

Utjecaj akutne neonatalne hipoksije na ekspresiju gena za vazoaktivni intestinalni peptid u hipokampusu adolescentnih štakora

Runko, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:992252>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Valentina Runko

**Utjecaj akutne neonatalne hipoksije na
ekspresiju gena za vazoaktivni intestinalni
peptid u hipokampusu adolescentnih
štakora**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Valentina Runko

**The effect of acute neonatal hypoxia on the
expression of vasoactive intestinal
polypeptide gene in adolescent rat
hippocampus**

Master thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je dio istraživanja koje je inicirano, osmišljeno, financirano i provedeno u svrhu projektnog cilja „Razvoj novih eksperimentalnih in vivo modela" u okviru Znanstvenog centra izvrsnosti - Neuro (projekt „Eksperimentalna i klinička istraživanja hipoksijsko-ishemijskog oštećenja mozga u perinatalnoj i odrasloj dobi" (KK.01.1.1.01.0007, voditelja prof. dr.sc. Miloša Judaša) i projekta „Moždani izvanstanični matriks u razvitku i perinatalnoj hipoksiji" (HRZZ, IP-2019-04-3182, voditeljice prof.dr.sc. Nataše Jovanov Milošević), kojih je nositelj Medicinski fakultet, a na kojima je prof.dr.sc. Dubravka Hranilović suradnik.

Uzgoj, selekciju štakora i „in vivo" pokuse hipoksije, perinatalna biometrijska mjerenja i postnatalni monitoring štakora u Odsjeku za laboratorijske životinje na HIIM Medicinskog fakulteta u Zagrebu te izolaciju moždanih regija za daljnje molekularne i analize ekspresije gena u moždanom tkivu, izvela je Sara Trnski, dr.vet.med. temeljem projekta HrZZ „Razvoj karijere doktoranda" (DOK 2018-01-3771) pod mentorstvom prof.dr.sc. Nataše Jovanov Milošević u okviru projekata „Eksperimentalna i klinička istraživanja hipoksijsko-ishemijskog oštećenja mozga u perinatalnoj i odrasloj dobi“, (KK.01.1.1.01.0007HRZZ) i „Moždani izvanstanični matriks u razvitku i perinatalnoj hipoksiji" (IP-2019- 04-3182).

Svi in vivo pokusi i uzorkovanja na životinjama za navedena istraživanja odobreni su 2019. od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta (Ur.br. 380-59-10106-19-111/210) i Etičkog povjerenstva za zaštitu životinja koje se koriste u znanstvene svrhe Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (EP231/2019; UP/I-322-01/19.01/75, voditelj pokusa dr. Sara Trnski), a sukladno odredbama Zakona o zaštiti životinja (102/17 i 32/19) i Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN55/13; 39/17; 116/119).

Diplomski rad izrađen je pod neposrednim mentorstvom prof.dr.sc. Dubravke Hranilović u Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovna-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

ZAHVALE

U prvom redu moram se zahvaliti mentorici prof. dr. sc. Dubravki Hranilović i asistentici mr. sc. Barbari Nikolić, bez kojih ovaj diplomski rad ne bi bio moguć. Mnogo mi je značila ugodna i kvalitetna suradnja, kako tijekom eksperimentalnog dijela, tako i tijekom pisanja. Posebno se želim zahvaliti mentorici na strpljenju i trudu pri usavršavanju konačne verzije rada.

Također veliko hvala dugujem svojoj majci Vesni Curić, te prijateljicama Ani Matešković, Antoneli Tomašić i Petri Crnić, čija mi je podrška bila od neizmjerne važnosti.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj akutne neonatalne hipoksije na ekspresiju gena za vazoaktivni intestinalni peptid u hipokampusu adolescentnih štakora

Valentina Runko

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Vazoaktivni intestinalni peptid (VIP) je regulatorna molekula, koja u sisavaca ima ulogu neurotransmitera, hormona te faktora rasta i razvoja. Unutar hipokampusa, VIP sudjeluje u kontroli sinaptičke plastičnosti, poput dugotrajne potencijacije i dugotrajne depresije. Smatra se da neuronski krugovi koji ekspimiraju VIP moderiraju prostorno učenje potaknuto nagradom. Ovisno o stupnju i trajanju, prenatalna hipoksija u ljudi spada u faktore rizika za niz poremećaja, uključujući cerebralnu paralizu, poremećaj pažnje s hiperaktivnošću, poremećaje autističnog spektra te poteškoće u prostornom učenju i radnoj memoriji. U ovom smo radu, koristeći model akutne neonatalne hipoksije u normobaričnim uvjetima, istražili uzrokuje li neonatalno izlaganje štakora hipoksiji promjenu u razini ekspresije gena za VIP u hipokampusu adolescentnih štakora, kod kojih je ranije opažena promjena u prostornom učenju. Diferencijalnu ekspresiju gena za VIP istražila sam kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom, korištenjem RNA prethodno izolirane iz hipokampusa 16 tretiranih i 15 kontrolnih štakora oba spola. Dvosmjerna analiza varijanci pokazala je značajan utjecaj tretmana na ekspresiju gena za VIP, uz 2,5 puta veću ekspresiju u hipoksičnoj skupini. Zaključujemo da je akutno neonatalno izlaganje hipoksiji moglo dovesti do dugotrajnog kompenzatornog povećanja ekspresije gena za VIP, koje se pak može povezati s promjenama u prostornom učenju posredovanom nagradom.

(33 stranice, 8 slika, 7 tablica, 68 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: neinvazivni model, VIP, kvantitativni PCR, mRNA

Voditelj: prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Dubravka Hranilović, izv. prof. dr. sc. Silvija Černi, izv. prof. dr. sc. Duje Lisičić

Rad prihvaćen: 31.03.2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

The effect of acute neonatal hypoxia on the expression of vasoactive intestinal polypeptide gene in adolescent rat hippocampus

Valentina Runko

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a regulatory molecule in the mammalian brain, acting as a neurotransmitter, hormone, and growth factor. Within the hippocampus, VIP participates in controlling synaptic plasticity phenomena, such as long-term potentiation and long-term depression. Neuron circuits which express VIP are thought to moderate reward-associated learning. Depending on duration and severity, prenatal and neonatal hypoxia is a risk factor for various disorders, including cerebral palsy, attention-deficit hyperactive disorder, autism spectrum disorders, and difficulties in spatial learning and working memory. In this paper, we used a model of neonatal hypoxia in normobaric conditions, in order to explore whether neonatal exposure to hypoxia changes VIP expression in the hippocampus of adolescent rats, which were earlier shown to have altered spatial learning. In order to explore the differential expression of *VIP* gene, I used qPCR method on RNA isolated from the hippocampus of adolescent rats of both sexes, 16 of which were subjected to hypoxia treatment, and 15 of which were controls. Two-way ANOVA showed a significant influence of treatment on *VIP* gene expression, which was 2.5 times higher in the hypoxia treated group. We conclude that acute neonatal exposure to hypoxia may lead to a long-term compensatory increase in *VIP* gene expression, which can be correlated to changes in reward-motivated spatial learning.

