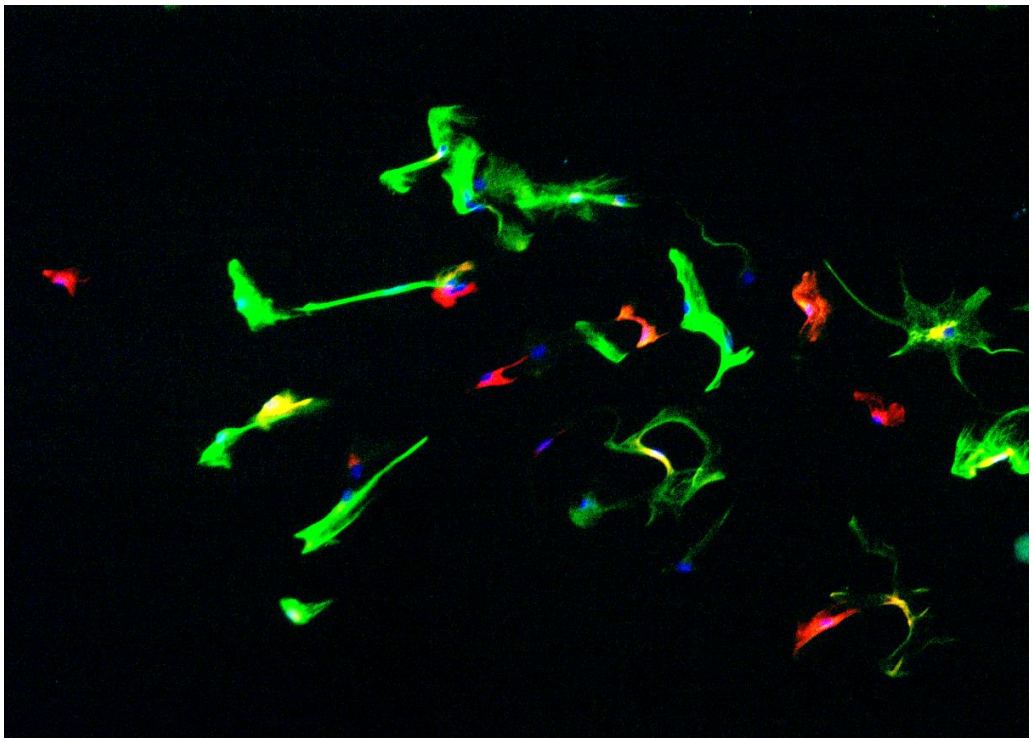
# 4. REZULTATI

## 4.1. Živčane matične stanice se mogu uspješno diferencirati u astrocite

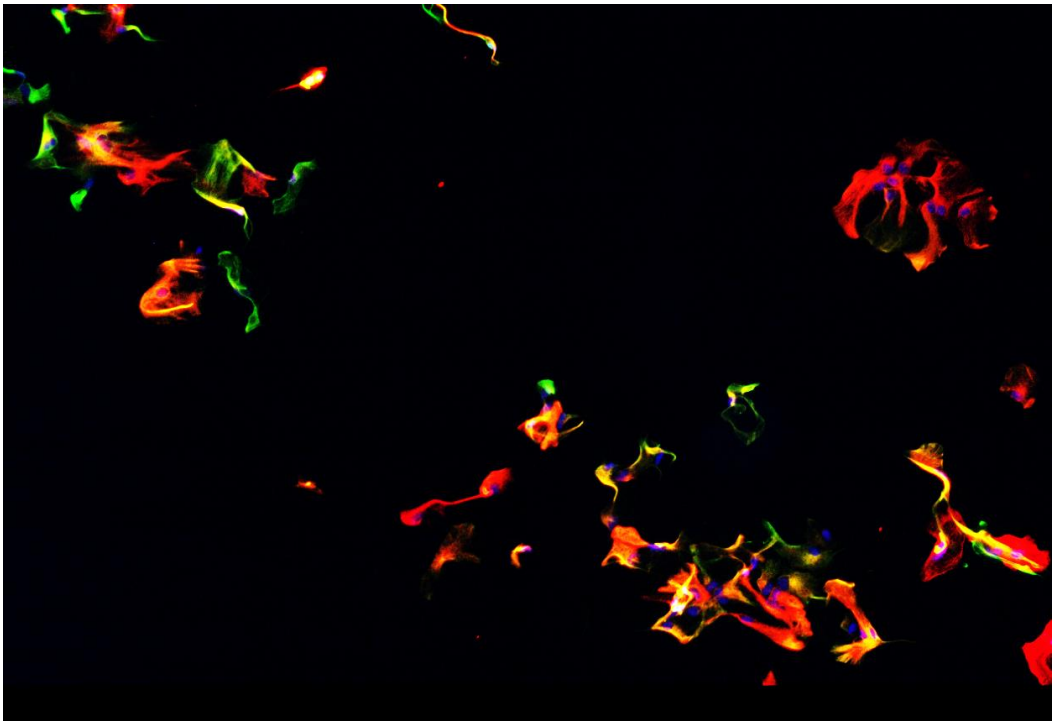
Živčane matične stanice koje su korištene u ovom istraživanju uspješno su diferencirane u astrocite. Stanice dobivene iz telencefalona embrija miša soja C57BL6 starih 14 dana bile su prvotno smrznute, a zatim odmrznute te korištene za uspostavljanje kulture astrocita. Porastom broja stanica, nastajale su kuglaste nakupine – neurosfere koje je bilo potrebno disocirati kada dosegnu veličinu između 150 i 200 μm jer daljnim rastom stanice u sredini ne bi imale dovoljno hranjivih tvari i kisika. Disocijacija je bila provedena uz pomoć enzima akutaze što se pokazalo jako važnim zbog osjetljivosti astrocita. Drugi enzimi, npr. tripsin su dovodili do mnogo većeg odumiranja stanica. Za diferencijaciju stanica prema astrocitima, pojedinačne stanice su bile nasađene na sterilna stakalca na podlozi presvučenoj poli-D-lizinom te je diferencijacija bila praćena 1., 5. i 8. dan. Nakon 8 dana diferencijacije su iz nediferenciranih, nestin-pozitivnih stanica (slika 1) dobiveni zreli, razgranati astrociti (slika 2 i 3).




Slika 1. Imunohistokemijski prikaz nediferenciranih nestin-pozitivnih stanica 1. dana diferencijacije pokazuje duguljaste stanice tipične za nediferencirani stadij jer je još uvijek riječ o živčanim matičnim stanicama. Stanice su nakon fiksacije označene specifičnim protutijelima za protein nestin te su na slici obojene zeleno dok plavo obojenje dobiveno fluorescentnom bojom DAPI prikazuje jezgre.



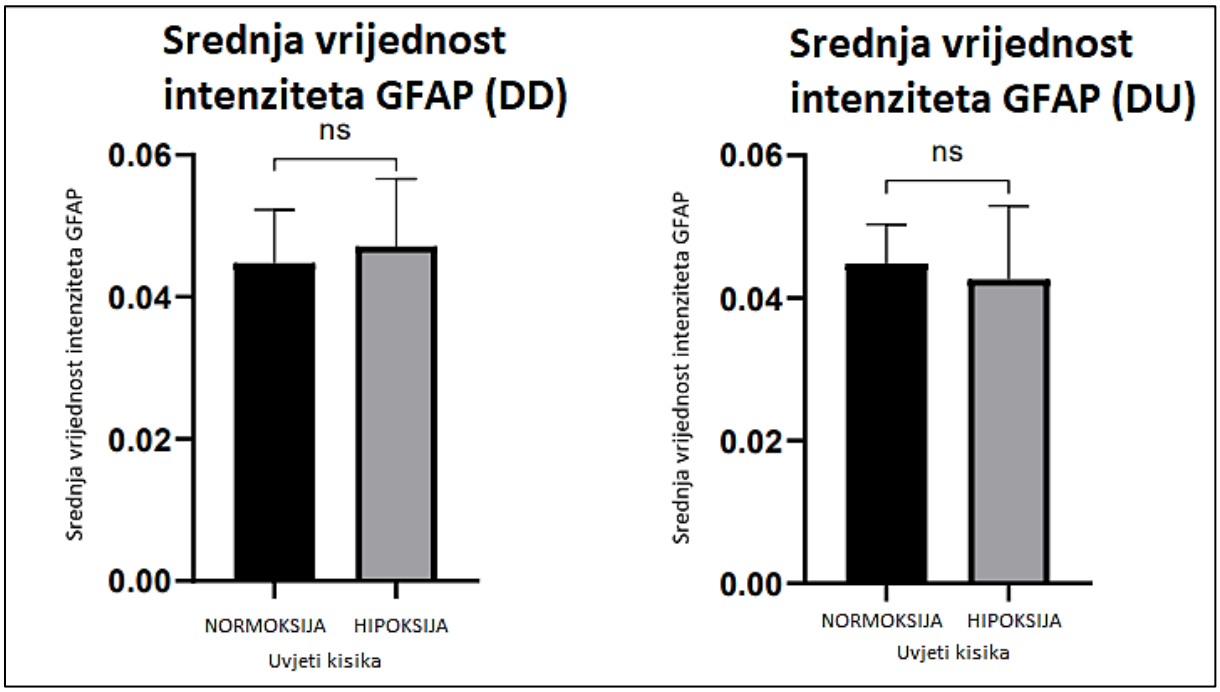
Slika 2. Imunohistokemijski prikaz stanica sa umjereno jakom ekspresijom GFAP-a, povećanje 10×. Stanice su nakon fiksacije označene specifičnim protutijelima gdje je GFAP crveno, a nestin zeleno obojan, jezgre su obojane plavom bojom- DAPI.



Slika 3. Imunohistokemijski prikaz stanica s jakom ekspresijom GFAP-a, 8. dan diferencijacije, povećanje 10×. Stanice su nakon fiksacije označene specifičnim protutijelima gdje je GFAP crveno, a nestin zeleno obojan, jezgre su obojane plavom bojom- DAPI

### 4.2. GFAP je u jednakoj količini prisutan u astrocitima i u normoksiji i u hipoksiji

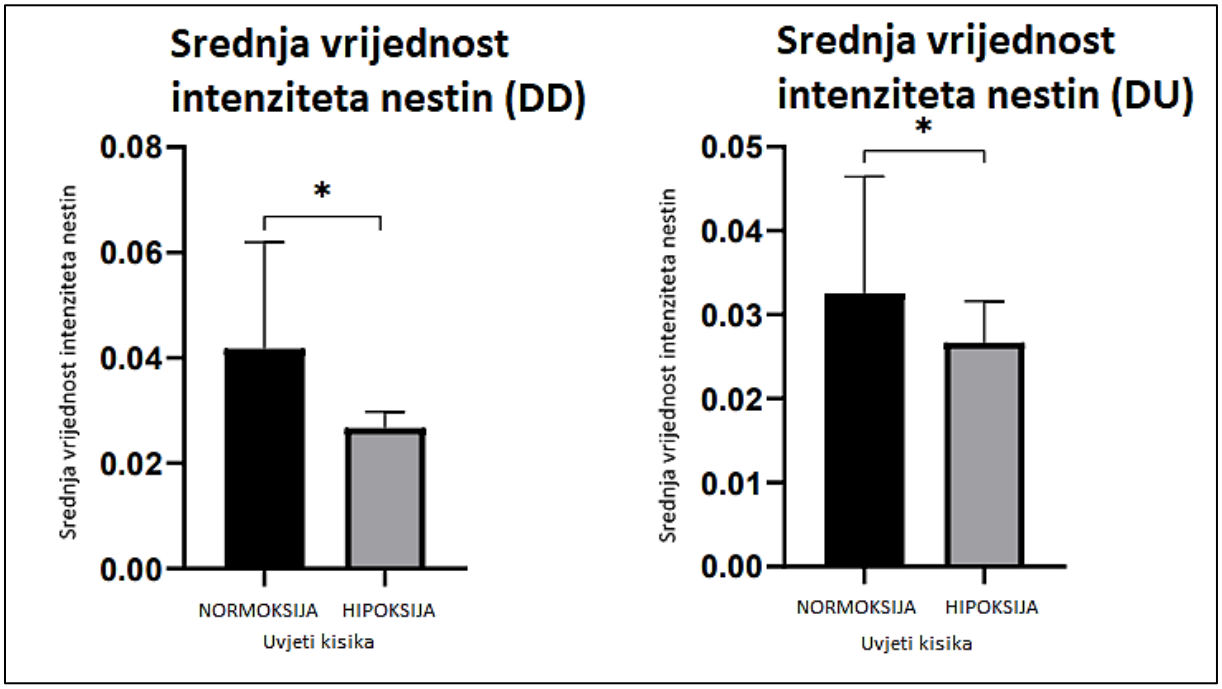
Izražaj GFAP–a u početnim danima diferencijacije je izrazito mali, ali daljnjom diferencijacijom izražaj raste. Tako je najveća prisutnost uočena 8. dana diferencijacije (slika 3). Vizualnom morfološkom analizom uočeno je kako su GFAP-pozitivne stanice razgranati zreli astrociti. Takve stanice imaju veći broj izdanaka i sami izdanci su dulji od onih u nestin–pozitivnih stanica. Pomoću programa *Cell Profiler* se poluatomatski izmjerila jačina ekspresije inteziteta biljega GFAP i nestina u uvijetima normoksije i hipoksije na 120 vidnih polja u uvjetima normoksije i hipoksije (60 normoksija, 60 hipoksija). Grafički prikaz tog rezultata (slika 4) nam pokazuje odnos srednje vrijednosti intenziteta GFAP-a u normoksiji i hipoksiji u dva neovisno ponovljena pokusa. Prema prikazanim rezultatima (slika 4), ne uočava se nikakva značajna razlika između stanica u normoksiji i hipoksiji u izražaju biljega GFAP. Također, morfološki, odnosno vizualno nisu uočene značajne razlike između stanica u različitim uvjetima kisika što se može vidjeti na slikama 6 i 7.