(33 pages, 8 figures, 7 tables, 68 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: non-invasive model, VIP, quantitative PCR, mRNA

Supervisor: prof. Dubravka Hranilović, PhD

Reviewers: Prof. Dubravka Hranilović, PhD, Assoc. Prof. Silvija Černi, PhD, Assoc. Prof. Duje Lisičić, PhD

Thesis accepted: March 31st, 2022

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Hipoksija u ljudi	1
1.2. Animalni modeli hipoksije.....	2
1.2.1. Teška hipoksija i invazivni modeli.....	2
1.2.2. Blaga hipoksija i neinvazivni modeli	3
1.2.3. Stanične posljedice hipoksije.....	4
1.3. Hipokampus	4
1.4. Vazoaktivni intestinalni peptid	6
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	10
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1. Materijali.....	11
3.1.1. Uzorci RNA iz hipokampusa	11
3.1.2. Tehnička pomagala i pribor	11
3.1.3. Otopine, kemikalije i kompleti	12
3.2. Metode	13
3.2.1. Pretraživanje literature.....	13
3.2.2. Reverzna transkripcija i provjera uspješnosti.....	13
3.2.3. Kvantitativni PCR (qPCR).....	15
3.2.4. Obrada podataka i statistička analiza	15
4. REZULTATI	17
4.1. Diferencijalno eksprimirani geni	17
4.2. Diferencijalna eksprimiranost gena <i>VIP</i>	20
4.2.1. Potvrda uspješnosti reverzne transkripcije	20
4.2.2. Potvrda učinkovitosti qPCR reakcija za pojedine početnice i optimizacija količine uzorka za qPCR reakciju.....	20
4.3. Potvrda diferencijalne ekspresije gena <i>VIP</i>	22
5. RASPRAVA.....	25
6. ZAKLJUČAK.....	28
7. LITERATURA	29
ŽIVOTOPIS.....	35

POPIS KRATICA

ACTB – β -aktin

ADHD – poremećaj pažnje s hiperaktivnošću (eng. *attention-deficit hyperactivity disorder*)

ASD – poremećaji autističnog spektra (eng. *autism spectrum disorders*)

AU – arbitrarne jedinice (eng. *arbitrary units*)

BDNF – moždani neurotrofni čimbenik (eng. *brain-derived neurotrophic factor*)

GABA – gama-aminomaslačna kiselina

HPRT1 – hipoksantin fosforiboziltransferaza 1

IN – interneuroni

LTD – dugotrajna depresija (eng. *long-term depression*)

LTP – dugotrajna potencijacija (eng. *long-term potentiation*)

PND – postnatalni dan

qPCR – kvantitativna lančana reakcija polimerazom (eng. *quantitative polymerase chain reaction*)

RVM – Rice-Vanucci model

VIP – vazoaktivni intestinalni peptid (eng. *vasoactive intestinal peptid*)

1. UVOD

1.1. Hipoksija u ljudi

Hipoksija se definira kao snižena količina kisika u stanicama, koja otežava normalan aerobni metabolizam. Uzroci mogu uključivati hipoksemiju tj. sniženu razinu kisika u krvi, otežan transport kisika do stanica te poremećaje unosa i iskorištenja kisika u stanicama (MacIntyre, 2014). Tijekom intrauterinog razvoja, najčešći je uzrok hipoksije insuficijencija posteljice, a među moguće posljedice ubraja se intrakranijalno krvarenje te niz neuroloških oštećenja (Pleša, 2017). U ostale uzročnike hipoksije spadaju produljeni porod, rođenje prije termina te kardio-respiratorna disfunkcija (Golan i Huleihel, 2006). Pokazano je da fetalna hipoksija, njene komplikacije, kao i hipoksija u neonatalnom periodu, spadaju u faktore rizika potencijalno uključene u patogenezu shizofrenije, poremećaja pažnje s hiperaktivnošću (eng. *attention-deficit hyperactivity disorder*, ADHD) te poremećaja autističnog spektra (eng. *autism spectrum disorders*, ASD) (Giannopoulou i sur., 2018). Zbog naročite osjetljivosti fetalnog i neonatalnog mozga, hipoksični uvjeti mogu povisiti vjerojatnost neuroloških deficita poput epilepsije, narušenih motoričkih funkcija te kognitivnih i bihevioralnih abnormalnosti (Louzoun-Kaplan i sur., 2008).

Opsežna studija iz 2020. godine, koja je analizirala pokazatelje neurološkog razvoja dvogodišnje djece s poviješću hipoksično-ishemijske encefalopatije, utvrdila je da je skupina s blagom hipoksijom imala lošije ukupne kognitivne rezultate od zdravih kontrola, što ukazuje na određeno zaostajanje u razvoju. (Finder i sur., 2020). Blaže se posljedice mogu manifestirati kao poteškoće u učenju i pamćenju te prostornoj orijentaciji, što se primjećuje tijekom djetinjstva (Golan i Huleihel, 2006). Otellin i suradnici (2013) pokazali su da akutna hipoksija u perinatalnom razdoblju dovodi do strukturnih promjena u motoričkim i vizualnim područjima neokorteksa, konkretno do poremećene strukturne organizacije slojeva neurona. Također je primjećeno da je struktura hipokampusa dugoročno promijenjena. Posljedice su se očitovale u narušenim bihevioralnim reakcijama, povišenoj anksioznosti te poteškoćama u prostornom učenju i radnoj memoriji.

1.2. Animalni modeli hipoksije

Fiziološke, anatomske i bihevioralne posljedice hipoksije te mogućnosti njihove prevencije i liječenja istražuju se na animalnim modelima. Pri tome razlikujemo invazivne modele, dobivene podvezivanjem arterije (ponekad u kombinaciji s izlaganjem smanjenoj koncentraciji kisika), koji su pogodni za istraživanje posljedica teške hipoksije i neinvazivne modele, dobivene samo perinatalnim izlaganjem životinja smanjenoj koncentraciji kisika u hipoksičnoj komori, koji su pogodni za istraživanje posljedica blage hipoksije (Millar i sur. 2017).

1.2.1. Teška hipoksija i invazivni modeli

Zbog visoke filogenetske srodnosti s ljudima, najpouzdanijim podacima smatraju se oni dobiveni u pokusima s primatima. Pritom se neuropatološke promijene uzrokovane asfiksijom neonatalnih životinja primjećuju pretežno u moždanom deblu. Kod teške parcijalne ishemije *in utero* uočava se nekroza kortikalnog tkiva, konvulzije *post partum* te povišen mortalitet. Znakovito je da su se najviše oštećena područja mozga razlikovala ovisno o tome je li hipoksija/anoksija bila kombinirana s acidozom (Yager, 2004).

Ovca se može koristiti kao učinkovit model velike životinje za studije perinatalne hipoksije. Okluzijom pupčane vrpce postiže se selektivna nekroza neurona u hipokampusu. Učestali kraći intervali hipoksijske ishemije rezultirali su infarktom parasagitalnog korteksa, talamusa, te cerebeluma u značajnom broju životinja. Također, akutna asfiksija udvostručuje proizvodnju slobodnih radikala tijekom rane faze reperfuzije (Yager, 2004).

U zamorca, unilateralna intrauterina ligacija arterije sredinom gestacijskog perioda uzrokuje značajno povećanje cerebralnih ventrikula, te smanjen volumen korteksa, strijatuma, i hipokampusa (pri čemu je potonje posljedica redukcije broja neurona u hipokampusu i cerebelumu). Također je smanjen rast dendritičkih trnova u hipokampusu, zbog kronične placentalne insuficijencije, što se dovodi u korelaciju s razvojem shizofrenije kasnije u životu (Yager, 2004).

Daleko naučestaliji eksperimentalni model jest štakor. Metoda koju su osmislili Rice i suradnici 1980-ih (Rice, Vanucci, Brierley, 1981) uključuje ligaciju karotide mladunaca sedam dana nakon okota. Patološke posljedice inzulta uočljive su posebno u strukturama sive tvari, kao kolumnarne regije selektivne nekroze neurona. Štakor starosti sedam dana po neurološkom razvoju odgovara ljudskom novorođenčetu starom 32 do 34 tjedna. Za tu je izvedbu modela karakteristična kombinacija hipoksije i hipokapnije (smanjenog udjela CO₂ u krvi uslijed hiperventilacije), čime se kompenzira metabolička acidoza. U strijatumu dolazi do povišenog otpuštanja ekscitatornih aminokiselina, a kroz nekoliko dana

dolazi do cerebralnog edema. Neokortikalna su oštećenja često distribuirana kolumnarno (Yager, 2004). Rice-Vanucci model (RVM), uz unilateralnu ligaciju karotide uključuje i blago hipoksičnu komoru (Rice, Vanucci, Brierley, 1981). Sama ligacija ne oštećuje tkivo – tek kombinacija ishemije i hipoksije dovodi do funkcionalnih i strukturalnih deficita ipsilateralne hemisfere. Bihevioralni se fenotipovi očituju kao abnormalnosti senzoričkog procesiranja, motorički deficiti, narušeno prostorno učenje i pamćenje te manjak pozornosti (Hefter i sur., 2018). RVM je doživio mnoge varijacije, uključujući prolaznu unilateralnu hipoksiju-ishemiju, pri kojoj su Renolleau i suradnici (1998) utvrdili jači upalni odgovor po reperfuziji, te posljedično veća oštećenja. Schwarzova modifikacija RVM uključuje prolaznu bilateralnu ligaciju karotide, u trajanju od 5 do 10 minuta. Stanice s najvećom osjetljivošću na ishemičnu ozljedu, odnosno slobodne radikale nastale reperfuzijom su O4 progenitori oligodendrocita (Yager, 2004). Izvedba RVM-a prilagođena za štakore 1-2 dana nakon okota pokazala je manju osjetljivost životinja na hipoksiju u toj dobi, zbog čega je nužno modificirati uvjete da bi se postigla ozljeda ekvivalentna onoj u mladunaca starih sedam dana (Northington, 2006).