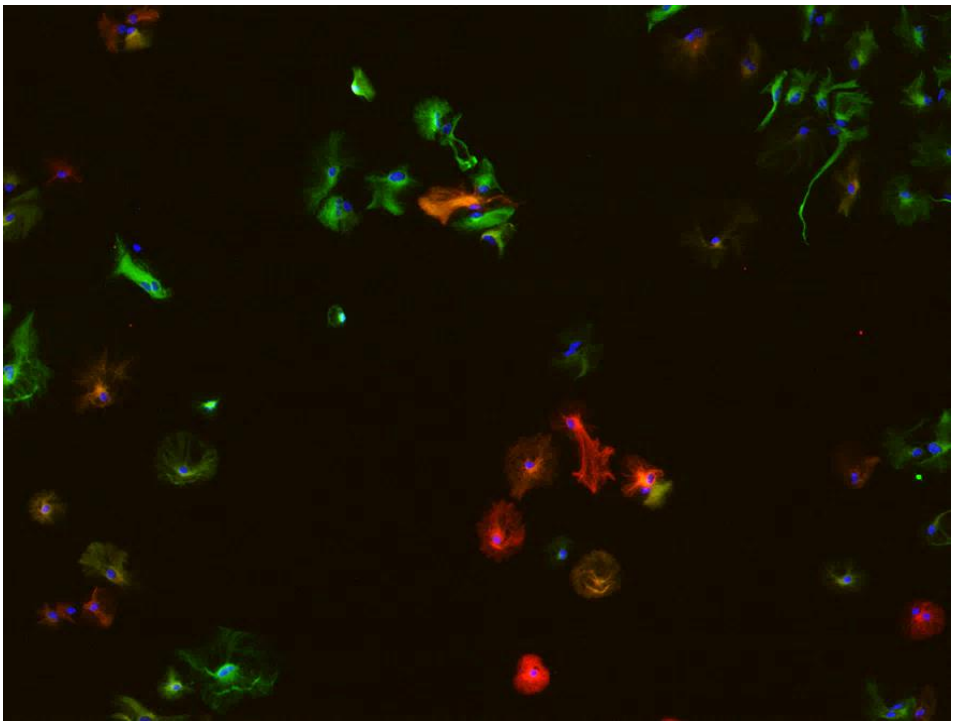

Slika 4. Intenzitet signala koji govori o količini proteina GFAP kod normoksije i hipoksije za 60 mjerenja u dva neovisno ponovljena pokusa (DD i DU). Prikazani su rezultati dobiveni na stakalcu sa stanicama iz jednog pokusa (DD) i stakalcu sa stanicama iz drugog pokusa (DU), ns- nema statistički značajne razlike (eng. *not significant*). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (n =60) ± standardna devijacija, dobiveni Mann-Withney testom u programu *GraphPad Prism.*

### 4.3. Nestin je primarno prisutan u nediferenciranim stanicama, a izlaganje hipoksiji smanjuje njegovu prisutnost u stanicama

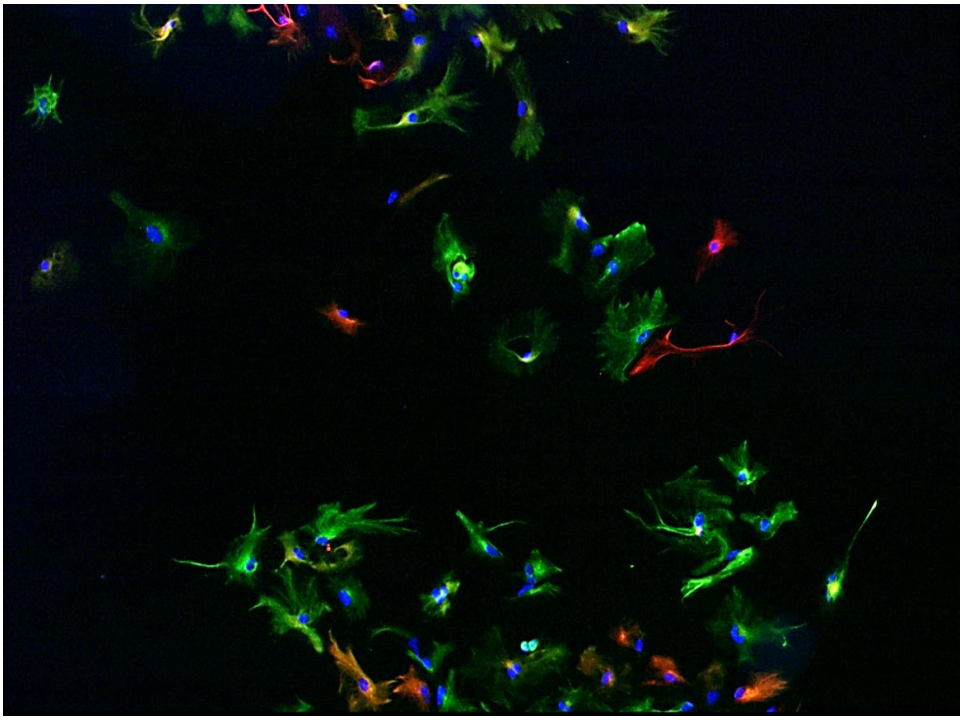
Izražaj nestina je najveći u početku diferencijacije, odnosno u stadiju živčanih matičnih stanica (slika 1). S vremenom kako se stanice diferenciraju tako se i ekspresija nestina smanjuje, a paralelno s njom raste izražaj GFAP-a. Grafički prikaz (slika 5) nam pokazuje odnos izražaja nestina u uvjetima hipoksije i normoksije u dvije neovisne grupe pokusa. U hipoksiji je zapažena smanjena srednja vrijednost intenziteta nestina u odnosu na normoksiju, a razlike se mogu vidjeti prikazane u tablici 3 i 4. Imunohistokemijski prikaz stanica u uvjetima hipoksije (1% kisika) je vidljiv na slici 6 gdje se može uočiti smanjeni broj stanica koje eksprimiraju nestin, a veći broj stanica koje eksprimiraju GFAP. Nasuprot tome, slika 7 je imunohistokemijski prikaz stanica u uvjetima normoksije (21% kisika) gdje je veći broj stanica koje eksprimiraju nestin, a manji broj stanica koje eksprimiraju GFAP.