RVM je prilagođen i za provedbu na miševima, no istraživanja otežava različita osjetljivost sojeva na hipoksiju-ishemiju, pri čemu postoje značajne razlike u mortalitetu i stupnju histopatološke ozljede (Northington, 2006).

Velik broj klasičnih modela fokusira se na teške posljedice hipoksično-ishemijskog infarkta, u životinja čija razvojna dob odgovara uobičajenom postnatalnom periodu ljudi; stoga su Stadlin i suradnici (2003) razvili model blaže hipoksično-ishemijske ozljede, na štakorima starim tri dana, za simulaciju nedonoščadi izloženoj perinatalnoj asfiksiji. Umjesto tradicionalnog kirurškog postupka, korišten je operacijski mikroskop, te je čitav postupak anestezije i bipolarne koagulacije lijeve karotide trajao tek 10 minuta. Sukladno podacima koje su dobili iz prethodne pilot-studije, prilagodili su uvjete vlage i temperature, te postotka kisika, kako bi boravak u hipoksičnoj komori uzrokovao blaži infarkt s manjom stopom mortaliteta; naime utvrđeno je da temperatura i vlaga mogu izazvati značajne fluktuacije u stupnju ozljede i preživljenju životinja. Posljedice su bile vidljive u čitavom cerebralnom korteksu, talamusu, te bazalnim ganglijima. Utvrđena je prisutnost kako apoptotičnih, tako i nekrotičnih stanica, a najosjetljivije su regije bili primarni motorički i senzorički korteks, s naglaskom na somatosenzorički, vizualni, temporalni te inzularni korteks.

1.2.2. Blaga hipoksija i neinvazivni modeli

Kako bi se izazvale blaže ozljede i spriječila nefiziološka okluzija karotidne arterije, neki eksperimenti koriste isključivo hipoksičnu komoru, bez prethodnog ishemičnog postupka. Ta se metoda prvenstveno koristila za istraživanje biokemije mozga tijekom hipoksije te su primijećene promjene u razinama

neurotransmitera noradrenalina, dopamina, serotonina, GABA i glutamata, kao i promjene u ekspresiji njihovih receptora i transportera u pojedinim regijama mozga.

Međutim, ne postoji konsenzus oko smjera i magnitude tih promjena. Suptilne ozljede mozga izazvane hipoksijom mogu izazvati napadaje, kao i bihevioralne promjene poput hiperaktivnosti. Relativno je malo istraživanja provelo standardne testove prostornog pamćenja i lokomotornog ponašanja, a dobiveni rezultati ponekad su međusobno proturječni. Fenotipovi povezani s tretmanom isključivo hipoksijom često su temeljeni na specifično dizajniranim bihevioralnim testovima, zbog čega ih je teško uspoređivati s etabliranim životinjskim modelima. Znatan problem je nedostatak metodološkog jedinstva među različitim eksperimentima. Dob i soj pokusnih životinja, parcijalni tlak kisika, temperatura, te vrijeme izlaganja hipoksiji nisu univerzalno standardizirane, što je relevantno jer se pojedini bihevioralni deficiti pojavljuju nakon anoksičnog tretmana pri višoj temperaturi, ali ne i pri nižoj (Millar i sur., 2017).

1.2.3. Stanične posljedice hipoksije

Neuroplastičnost predstavlja nužan preduvjet za učenje i pamćenje, a mehanizam dugoročne neuroplastičnosti je promjena ekspresije gena. Uslijed stimulacije, aktiviraju se putevi sekundarnih glasnika, što povećava aktivnost transkripcijskih faktora na promotorima gena. Rezultat je ekspresija novih ionskih kanala, faktora rasta, strukturnih molekula, te drugih proteina potrebnih za modifikaciju neuronskih krugova (McClung i Nestler, 2007). Nakon blage hipoksije, utvrđeno je povećanje ekspresije glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (GFAP), što je vjerojatno posljedica povećane aktivnosti stanica astroglije uslijed ozljede neurona. Poznato je da astrociti posreduju upalni odgovor, ekscitotoksičnost te oksidativni stres, pa stoga promjena astrocitne aktivnosti potencijalno pridonosi staničnoj smrti neurona. Daljnji sudionici kaskade degeneracije neurona uključuju povećanje ekspresije Fas receptora stanične smrti, citokroma c i gena Bax, kao i aktivaciju kaspaze 8 i perinuklearnu akumulaciju mitohondrija. Posljedice na sensorimotoričke funkcije uključuju ataksiju, ukočenost, te distoniju (Stadlin i sur., 2003).

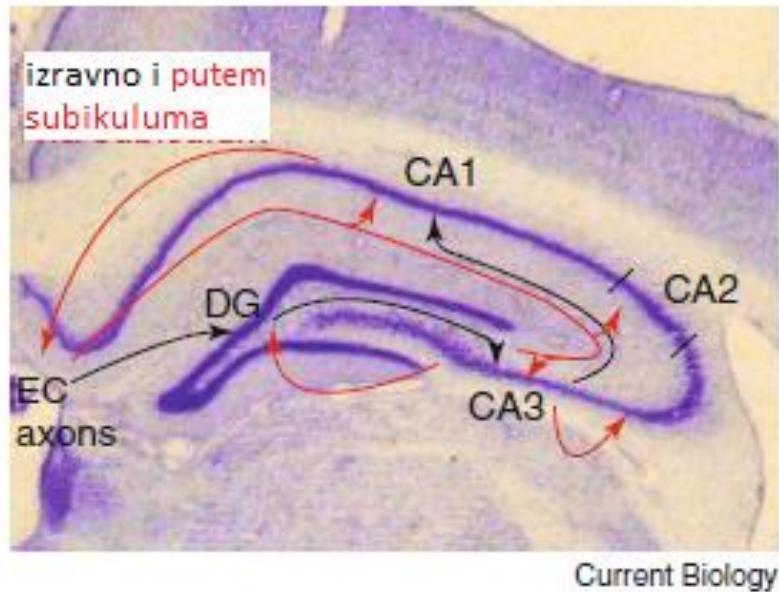
1.3. Hipokampus

Hipokampus je jedna od najbolje proučenih regija mozga, te se od 1950-ih istražuje njegova uloga u neurobiološkoj podlozi pamćenja, konkretno kao mjesto integracije senzoričkih, emotivnih, i kognitivnih komponenti iskustva. Osim u formaciji sjećanja, hipokampus je bitan i za prisjećanje,

naročito epizodičkog pamćenja. U ljudi se nalazi duboko u medijalnom temporalnom režnju, a kod glodavaca tik ispod neokorteksa (Knierim, 2015).

Hipokampalna regija sastoji se od hipokampalne formacije i parahipokampalne regije; one se razlikuju u broju prisutnih kortikalnih slojeva, te u načinu sinaptičke povezanosti. Hipokampalnu formaciju čine: dentatni girus, subikulum, i hipokampus (lat. *hippocampus proper*) koji se dijeli u polja CA1, CA2, i CA3. Sve tri regije karakterizirane su s tri sloja pretežno unilateralnih neurona. U dentatnom girusu, glavni tip neurona su granularne stanice, a njihov broj ovisi o dobi te o soju životinje. Te stanice nastavljaju sporo proliferirati i u odrasloj dobi, te se funkcionalno integriraju u hipokampalnu mrežu. Uz površinu granularnog sloja stanica nalaze se tzv. stanice-košarice (eng. *basket cells*) s piramidalnim staničnim tijelima. Naziv „košarica“ dolazi od toga što aksoni ovih stanica oblikuju pericelularne pleksuse koji okružuju some granularnih stanica. Radi se o pretežno GABAergicnim stanicama. U molekularnom sloju dentatnog girusa nalaze se uglavnom dendriti, ali i neke vrste neurona. Jedan od tih tipova neurona su stanice s multipolarnom ili triangularnom somom, čiji akson sudjeluje u pleksusu stanica-košarica. Ta se vrsta neurona boja pozitivno za ekspresiju vazoaktivnog intestinalnog peptida (VIP), a dendriti joj ne napuštaju molekularni sloj. Smatra se da je riječ o još jednoj vrsti stanice-košarice, lokaliziranoj iznad, umjesto ispod, granularnog sloja. Velik dio informacija koje dentatni girus prima dolazi iz subkortikalnih struktura, između ostalog iz monoaminergičnih jezgri moždanog debla. Dentatni girus ima projekcije u polje CA3 hipokampusa, u obliku tzv. mahovinastih vlakana (eng. *mossy fibers*) koja stvaraju sinapse s piramidalnim stanicama. Hipokampus se dijeli na tri sloja: *stratum lucidum*, *stratum radiatum*, i *stratum lacunosum-moleculare*. Glavna vrsta stanica u hipokampusu su piramidalne stanice, no sadrži i heterogenu populaciju stanica-košarica čije su some lokalizirane u piramidalnom sloju. Aksoni stanica-košarica pružaju se transverzalno od some te oblikuju pleksus koji inervira some piramidalnih stanica. (Witter i Amaral, 2004).

Na uzdužnom presjeku hipokampusa vidi se tzv. trisinaptička petlja: prikaz hipokampalne anatomske povezanosti (Slika 1), pri kojoj su ključna polja CA1, CA2, i CA3 te njihove veze sa entorinalnim korteksom i dentatnim girusom. Hipokampus je osjetljiv na ozljede izazvane hipoksijom, ishemijom, encefalitisom te epilepsijom. Dosadašnje studije na životinjama povezale su lezije hipokampusa s deficitom u prostornom učenju te je važeća teorija da hipokampus pohranjuje kognitivnu mapu okoliša i pomaže smjestiti doživljaje u prostorno-vremenski kontekst (Knierim, 2015).



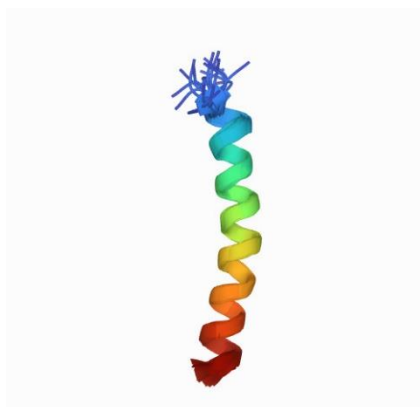
Slika 1. Koronalni presjek kroz transverznu os hipokampusa: crne linije predstavljaju trisinaptičku os, dok crvene označavaju druge bitne puteve u hipokampusu, uključujući izravne projekcije iz entorinalnog korteksa (EC) u sva tri CA polja, povratnu petlju iz subikuluma u EC, te projekcije iz CA3 u dentatni girus (DG).

(Prilagođeno iz Knierim, 2015)

Oštećenja hipokampusa narušavaju nedavna sjećanja, ali ostavljaju dugoročna sjećanja netaknutima. Sinaptičke promjene u hipokampusu predstavljaju primarni način pohrane sjećanja, nakon čega se potiče postupna modifikacija sinapsi u neokorteksu te akumulirane promjene predstavljaju dugoročno pamćenje. Hipokampus na taj način omogućuje retenciju novih informacija, kao i njihovo ispreplitanje s već poznatima (McClelland, McNaughton, O'Reilly, 1995).

1.4. Vazoaktivni intestinalni peptid

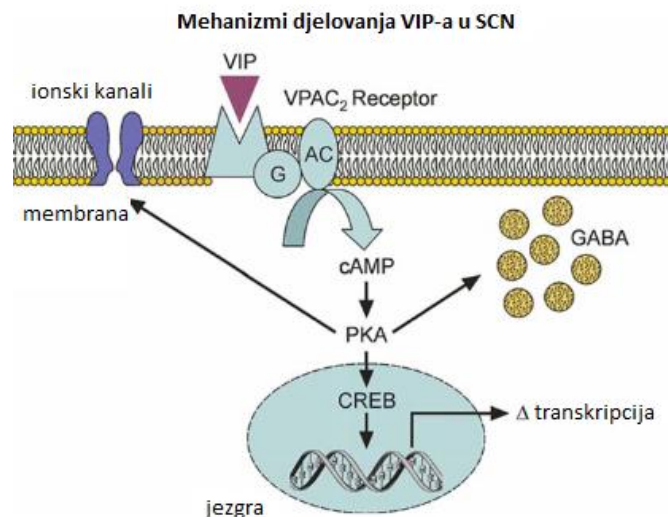
Vazoaktivni intestinalni peptid (VIP) sastoji se od 28 aminokiselina te u mozgu sisavaca služi kao bitna regulatorna molekula. Jedan peptidni lanac čini zavojnicu, kako je vidljivo iz prikaza strukture peptida na Slici 2. Po sličnostima u sekvenci, VIP spada u glukagonsku porodicu peptida. U ljudi je kodiran genom na kromosomu 6, a u štakora na kromosomu 1 (izvor: <https://rgd.mcw.edu>). Gen sadrži 7 eksona, a regulacija aktivnosti gena je posttranskripcijska (Yamagami i sur., 1988).



Slika 2. Prikaz strukture ljudskog vazoativnog intestinalnog peptida, preuzeto sa <https://www.rcsb.org/structure/2RRH>

VIP je izvorno otkriven u duodenumu, te je stoga nazvan intestinalnim, a kasnije je pronađen u središnjem i perifernom živčanom sustavu, kao i u endokrinim stanicama, te je ustanovljeno da ima neurotransmitterske i hormonalne uloge (Gozes i Brenneman, 1989). U gastrointestinalnom traktu, VIP djeluje na glatko mišićno tkivo, smanjujući učestalost i snagu kontrakcija. Inhibitorno djelovanje VIP-a na glatku muskulaturu posredovano je hiperpolarizacijom membrane, čime se onemogućuje ili otežava depolarizacija, rezultirajući manjim brojem akcijskih potencijala (Bolton, Lang, i Ottesen, 1981).

VIP ostvaruje svoju funkciju preko sustava posredovanih receptorima, aktivirajući puteve prijenosa signala, uključujući ciklički adenzin monofosfat tj. cAMP (Gozes i Brenneman, 1989). Može se vezati na VPAC1 te VPAC2 receptore. U brojnim sustavima, vezanje VIP-a aktivira adenilil-ciklazu, dovodeći do porasta razina cAMP-a i aktivnosti protein kinaze A (PKA). PKA potom aktivira druge unutarstanične signalne puteve poput fosforilacije CREB proteina i ostalih transkripcijskih faktora. Opisani mehanizam, prikazan na Slici 3, ima ulogu u regulaciji cirkadijanih ritmova u suprahijazmatskoj jezgri (SCN). Kaskada aktivirana VIP-om u SCN: 1) modulira intrinzične kanale regulirane naponom, 2) presinaptički regulira otpuštanje GABA-e, te 3) modificira transkripciju putem CREB-a. (Vosko i sur., 2007)



Slika 3. Pretpostavljeni mehanizam djelovanja *VIP*-a u neuronima suprahijazmatske jezgre (SCN). Vežanjem *VIP*-a na *VPAC2* receptor aktivira se signalni put adenilat ciklaze (AC) i protein kinaze A (PKA). Kaskada aktivirana *VIP*-om u SCN: 1) modulira intrinzične kanale regulirane naponom, 2) presinaptički regulira otpuštanje GABA-e, te 3) modificira transkripciju putem CREB-a. Prilagođeno iz Vosko i sur., 2007.