Slika 5. Intenzitet signala koji govori o količini proteina nestina kod normoksije i hipoksije za 60 mjerenja u dva neovisno ponovljena pokusa (DD i DU). Prikazani su rezultati dobiveni na stakalcu sa stanicama iz jednog pokusa DD i stakalcu sa stanicama iz drugog pokusa DU, * $p<0.05$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (n =60) ± standardna devijacija, dobivenih Mann-Whitney testom u programu *GraphPad Prism.*



Slika 6. Imunohistoemijski prikaz stanica u uvjetima hipoksije 1%, povećanje 10x. Stanice su označene specifičnim protutijelima gdje je GFAP crveno, a nestin zeleno obojan, jezgre su obojane plavom bojom- DAPI



Slika 7. Imunohistokemijski prikaz stanica u uvjetima normoksije 21%, povećanje 10x. Stanice su označene specifičnim protutijelima gdje je GFAP crveno, a nestin zeleno obojan, jezgre su obojane plavom bojom- DAPI

Razlike u izražaju GFAP u normoksiji i hipoksiji su prikazane usporednim prikazom u tablici 1 i 2. U tablicama se mogu vidjeti prikazana srednja vrijednost i standardna devijacija iz kojih se može zaključiti da nema značajnih razlika između izražaja inteziteta biljega GFAP u normoksiji i hipoksiji. Razlike u izražaju inteziteta nestina u normoksiji i hipoksiji su prikazane usporednim prikazom u tablici 3 i 4. Podaci su dobiveni programom *GraphPad Prism*, a odrađen je statistički test Mann-Witney. Dobiveni podaci ukazuju na slične rezultate u dva neovisno ponovljena pokusa (DD i DU).

Tablica 1. Deskriptivna statistika Mann-Whitney testa za intezitet proteina GFAP-a u astrocitima u normoksiji i hipoksiji, dobivenih na stanicama iz jednog pokusa (DD).

| | **NORMOKSIJA** | **HIPOKSIJA** |
|---|---|---|
| **Veličina uzoraka** | 10 | 10 |
| | | |
| **Minimum** | 0.03869 | 0.0392 |
| **25% Percentil** | 0.04037 | 0.04103 |
| **Medijan** | 0.04237 | 0.0435 |
| **75% Percentil** | 0.04598 | 0.05135 |
| **Maksimum** | 0.06228 | 0.06801 |
| | | |
| **Srednja vrijednost** | 0.04476 | 0.04712 |
| **Standardna devijacija** | 0.007486 | 0.009527 |
| **Standardna greška srednje vrijednosti** | 0.002367 | 0.003013 |
| | | |
| **Donjih 95% CI** | 0.03707 | 0.03733 |
| **Gornjih 95% CI** | 0.05246 | 0.05691 |
| | | |
| **Rank srednje vrijednosti** | 9.5 | 11.5 |

Tablica 2. Deskriptivna statistika Mann-Whitney testa za intezitet proteina GFAP-a u astrocitima u normoksiji i hipoksiji, dobivenih na stanicama iz jednog pokusa (DU).

| | NORMOKSIJA | HIPOKSIJA |
|---|---|---|
| **Veličina uzoraka** | 30 | 30 |
| | | |
| **Minimum** | 0.03782 | 0 |
| **25% Percentil** | 0.04057 | 0.04015 |
| **Medijan** | 0.04248 | 0.04148 |
| **75% Percentil** | 0.05013 | 0.04706 |
| **Maksimum** | 0.05839 | 0.07126 |
| | | |
| **Srednja vrijednost** | 0.04481 | 0.0426 |
| **Standardna devijacija** | 0.005508 | 0.01033 |
| **Standardna greška srednje vrijednosti** | 0.001006 | 0.001886 |
| | | |
| **Donjih 95% CI** | 0.04204 | 0.0374 |
| **Gornjih 95% CI** | 0.04758 | 0.0478 |
| | | |
| **Rank srednje vrijednosti** | 32.97 | 28.03 |

Tablica 3. Deskriptivna statistika Mann-Whitney testa za intezitet proteina nestin u astrocitima u normoksiji i hipoksiji, dobivenih na stanicama iz jednog pokusa (DD).

| | NORMOKSIJA | HIPOKSIJA |
|---|---|---|
| **Veličina uzoraka** | 10 | 10 |
| | | |
| **Minimum** | 0.01659 | 0.02218 |
| **25% Percentil** | 0.02775 | 0.02436 |
| **Medijan** | 0.03788 | 0.02645 |
| **75% Percentil** | 0.04947 | 0.02944 |
| **Maksimum** | 0.09001 | 0.03182 |
| | | |
| **Srednja vrijednost** | 0.04174 | 0.0267 |
| **Standardna devijacija** | 0.02021 | 0.00308 |
| **Standardana greška srednje vrijednosti** | 0.00639 | 0.0009739 |
| | | |
| **Donjih 95% CI** | 0.02729 | 0.0245 |
| **Gornjih 95% CI** | 0.0562 | 0.0289 |
| | | |
| **Rank srednje vrijednosti** | 13.5 | 7.5 |

Tablica 4. Deskriptivna statistika Mann-Whitney testa za intezitet proteina nestin u astrocitima u normoksiji i hipoksiji, dobivenih na stanicama iz jednog pokusa (DU).

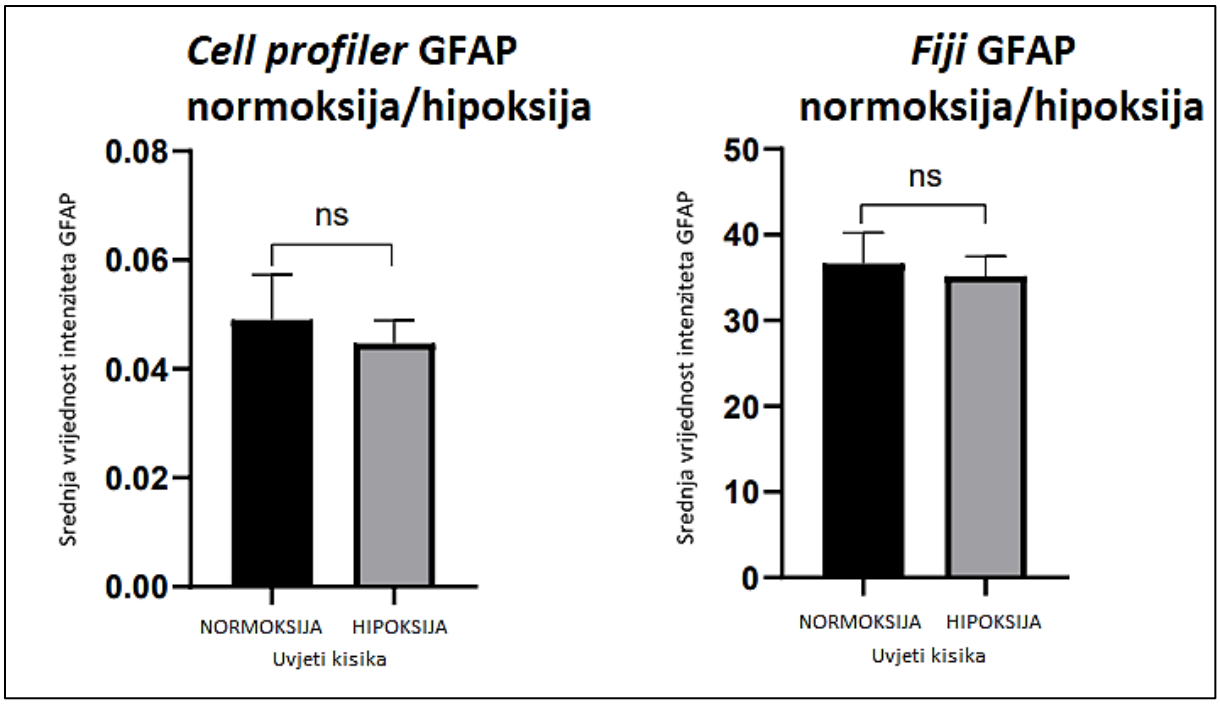
| | NORMOKSIJA | HIPOKSIJA |
|---|---|---|
| **Veličina uzorka** | 30 | 30 |
| | | |
| **Minimum** | 0 | 0.02139 |
| **25% Percentil** | 0.02483 | 0.02435 |
| **Medijan** | 0.0287 | 0.02585 |
| **75% Percentil** | 0.03802 | 0.0275 |
| **Maksimum** | 0.07238 | 0.04819 |
| | | |
| **Srednja vrijednost** | 0.03258 | 0.0267 |
| **Standardna devijacija** | 0.01384 | 0.004884 |
| **Standardna greška srednje vrijednosti** | 0.002527 | 0.0008916 |
| | | |
| **Donjih 95% CI** | 0.02561 | 0.02425 |
| **Gornjih 95% CI** | 0.03955 | 0.02916 |
| | | |
| **Rank srednje vrijednosti** | 35.5 | 25.5 |

### 4.4. Analiza ekspresije nestina i GFAP-a pomoću programa *Cell profiler* i *Fiji* dala je isti rezultat

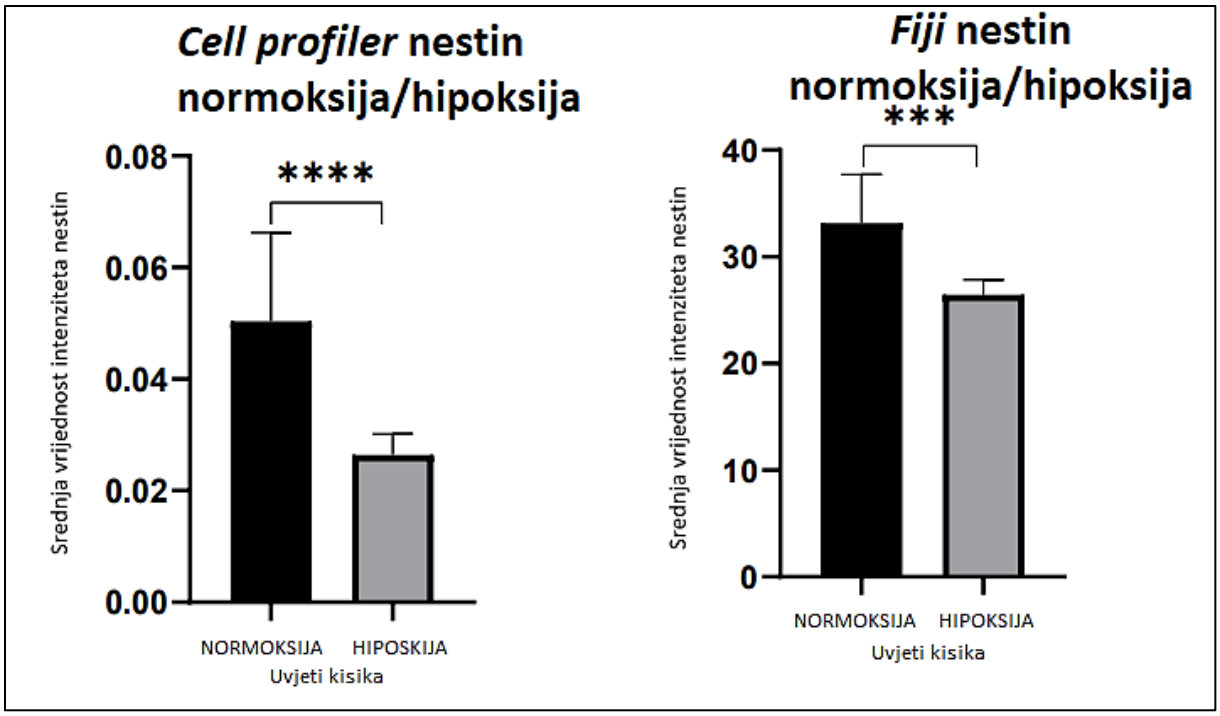
Jedan od ciljeva ovog istraživanja je bio istražiti hoće li programi *Cell profiler* i *Fiji* dati gotovo identične rezultate analize ekspresije dva analizirana signala: nestin i GFAP. Nakon što je analiza imunohistokemijskog signala odrađena ovim programima, nisu nađene razlike između rezultata dobivenih programima *Cell profiler* i *Fiji* (tablica 5). Program *Cell profiler* ima brojčanu vrijednost za intezitet od 0.00 do 0.08, a *Fiji* od 0 do 50. Programi sami određuju ove brojčane vrijednosti prema svojim algoritmima. Grafički prikazi slika 8 i 9 pokazuju srednju vrijednost inteziteta nestina i GFAP-a koji su dobiveni analizom pomoću programa *Cell profiler* i *Fiji*. Uočljivo je kako ne postoje razlike u dobivenim intezitetima signala između ova dva programa. Na slici 8, dobivene srednje vrijednosti inteziteta proteina GFAP ukazuju da nema statistički značajne razlike između normoksije i hipoksije što pokazuju oba programa. S druge strane na slici 9 se mogu vidjeti razlike u izražaju nestina u hipoksiji i normoksiji koje su statistički značajno različite. Razlika u intezitetu nestina između stanica u normoksiji i hipoksiji u *Cell profileru* je statistički značajna na razini $p < 0.0001$ dok je analiza programom *Fiji* pokazala statističku značajnost na razini p između 0.0001 i 0.001. Riječ je o statistički ekstremno značajnim vrijednostima (eng. *extreme statistical significance*) stoga možemo reći da *Cell profiler* i *Fiji* ne pokazuju značajno drugačije razlike u intezitetima signala.