Kao faktor rasta i razvoja, *VIP* pozitivno utječe na stupanj preživljenja neurona; ima bitnu ulogu u procesu neurogeneze, tijekom koje stimulira proliferaciju i diferencijaciju neurona u mozgu (Moody, Hill, i Jensen, 2003).

Unutar hipokampusa, *VIP* ima ključnu ulogu u kontroli GABAergične transmisije i aktivnosti piramidalnih stanica kao odgovor na specifičnu mrežnu aktivnost, bilo od strane stanica-košarica koje sadrže *VIP* ili interneuron-selektivnih interneurona. Čini se da navedeno ima diferencijalni učinak na kogniciju ovisnu o hipokampusu. Na staničnoj razini, mehanizam kojim *VIP* regulira sinaptičku transmisiju uključuje ili poticanje disihibicije, aktivacijom *VPAC1* receptora, ili pojačavanje ekscitabilnosti piramidalnih stanica, aktivacijom *VPAC2* receptora. Na taj se način kontroliraju bitni fenomeni sinaptičke plastičnosti, poput dugotrajne potencijacije (eng. *long-term potentiation*, LTP), te dugotrajne depresije (eng. *long-term depression*, LTD). Stoga je *VIP* bitan faktor u funkcijama prostornog učenja i pamćenja koje se odvijaju u hipokampusu (Cunha-Reis i Caulino-Rocha, 2020).

Specijalizirani GABAergični interneuroni (IN) iz neokorteksa selektivno utječu na druge IN, pridonoseći prostornoj navigaciji i učenju u hipokampusu. Da bi istražili doprinos tih mrežnih operacija, Turi i suradnici (2019) proveli su studiju na miševima koji su ili nasumično tražili hranu, ili izvodili zadatke usmjerene određenom cilju. Koristeći kroničnu dvofotonsku vizualizaciju kalcijem, proučavali su funkcionalne subpopulacije disinhibitornih IN u CA1 polju hipokampusa. Utvrđeno je da su te subpopulacije, koje su eksprimirale *VIP* (*VIP+*), modulirale ponašanja i odgovor na zadatak. Nadalje, pokazano je da je *VIP+* disinhibicija nužna za učenje usmjereno k cilju te s time povezanu reorganizaciju

dinamike populacije piramidalnih stanica u hipokampusu. Dakle, proučavanjem IN koji eksprimiraju VIP u CA1 polju hipokampusa *in vivo*, detektirana je promjena u dinamici VIP+ populacije, što je bilo povezano s učenjem. Disinhibicija povezana s ponašanjem koju CA1 piramidalnim stanicama omogućuju VIP+ IN služi poticanju prostornog učenja povezanog s nagradom.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Suradnjom između Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu i Hrvatskog instituta za istraživanje mozga razvijen je model blage neonatalne normobarične hipoksije. U prethodnom istraživanju utvrđena je razlika u prostornom učenju tretiranih štakora u odnosu na kontrolne, te je izolirana RNA iz hipokampusa i poslana na usporedno sekvenciranje kako bi se utvrdila diferencijalna ekspresija između kontrolne i hipoksične skupine.

Cilj ovog diplomskog rada bio je pretraživanjem literature analizirati i opisati funkciju desetak gena čija se ekspresija u hipokampusu značajno razlikovala kod eksperimentalne skupine u odnosu na kontrolnu te identificirati gen relevantan za prostorno učenje i provjeriti njegovu diferencijalnu ekspresiju metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom (qPCR).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci RNA iz hipokampusa

RNA na kojoj je vršeno istraživanje dobivena je iz tkiva hipokampusa štakora soja Wistar Han (RccHan:WIST), od čega je bilo 8 ženki i 8 mužjaka eksperimentalne skupine, te 8 ženki i 7 mužjaka kontrolne skupine. Parenje, okot te hipoksični tretman provela je na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Sara Trnski, dr.vet.med., u sklopu svoje doktorske disertacije.

Prvog postnatalnog dana (PND1) eksperimentalna je skupina dva sata držana u normobaričnoj komori temperature 27 °C, unutar koje je postignuto stanje hipoksije (8% O₂, 92% N₂), dok je kontrolna skupina boravila u normobaričnim normoksičnim uvjetima (21% O₂, 78% N₂) u kavezu, također pri temperaturi 27 °C. Nakon odvajanja od majke, u starosti od 28 dana (PND28), mladunci su dopremljeni u nastambu za životinje Zavoda za animalnu fiziologiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Unutar nastambe održavana je stalna temperatura (22 ± 2 °C), vlažnost zraka (oko 60%), režim osvjetljenja 12 sati svjetlost : 12 sati tama, te *ad libitum* pristup hrani i vodi.

Štakori su podvrgnuti nizu bihevioralnih testova u adolescentnoj dobi (PND33-45) te su žrtvovani 50. dana (PND50).

Odabrani visokokvalitetni uzorci RNA iz hipokampusa žrtvovanih životinja poslani su u Novogene (UK) Co., Ltd na sekvenciranje u svrhu analize diferencijalne ekspresije gena. Pritom je provedena kontrola kvalitete RNA, priprema biblioteke mRNA sa polyA obogaćivanjem, sekvenciranje na NovaSeq 6000 PE150 sa 6 G sirovih podataka po uzorku, poravnavanje te standardna bioinformatička analiza diferencijalne ekspresije.

3.1.2. Tehnička pomagala i pribor

- centrifuga, 5415 C (Eppendorf, Austrija)
- uređaj za lančanu reakciju polimerazom (GeneAmp PCR System 2700, Thermo Fisher Scientific)

- miješalica, IKA KS 130 basic (IKA, Njemačka)
- mikropipete, (Eppendorf, Austrija)
- minicentrifuga, Quickspin (Clever Scientific, Velika Britanija)
- vibracijska miješalica, Vortex genius 3 (IKA, Njemačka)
- zamrzivači (-80 °C, -20 °C)
- uređaj za kvantitativnu lančanu reakciju polimerazom (qPCR) Analytik Jena qTOWER³ 84

3.1.3. Otopine, kemikalije i kompleti

Korištene za RT-PCR:

High-Capacity RNA-to-cDNA™ komplet kemikalija (Applied Biosystems, Foster City, SAD)
 AmpliTaq polimeraza (5 U/μL) (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Litva)
 početnice za pozitivnu kontrolu (RNAqueous-4PCR, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Litva)
 magnezijev klorid, 25 mM (Applied Biosystems, Foster City, SAD)
 nukleotidi, 10 mM (Applied Biosystems, Foster City, SAD)
 PCR pufer II (10x) (Applied Biosystems, Foster City, SAD)
 voda bez nukleaza (Applied Biosystems, Foster City, SAD)

Korištene za elektorforezu na agaroznom gelu:

BlueJuice™ pufer za nanošenje na gel (10x) (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Litva)
 SYBR™ Safe boja za gel (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Litva)
 agarozna (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka)
 0,5x TBE pufer:
 45 mM TRIS baza (C₄H₁₁NO₃), M_r = 121,14 (Applichem GmbH, Njemačka)
 45 mM borna kiselina (H₃BO₃), M_r = 61,83 (Gram-Mol, Hrvatska)
 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka)
 dH₂O

Korištene za qPCR:

TaqMan gene expression matična otopina (eng. *master mix*) (Applied Biosystems, Foster City, SAD)

qPCR početnice i sonde - Taqman assay (Applied Biosystems, SAD) za:

- β-Aktin (ACTB, Rn00667869_m1, VIC primer-limited),
- hipoksantin fosforiboziltransferaza 1 (HPRT1, Hs99999909_m1, VIC primer-limited),
- VIP (Rn01430567_m1, FAM primer-limited)

3.2. Metode

3.2.1. Pretraživanje literature

O genima kojima je RNA-sekvenciranjem utvrđena diferencijalna ekspresija, provela sam literaturno istraživanje. Koristila sam internetske baze podataka UniProt i Rat Genome Database (RGD), kao i znanstvene članke sa platformi PubMed i Mendeley. Pojedine gene pretraživala sam putem RGD pristupnog broja (eng. *accession number*) ili službene kratice gena (npr. *Fndc4*) u odgovarajućim bazama. Za detaljnije informacije pretraživala sam znanstvene radove, kombinirajući nazive gena s ključnim riječima „hipoksija“, „prostorno učenje“, „ponašanje“, itd.