Tablica 5. Prikaz P vrijednosti dobivenih Mann-Whitney testom za rezultate intenziteta signala nestina i GFAP u astrocitima u uvjetima normoksije i hipoksije koji su dobiveni analizom pomoću programa *Cell profiler* i *Fiji*, ns- nije statistički značajno, *** označava $p \leq 0.001$, **** označava $p \leq 0.0001$

| **Protutijela** | **Računalni program** | **Grafički prikaz P vrijednosti** | **P vrijednost** | **Statistički značajna razlika izražaja između normoksičnih i hipoksičnih uvjeta** |
|---|---|---|---|---|
| Nestin | Fiji | *** | 0.0004 | DA |
| Nestin | Cell Profiler | **** | 0.0001 | DA |
| GFAP | Fiji | ns | 0.2703 | NE |
| GFAP | Cell Profiler | ns | 0.133 | NE |




Slika 8. Usporedba intenziteta signala dobivenih računalnim programima *Cell profiler* i *Fiji* koja govori o količini proteina GFAP u astrocitima kod normoksije i hipoksije, ns- nema statistički značajne razlike (eng. *not significant*). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (n =60) ± standardna devijacija, dobivenih Mann-Whitney testom u programu *GraphPad Prism.*




Slika 9. Slika 8. Usporedba intenzitet signala dobivenih računalnim programima *Cell profiler* i *Fiji* koja govori o količini proteina nestin u astrocitima kod normoksije i hipoksije, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n = 60$) ± standardna devijacija, dobivenih Mann-Whitney testom u programu *GraphPad Prism.*

# 5. RASPRAVA

U posljednja dva desetljeća se značajno povećalo znanje o važnosti astrocita za normalno funkcioniranje živčanog sustava. Istovremeno je postalo jasno da astrociti sudjeluju u gotovo svakom patološkom zbivanju u živčanom sustavu. Danas znamo kako astrociti imaju mnogo širu funkciju od samo podržavanja neurona u mozgu jer imaju specijalizirane funkcije u indukciji i regulaciji krvno-moždane barijere, štite neurone od viška neurotransmitera, promiču sinaptičku plastičnost, koordinatori su aktivnosti neurona putem izravne komunikacije s neuronima i predstavljaju živčane matične stanice u mozgu odraslih (Middeldorp i Hol 2011).

U ovom istraživanju, primarna kultura živčanih matičnih stanica je bila uspješno diferencirana u astrocite. Živčane matične stanice su dobivene iz telencefalona embrija miša soja C57BL6 starih 14 dana koje su bile zamrznute. Odmrzavanjem se uspostavila kultura stanica koja je bila nasađena na sterilnim stakalcima te postavljena u ploče sa bazenčićima kako bi se diferencijacija usmjerila prema astrocitima. U početnim danima diferencijacije prisutne su nestin-pozitivne stanice. Nestin je intermedijarni filament koji se široko koristi kao marker neuroepitelnih matičnih stanica pa je stoga njegovo prisutstvo u početnim fazama diferencijacije bilo očekivano. U dosadašnjim istraživanjima je pokazano kako gotovo sve nestin-pozitivne stanice izražavaju faktor transkripcije Sox2 ili Sox9 koji je pronađen u neuralnim i glijalnim progenitorskim stanicama po čemu je zaključeno da nestin-pozitivne stanice nakon ishemijskog moždanog udara mogu odgovarati živčanim matičnim stanicama (Cho i sur. 2013). Isto tako, nekoliko studija je pokazalo da se novorođeni neuroni pojavljuju u degeneriranoj CA1 regiji prednjeg mozga nakon ishemije i da subpopulacija reaktivnih astrocita na mjestu ozljede također djeluje kao živčane matične stanice (Ihrie i Alvarez-Buylla 2008). Indukcija nestina u astrocitima ukazuje na karakterističan izraz koji je povezan s težinom oštećenja neurona pa tako je reaktivnoj astrogliji koja izražava nestin, omogućeno strukturno preuređenje stanica kao odgovor na ishemijsku ozljedu (Cho i sur. 2013). Prema tome možemo zaključiti da nestin ima utjecaj na migraciju i diferencijaciju matičnih stanica.

Kako su dalje odmicali dani diferencijacije, postupno se smanjivala razina nestina, a paralelno s time rasla razina GFAP-a koji se izvorno smatra intermedijarnim filamentom specifičnim za zrele astrocite. Mnoga istraživanja su otkrila i potvrdila prisutstvo GFAP-a u perifernim glija i Schwanovim stanicama. Početni izražaj GFAP-a kod mozga u razvoju započinje u radijalnoj gliji u gestacijskom razdoblju. One su bipolarne stanice u ventrikularnoj zoni koje također eksprimiraju nestin pa mogu djelovati kao živčane matične stanice (Middeldorp i Hol 2011). Nakon 8 dana, dobivena je potpuno zrela i diferencirana kultura stanica. Stupanj diferenciranosti se mogao utvrditi vizualnom morfološkom analizom zrelih stanica prema povećanju broja i debljini nastavaka te prema izražaju biljega nestin i GFAP. Utvrđeno je da je razina nestina u početnim danima diferencijacije velika i da je nestin izrazito

izražen prvih dana jer je još uvijek riječ o živčanim matičnim stanicama koje se još nisu diferencirale. Budući da zrele stanice, u ovom slučaju zreli astrociti nisu nestin-pozitivni, razina nestina se polako smanjivala dok je razina GFAP-a paralelno s time rasla.

Neka dosadašnja istraživanja tvrde da su povećanje broja astrocita i pojačana ekspresija GFAP-a pokazatelji reaktivne glioze, procesa za kojeg je pokazano da je usko povezan s oštećenjem mozga i starenjem. Tako je porast GFAP-a u hipokampusu, frontalnoj i temporalnoj kori tipičan za stariju dob. Hipokampus je regija koja je najviše pogođena reaktivnom gliozom i vjerojatno je također inicijalna regija koja je zahvaćena tijekom starenja. Razlike u izražavanju GFAP-a tijekom razvoja i starenja mozga ukazuju na različite funkcije astrocita kao i promjene u funkcijama astrocita tijekom vremena. Osim toga, promjene u ekspresiji GFAP-a mogu izmijeniti morfologiju GFAP pozitivnih astrocita koji bi mogli neizravno utjecati na ostale tipove stanica i strukture mozga (Middeldorp i Hol 2011). Broj istraživanja o GFAP-u nastavio se povećavati i dobiveni su dokazi o ulozi GFAP-a u procesima astrocita kao što su pokretljivost, mitoza i sinaptička plastičnost. Međutim, povećanu imunoreaktivnost GFAP-a u ishemijskom hipokampusu nije nužno pratila indukcija nestina, što ukazuje da izražaj nestina nije sam po sebi parametar koji predviđa astroglijalnu reakciju (Cho i sur. 2013). Zašto se nestin ponovno pojavljuje u reaktivnim astrocitima i kakva je regulacija GFAP-a u njima, nije još poznato, ali smatra se da su važni za promjene koje prate astrogliozu (Sergent-Tanguy i sur. 2006).

Budući da je ovaj rad bio fokusiran na patološka zbivanja vezana uz manjak kisika (moždana ishemija, moždani udar), posebna pozornost je bila posvećena astrocitima u stanjima nedostatka kisika pa je analiziran utjecaj hipoksije i normoksije na astrocite miša. Stoga je jedna ploča sa stanicama bila premještena u inkubator gdje su bili uvjeti hipoksije (1% kisika), a druga je ostala na ambijetalnoj koncentraciji kisika (normoksija) kao kontrola. Usporedbom izražaja nestina i GFAP između normoksijskih i hipoksijih uvjeta uočena je statistički značajna razlika u ekspresiji nestina. Ekspresija nestina u uvjetima hipoksije je bila znatno smanjena u odnosu na normoksiju, dok se razina GFAP-a nije značajno promijenila u hipoksiji. Prema provedenom istraživanju nestin-pozitivne / GFAP-pozitivne stanice imaju nižu stopu proliferacije od nestin-pozitivnih / GFAP-negativnih te se sugerira da stanice s takvom ekspresijom IF proteina ukazuju na prisutnost stanica koje mogu imati sposobnost proliferacije i mogućnost stvaranja neurona i astrocita poput živčanih matičnih stanica (Sergent-Tanguy i sur. 2006).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su prisutnost nestina u matičnim živčanim stanicama te opadanje njegove razine tijekom daljnje diferencijacije, ali isto tako uočena je i smanjena količina nestina nakon hipoksičnog oštećenja. Ovo odgovara istraživanju koje su proveli Sergent-Tanguy i ostali (2006) koji su proveli istraživanje o koekspresiji nestina i GFAP-a u primarnim kulturama astroglijalnih stanica. Na temelju svojeg istraživanja zaključili su da stanice oštećene hipoksijom zadržavaju sposobnost proliferacije i obnavljanja.

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je uspostaviti dvije metode za analizu imunohistokemijskog signala te utvrditi postoje li značajne razlike među njima. Računalni programi pomoću kojih su bile analizirane slike bili su *Cell Profiler* i *Fiji*. Oba programa, kao što je i prikazano u rezultatima nisu pokazala značajne razlike u rezultatima analize intenziteta signala. Dobiveni rezultati su bili isti ili su postojale minimalne razlike koje se nisu statistički razlikovale. Prema iskustvu stečenom u ovom istraživanju, ono što ih najviše razlikuje jest to da *Cell profiler* zahtjeva nešto više vremena da se isprogramira i testira hodogram, ali kada se postavi, omogućuje analizu velikog broja slika u kratkom vremenu. Istovremeno je *Fiji* možda malo više otvoren u smislu razumijevanja što koja naredba radi, što olakšava fino podešavanje. Do sličnih zaključaka su došli McQuin i ostali (2018), koji su proveli istraživanje uspoređujući slike stanica kroz ova dva programa te su usporedili kvalitetu dobivenih slika i setove mjera koje su proveli. Nakon provedene usporedbe zaključili su kako nema razlike u kvaliteti krajnjih rezultata između ova dva programa.

# 6. ZAKLJUČAK

1. Živčane matične stanice se mogu diferencirati u astrocite, a tako dobiveni astrociti se mogu koristiti za istraživanja.
2. Ekspresija intermedijarnog proteina nestina je najveća na samom početku diferencijacije, ali opada kako stanična diferencijacija napreduje.
3. Ekspresija proteina GFAP najveća je 8. dan diferencijacije, kada su dobiveni potpuno zreli, razgranati astrociti.
4. Usporedbom uvjeta normoksije i hipoksije nije nađena značajna promjena izražaja GFAP-a.
5. Usporedbom uvjeta normoksije i hipoksije nađen je značajan pad izražaja nestina u hipoksiji u odnosu na normoksiju.
6. Usporedbom programa za analizu slika *Cell profiler* i *Fiji* nije utvrđena značajna razlika u kvaliteti dobivenih rezultata analize intenziteta signala na fotografiji između ova dva programa.

# 7. LITERATURA


1. Alić I., Kosi N., Kapuralin K., Gorup D., Gajović S., Pochet R., Mitrečić D. (2016): Neural stem cells from mouse strain Thy1 YFP-16 are a valuable tool to monitor and evaluate neuronal differentiation and morphology. Neurosci Lett. 634: 32-41.
2. Baba H., Nakahira K., Morita N., Tanaka F., Akita H., Ikenaka K. (1997): GFAP gene expression during development of astrocyte. Dev Neurosci. 19(1): 49-57.
3. Bernal A., Arranz L. (2018): Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. Cell Mol Life Sci. 75(12): 2177-2195.
4. Brenner M. (2014): Role of GFAP in CNS injuries. Neurosci Lett. 565: 7-13.
5. Cho J. M., Shin Y. J., Park J. M., Kim J., Lee M. Y. (2013): Characterization of nestin expression in astrocytes in the rat hippocampal CA1 region following transient forebrain ischemia. Anat Cell Biol. 46(2): 131-140.
6. Falk S., Götz M. (2017): Glial control of neurogenesis. Curr Opin Neurobiol. 47: 188-195.
7. Feigin V. L., Lawes C. M., Bennett D.A., Barker-Collo S. L., Parag V. (2009): Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. Lancet Neurol. 8(4): 355-369.
8. Felling R.J., Covey M.V., Wolujewicz P., Batish M., Levison S.W. (2016): Astrocyte-produced leukemia inhibitory factor expands the neural stem/progenitor pool following perinatal hypoxia-ischemia. J Neurosci Res. 94(12): 1531-1545.
9. Freeman M. R. (2010): Specification and morphogenesis of astrocytes. Science 330: 774-778.
10. Gonzalez-Perez O., Quiñones-Hinojosa A. (2012): Astrocytes as neural stem cells in the adult brain. J Stem Cells. 7(3): 181-188.
11. Grysiewicz R. A., Thomas K., Pandey D. K. (2008): Epidemiology of ischemic and hemorrhagic stroke: incidence, prevalence, mortality, and risk factors. Neurol Clin. 26(4): 871.
12. Hathidara M. Y, Saini V., Malik A. M. (2019): Stroke in the Young: a Global Update. Curr Neurol Neurosci Rep. 19(11): 91.
13. He F., Sun Y.E. (2007): Glial cells more than support cells?. Int J Biochem Cell Biol 39(4): 661-665.
14. Hol E. M., Pekny M. (2015): Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. Curr Opin Cell Biol. 32: 121-130.
15. Hribljan V., Lisjak D., Petrović D.J., Mitrečić D. (2019): Necroptosis is one of the modalities of cell death accompanying ischemic brain stroke: from pathogenesis to therapeutic possibilities. Croat Med J. 60(2): 121-126.
16. Ihrie R. A., Alvarez-Buylla A. (2008): Cells in the astroglial lineage are neural stem cells. Cell Tissue Res. 331(1): 179-191.