3.2.2. Reverzna transkripcija i provjera uspješnosti

Komplementarnu DNA (cDNA) dobila sam reverznom transkripcijom (RT-PCR) uzoraka RNA pomoću komercijalno dostupnog kompleta (High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit), po uputi proizvođača, koristeći uređaj GeneAmp PCR System 2700, uz sastav reakcijske smjese prikazan u Tablici 1 i uvjete reakcije prikazane u Tablici 2.

Tablica 1. Sastav reakcijske smjese za reverznu transkripciju u ukupnom volumenu od 20 μ L

Reagensi za reverznu transkripciju (RT)	Volumen (μ L)
2x RT Buffer Mix	10
20x RT Enzyme Mix	1
uzorak RNA (1 μ g) + voda bez nukleaza	9

Tablica 2. Uvjeti reverzne transkripcije

Inkubacija	Vežanje početnica	Reverzna transkripcija	Inaktivacija enzima
65°C	25°C	37°C	95°C
5 min	10 min	60 min	5 min

Reverznom transkripcijom dobila sam po 20 μL cDNA od svakog uzorka, koncentracije 50 ng/ μL , tj. ukupno 1000 ng cDNA po uzorku. Od svakog uzorka cDNA koristila sam 1,5 μL za probni (eng. *end-point*) PCR, u ukupnom reakcijskom volumenu od 15 μL , uređajem GeneAmp PCR System 2700 s programiranim uvjetima prema Tablici 3. Točan sastav reakcijske smjese naveden je u Tablici 4. Korištene su univerzalne početnice za pozitivnu kontrolu iz kompleta za izolaciju RNA.

Tablica 3. Uvjeti PCR reakcije za provjeru uspješnosti (eng. *end-point PCR*)

Predenaturacija	PCR (35 ciklusa)			Konačno produljivanje lanca
	Denaturacija	Vežanje početnica	Produljivanje lanca	
95°C	94°C	55°C	72°C	72°C
1 min	30 sek	30 sek	30 sek	5 min

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese za *end-point* PCR reakciju

Reagensi za PCR	Volumen (μL)
H ₂ O (bez nukleaza)	9,04
MgCl ₂ (25 mM)	0,9
10x PCR pufer II	1,5
dNTP mješavina (10 mM)	1,2
početnice za pozitivnu kontrolu	0,75
AmpliTaq polimeraza (5 U/ μL)	0,11
cDNA (50 ng/ μL)	1,5

Potom sam provela elektroforezu na 1% agaroznom gelu, kako bi se vizualizirao nastali produkt i tako potvrdila uspješnost reverzne transkripcije. Nanosila sam po 5 μL cDNA i 5 μL pufera za nanošenje u svaku jažicu. Elektroforezu sam provela pri naponu od 80 V, u trajanju od 70 minuta. Produkt sam vizualizirala transiluminatorom, pomoću SYBRTM Safe boje za gel, koja je dodana tijekom pripreme gela. Nakon potvrđene RT, uzorke cDNA pohranila sam pri -20°C do sljedećeg dijela eksperimenta.

3.2.3. Kvantitativni PCR (qPCR)

Relativnu ekspresiju gena *VIP* odredila sam metodom qPCR koristeći TaqMan matičnu otopinu za provjeru genske ekspresije, prema uputama proizvođača, na uređaju Analytik Jena qTOWER³84. Sve sam reakcije izvela s pojedinačnim parom početnica (eng. *singleplex*). Kao referentne gene tj. endogene kontrole upotrijebila sam β -aktin (ACTB), i hipoksantin fosforiboziltransferazu 1 (HPRT1). Reakciju sam provela u triplikatu za svaki uzorak, uz negativnu kontrolu (eng. *no-template control*) i uzorak za kalibraciju na svakoj pločici. Ukupni konačni volumen od 20 μ L po jažici sadržavao je 10 μ L matične otopine (eng. *master mix*), 1 μ L početnica i sonde za referentni gen ili gen od interesa (*VIP*), 7 μ L vode bez nukleaza i 2 μ L cDNA (približno 30 ng po reakciji). Uvjeti reakcije prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Uvjeti qPCR reakcije

Inkubacija	Aktivacija polimeraze	PCR (39 ciklusa)	
50°C	95°C	Denaturacija 95°C	Vežanje početnica / produljivanje lanca 60°C
2 min	10 min	15 sek	1 min

3.2.4. Obrada podataka i statistička analiza

Rezultati amplifikacije analizirani su pomoću programa qPCRsoft 4.0. Razine cDNA gena od interesa (*VIP*) normalizirane su prema endogenoj kontroli (srednja vrijednost dvaju referentnih gena, sREF), koja služi za kontrolu početne količine tkiva i kalibratoru (uzorak nanesen na sve pločice, koji služi kontroli uvjeta reakcije, CAL):

$$\Delta Ct = Ct_{VIP} - Ct_{sREF}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct_{CAL}$$

Normalizirana relativna ekspresija svakog gena izračunata je pomoću formule $2^{-\Delta\Delta Ct} \times 100$ i izražena u arbitrarnim jedinicama (AU).

Analiza rezultata i statistička obrada provedena je u programima GraphPad InStat 3.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, SAD) i JMP 11.2 (SAS Institute Inc., Cary, SAD). Normalnost raspodjele testirana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Dvostrukom analizom varijanci (eng. *two-way ANOVA*), provjeren je utjecaj tretmana i spola na ekspresiju gena. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (eng. *mean*, M) \pm standardna pogreška (eng. *standard error of mean*, SEM), uz prag statističke značajnosti od $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Diferencijalno eksprimirani geni

Iz podataka dobivenih sekvenciranjem RNA uočena je statistički značajna diferencijalna ekspresija 17 gena u hipokampusu štakora. U skupini podvrgnutoj tretmanu povećanu ekspresiju imali su geni *VIP* (vazoaktivni intestinalni peptid), *Fndc4* (nekarakterizirani protein), *Slc19a3* (tiaminski transporter 3), *Gpd1* (glicerol-3-fosfat dehidrogenaza 1), *Eno2* (neuralna gama-enolaza 2), te *Vgf* (inducibilni VGF faktor rasta neurona). Smanjenu ekspresiju su imali geni: *Slc35c2* (transportni protein, C2 član porodice 35), *Yif1b* (Yip1-interreagirajući faktor, homolog B), *Dnah2* (teški lanac 2 aksonemalnog dineina), *Itgb8* (beta 8 podjedinica integrina), *Sec14l4* (lipid-vezujući protein 4 nalik na SEC14), *Syt13* (sinaptotagminu sličan protein 3), *Dcbl2* (diskoidin 2 sa CUB i LCCL domenom), *Calml4* (kalmodulinu sličan protein 4), *Zbtb41* (protein 41 koji sadrži cinkov prst i BTB domenu), *Atp11c* (fosfolipid-prenoseća 11C ATPaza), *Snx7* (sortirajući neksin 7).

U daljnjem tekstu opisać ću gene čija bi funkcija mogla biti relevantna za neurone hipokampusa.