17. Johann S. (2017): Astrocytes Pathology in ALS: A Potential Therapeutic Target?. Curr Pharm Des. 23(33): 5022-5036.
18. Kassubek R., Gorges M., Schocke M., Hagenston A. M. V., Huss A., Ludolph C. A., Kassubek J., Tumani H. (2017): GFAP in early multiple sclerosis: A biomarker for inflammation. Neurosci Lett. 657: 166-170.
19. Lamprecht MR, Sabatini DM, Carpenter AE (2007): CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis. Biotechniques 42(1):71-75.
20. Mazzini L., Ferrari D., Andjus P.R., Buzanska L., Cantello R.., De Marchi F., i suradnici. (2018): Advances in stem cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis. Expert Opin Biol Ther. 18(8): 865-881.
21. McQuin C., Goodman A., Chernyshev V., Kamentsky L., Cimini B. A., Karhohs K. W., Doan M., Ding L., Rafelski S. M., Thirstrup D., Wiegraebe W., Singh S., Becker T., Caicedo J. C., Carpenter A.E. ( 2018): CellProfiler 3.0: Next-generation image processing for biology.
22. Megason S. G., Fraser S. E. (2007): Imaging in systems biology. Cell 130: 784–795.
23. Middeldorp J., Hol E. M. (2011): GFAP in health and disease. Prog Neurobiol. 93(3): 421-443.
24. Mitrečić D., Gajović S., Pochet R. (2009): Toward the treatments with neural stem cells: experiences from amyotrophic lateral sclerosis. Anat Rec (Hoboken). 292(12): 1962-1967.
25. Mohyeldin A., Garzón-Muvdi T., Quiñones-Hinojosa A. (2010): Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. Cell Stem Cell. 7(2): 150-161.
26. Morken T. S., Brekke E., Håberg A., Widerøe M., Brubakk A. M., Sonnewald U. (2014): Altered astrocyte-neuronal interactions after hypoxia-ischemia in the neonatal brain in female and male rats. Stroke. 45(9): 2777-2785.
27. Pekny M., Pekna M. (2004): Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. J Pathol. 204(4): 428-437.
28. Perić M., Mitrečić D., Andjus P. R. (2017): Targeting Astrocytes for Treatment in Amyotrophic Lateral Sclerosis. Curr Pharm Des. 23(33): 5037-5044
29. Randolph S. A. (2016): Ischemic Stroke. Workplace Health Saf. 64(9): 444.
30. Ranjbar Taklimie F., Gasterich N., Scheld M., Weiskirchen R., Beyer C., Clarner T., Zendedel A. (2019): Hypoxia Induces Astrocyte-Derived Lipocalin-2 in Ischemic Stroke. Int J Mol Sci. 20(6): 1271.
31. Robert A., Hookway C., Gelfand V. I. (2016): Intermediate filament dynamics: What we can see now and why it matters. Bioessays. 38(3): 232-243
32. Sergent-Tanguy S., Michel D. C., Neveu I., Naveilhan P. (2006): Long-lasting coexpression of nestin and glial fibrillary acidic protein in primary cultures of astroglial cells with a major participation of nestin(+)/GFAP(-) cells in cell proliferation. J Neurosci Res. 83(8): 1515-1524.
33. Siracusa R., Fusco R., Cuzzocrea S. (2019): Astrocytes: Role and Functions in Brain Pathologies. Front Pharmacol. 10: 1114.

34. Suzuki S., Namiki J., Shibata S., Mastuzaki Y., Okano H. (2010): The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature. J Histochem Cytochem. 58(8): 721-730.
35. Tamagno I., Schiffer D. (2006): Nestin expression in reactive astrocytes of human pathology. J Neurooncol. 80(3): 227-233.
36. Tan Z. J., Ju S. H., Huang X., Gu Y. K., Su Z. D. (2007): Glial cells function as neural stem cells and prgenitor cells. Sheng Li Xue Bao. 69(2): 207-217.
37. Thomsen R., Pallesen J., Daugaard T. F., Børglum A. D., Nielsen A. L. (2013): Genome wide assessment of mRNA in astrocyte protrusions by direct RNA sequencing reveals mRNA localization for the intermediate filament protein nestin. Glia. 61(11): 1922-1937.
38. Vasile F., Dossi E., Rouach N. (2017): Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. Brain Struct Funct. 222(5): 2017-2029.
39. Yan J., Goerne T., Zelmer A., Guzman R., Kapfhammer P. J., Wellmann S., Zhu X. (2019): The RNA-Binding Protein RBM3 Promotes Neural Stem Cell (NSC) Proliferation Under Hypoxia. Front Cell Dev Biol. 7: 288.
40. Yuasa S. (2001): Development of astrocytes in the mouse embryonic cerebrum tracked by tenascin-C gene expression. Arch Histol Cytol. 64(1): 119-126.

# 8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Koprivnici, 22.5.1996. Osnovnu školu „Đuro Ester“ završavam u Koprivnici te upisujem jezičnu gimnaziju „Fran Galović“ Koprivnica. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja polažem francuski jezik s razinom znanja B1. Upisujem preddiplomski studij biologije na Biološkom odsjeku, Sveučilišta Josipa Juraja Strossmayera u Osijeku. Tijekom preddiplomskog studija, dvije godine radim kao demonstrator na vježbama iz kolegija Mikrobiologija te sudjelujem u organiziranju društvenog događaja na fakultetu „BIOLOGiJA“. Nakon završetka preddiplomskog studija, 2018. godine upisujem Diplomski studij eksperimentanlne biologije, smjer Fiziologija i imunobiologija na Prirodoslovnom-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Sudjelujem u organiziranju „Noći biologije“ na PMF-u te sam jedan od organizatora projekta „Meet the Biologist 2020.“ Tijekom studija odrađujem praksu u Laboratoriju za matične stanice Hrvatskog instituta za istraživanje mozga, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.