Gen *Slc19a3* lociran je na štakorskom kromosomu 9, dok je ljudski ortolog na kromosomu 2. Kodira transmembranski protein, transporter koji posreduje visokoafinitetni prijenos tiamina u stanicu, vjerojatno mehanizmom proton-antiport. Autosomalna mutacija u genu uzrokuje epizodičnu encefalopatiju, napadaje, te ponekad komu i smrt, ili trajnu distoniju mozga. Pritom su prisutne karakteristične bilateralne lezije u bazalnim ganglijima (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9BZV2>). Poznato je da hipoksija uzrokuje povišenje ekspresije ovog gena (Schänzer i sur., 2014). Osim u mozgu, eksprimiran je i u perifernim tkivima, a posebno u posteljici, bubrezima, jetri, i tankom crijevu. Znatan dio strukture je očuvan između ljudi, glodavaca, i evolucijski udaljenijih skupina organizama, radi očuvanja vitalne funkcije transportera. Budući da se neurodegenerativni simptomi mutacija u *Slc19a3* mogu liječiti visokim dozama biotina, pretpostavlja se da djeluje i kao biotinski transporter. (Zeng i sur., 2005).

Gen *Gpd1* u štakora se nalazi na kromosomu 7, a u čovjeka na kromosomu 12. Kodira citoplazmatski enzim (oksidoreduktazu, po molekularnoj funkciji) koji katalizira reakciju dehidrogenacije glicerol-3-fosfata, uz prisutstvo kofaktora NAD⁺. Sudjeluje u nizu bioloških procesa, uključujući stanični odgovor na cAMP (<https://www.uniprot.org/uniprot/P21695>). Ekspresija mu je tipično visoka u jetri i smeđem masnom tkivu, a niska u slezeni. Promotor gena ima uzorke metilacije karakteristične za svako tkivo, što mu omogućuje diferencijalnu ekspresiju u različitim dijelovima organizma (Gwynn, Lyford, Birkenmeier, 1990). Postoje indikacije da povišena aktivnost ovog enzima doprinosi porastu sinteze

triacilglicerola u adipocitima (Swierczynski i sur., 2003). Ključan je u povezivanju metabolizma ugljikohidrata i lipida, te je u mozgu induciran pri nedostatku sna (Guindalini i sur., 2010).

Eno2 je gen smješten na štakorskom 4. kromosomu, odnosno ljudskom 12. kromosomu. Protein kodiran ovim genom posjeduje neurotrofna i neuroprotektivna svojstva širom središnjeg živčanog sustava. Na način ovisan o kalciju, veže neokortikalne neurone u kulturi te potiče preživljavanje stanica (<https://www.uniprot.org/uniprot/P07323>). Uključen je u metaboličke procese glukoze (glikoliza, glukoneogeneza) te odgovor na estradiol. Lokalizira u više staničnih komponenti, uključujući i sinaptičku membranu (<https://rgd.mcw.edu/rgdweb/report/gene/main.html?id=2554>). Neurotrofni i neuroprotektivni učinak karakterističan je za neuron-specifičnu enolazu (gama gama izoenzim), za razliku od alfa alfa (ne-neuronalne) enolaze. Štoviše, ta je razlika posebno značajna u kulturi s niskom koncentracijom kisika, tj. hipoksiji. Mehanizam neuroprotektivnog djelovanja temelji se na kalcij-ovisnom vezanju enzima na neurone, zbog čega se pretpostavlja da razni tipovi neurona na površini imaju molekulu koja djeluje kao receptor ili nosač za gama gama enolazu (Hattori i sur., 1995).

U štakora je gen **Vgf** na kromosomu 12, a u ljudi na kromosomu 7. Predviđeno je da njegov genski produkt omogućuje aktivnost neuropeptidnih hormona. Uključen je u regulaciju neuronalne sinaptičke plastičnosti. Lokaliziran je u neuronskim projekcijama, somi, i membrani sekretornih granula. (<https://rgd.mcw.edu/rgdweb/report/gene/main.html?id=69399>). Tretman BDNF-om uzrokuje povišenu ekspresiju proteina VGF u hipokampalnim neuronima. C-terminalni VGF peptidi *in vitro* akutno povišuju sinaptički naboj neurona na način ovisan o dozi. Činjenica da egzogena primjena VGF peptida doprinosi sinaptičkim procesima svjedoči o njegovoj važnosti u procesima učenja i pamćenja. (Alder i sur., 2003).

Fndc4 je nekarakterizirani protein, čiji je gen smješten na 6. kromosomu u štakora. Budući da njegova uloga nije jasna, nema podataka o ljudskom ortologu. Međutim, postoji indikacija da je uključen u negativnu regulaciju upalnog odgovora (Gaudet i sur., 2011). Lokalizira se u staničnoj membrani i u izvanstaničnom prostoru (<https://rgd.mcw.edu/rgdweb/report/gene/main.html?id=15006128>).

Protein kodiran genom **Slc35c2** lociran je u *cis*-Golgi mreži i intermedijarnom odjeljku između endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog aparata. U štakora je smješten na kromosomu 3, a u čovjeka na kromosomu 20. Predviđa se da omogućuje aktivnost antiporterskih prijenosnika te da je uključen u transmembranski prijenos UDP-glukoze. Također se predviđa da djeluje uzvodno od, ili unutar negativne regulacije ekspresije gena. Utječe na O-vezanu fukozilaciju proteina (<https://rgd.mcw.edu/rgdweb/report/gene/main.html?id=1311250>). Pozitivno regulira signalni put Notch, koji je ključan tijekom postnatalne neurogeneze, te za održavanje neuronalnih matičnih stanica tijekom života (Imayoshi i sur., 2010).

Gen *Yif1b* u čovjeka se nalazi na 19., a u štakora na 1. kromosomu. Za genski produkt *Yif1b* predviđa se da je uključen u transport posredovan endoplazmatskim retikulumom i Golgijevim vezikulama, te usmjeravanju (eng. *targeting*) proteina prema membrani (<https://rgd.mcw.edu/rgdweb/report/gene/main.html?id=735199>). Mutacije gena *Yif1b* povezane su sa poremećajima postnatalnog razvoja mozga, odnosno zaostajanjem u razvoju motoričkih, vizualnih, te općenito kognitivnih sposobnosti, kako u ljudi, tako i na mišjem modelu (Diaz i sur., 2020).

Dnah2 kodira protein s predviđenom ATP-vezujućom aktivnošću, uključen u slaganje unutarnje ruke dineina. Sudjeluje u molekularnom putu Huntingtonove bolesti (<https://rgd.mcw.edu/rgdweb/report/gene/main.html?id=1565087>). Lokalizira u mikrotubulima. U štakora se nalazi na kromosomu 10, a u ljudi na kromosomu 17 (<https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0G2JYL5>).

Itgb8 je gen na kromosomu 7 kod ljudi, odnosno 6 kod štakora. Protein kodiran ovim genom omogućuje vezujuću aktivnost signalnih receptora. Sudjeluje u signalnom putu posredovanom integrinima, regulaciji ekspresije gena, te vaskulogenezi. Predviđa se da djeluje u, ili uzvodno od nekoliko procesa, uključujući metabolizam gangliozida i fokalnu adheziju na staničnoj površini. Također je uključen u signalni put posredovan izvanstaničnim matriksom. (<https://rgd.mcw.edu/rgdweb/report/gene/main.html?id=1311374>)

Za produkt gena *Sec14l4* predviđa se da omogućuje lipid-vezujuću aktivnost. Ljudska varijanta nalazi se na kromosomu 22, dok je štakorski ortolog na kromosomu 14. Moguće je da posreduje transport hidrofobnih liganada poput tokoferola, fosfolipida te skvalena (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9UDX3>). Postoje indicacije da je uključen u rast neurita te procese u Parkinsonovoj bolesti (Barbu i sur., 2020).

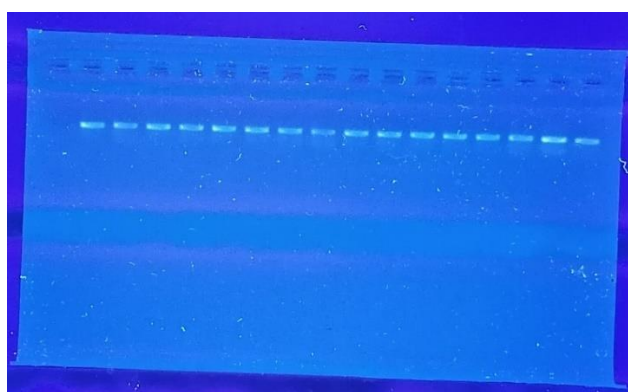
Syl3 je smješten na 1. kromosomu štakora, tj. na 6. kromosomu čovjeka. Predviđeno je da veže fosfolipide na način ovisan o kalciju, te da veže proteine iz porodice neureksina. Predviđa se i da lokalizira u plazma-membrani, kao ekstrinzična komponenta, gdje posreduje u egzocitozi. (<https://rgd.mcw.edu/rgdweb/report/gene/main.html?id=1561992>). Djeluje kao regulator kortikalne migracije neurona tijekom ranog razvoja mozga. Mutacije ili promjene u ekspresiji ovog gena uzrokuju abnormalnu distribuciju dubljih slojeva neurona u moždanim organoidima, te smanjeno presinaptičko otpuštanje neurotransmitera u neuronima dobivenim od matičnih stanica. Navedeno je opaženo za ljudske i za mišje neurone (Dong i sur., 2021).

Na temelju informacija o sekvencama RNA te pretragom literature o ulogama i interakcijama navedenih gena, odabran je *VIP* kao gen čija bi se promijenjena ekspresija mogla povezati s ranije opaženim promjenama u prostornom učenju u hipoksičnih životinja te je sljedeći korak bio potvrda njegove povišene ekspresije putem metode qPCR.

4.2. Diferencijalna eksprimiranost gena *VIP*

4.2.1. Potvrda uspješnosti reverzne transkripcije

Nakon reverzne transkripcije uzoraka RNA u komplementarnu DNA, provedela sam provjeru uspješnosti reakcijom PCR i agaroznom gel-elektroforezom, čiji je rezultat prikazan na Slici 4. Potvrđena je uspješna transkripcija fragmenata u podjednakoj mjeri, što je vidljivo po intenzitetu vizualizacije vrpce (eng. *bands*) pod transiluminatorom.

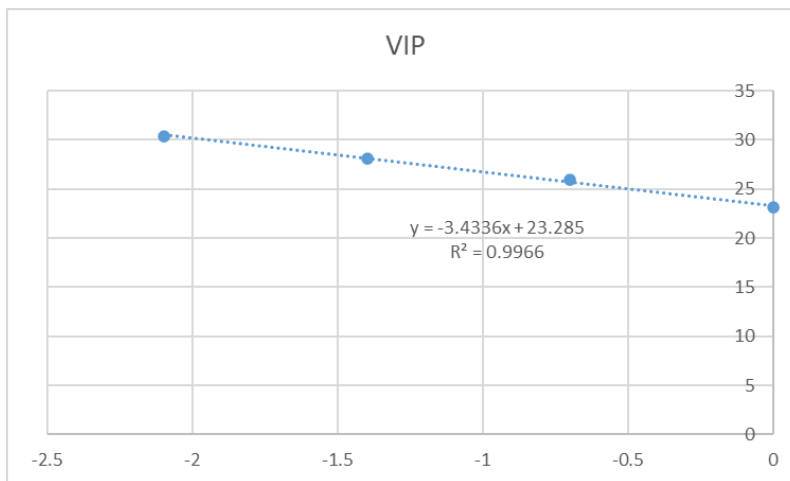


Slika 4. Prikaz elektroforetskog razdvajanja produkata PCR-reakcije za provjeru uspješnosti reverzne transkripcije. Fragmenti su vizualizirani bojom SYBR Safe DNA Gel Stain.

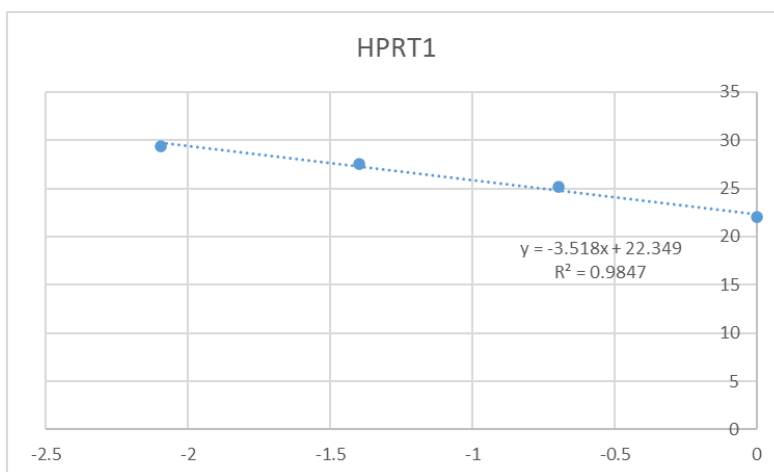
4.2.2. Potvrda učinkovitosti qPCR reakcija za pojedine početnice i optimizacija količine uzorka za qPCR reakciju

Razina učinkovitosti qPCR reakcije može varirati ovisno o duljini amplikona, njegovom sadržaju GC baza te sekundarnoj strukturi, kao i o kvaliteti enzima i koncentraciji reagensa. Učinkovitost se računa iz nagiba kalibracijskog pravca (učinkovitost = $10^{(-1/\text{nagib pravca})-1}$). Vrijednosti od 90% do 110% znače da se ciljane sekvence udvostručuju u svakom replikacijskom ciklusu, te se stoga smatra prihvatljivom. Kako bi se utvrdila učinkovitost reakcija za pojedine početnice i odredila optimalna količina uzorka za qPCR reakciju, od uzoraka cDNA kontrolnih i hipoksičnih životinja prikupljen je jedinstveni *pool* početne koncentracije 50 ng/μL, koji je potom razrijeđen na 15 ng/μL dodatkom vode bez nukleaza. U svrhu izrade kalibracijskih krivulja za određivanje učinkovitosti upotrijebljeno je redom 105 ng, 21 ng, 4,2 ng, te 0,84 ng *pool*-a po jažici pločice (serija peterostrukih razrijeđenja). Dobiveni podaci korišteni su za izradu krivulja na Slikama 5, 6, i 7, koje su upotrijebljene za izračun učinkovitosti umnažanja, kao

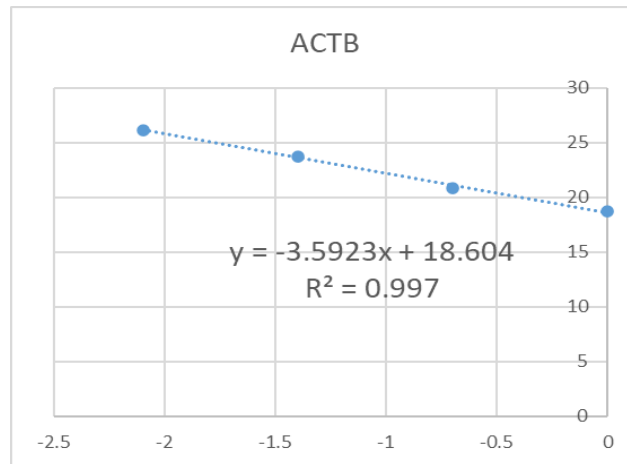
i za određivanje odgovarajuće količine cDNA u qPCR reakciji za provjeru diferencijalne ekspresije gena *VIP*.



Slika 5. Kalibracijska krivljulja qPCR reakcije za gen *VIP*



Slika 6. Kalibracijska krivljulja qPCR reakcije za gen *HPRT1*



Slika 7. Kalibracijska krivljulja qPCR reakcije za gen *ACTB*.

Učinkovitosti reakcija za sve testirane početnice nalazile su se u rasponu prihvatljivih vrijednosti i prikazane su u Tablici 6. Kao optimalna količina uzorka za qPCR reakciju određena je količina od 30 ng cDNA. Stoga smo sve uzorke razrijedili na koncentraciju 15 ng/μL i u reakciji umnažanja koristili 2 μL razrijeđenog uzorka.

Tablica 6. Učinkovitost qPCR reakcija za pojedine početnice. U tablici su prikazane vrijednosti korelacijskog koeficijenta (R^2) i nagiba pravca iz kojeg je izračunata učinkovitost izražena u postocima.

	R^2	Nagib pravca	Učinkovitost (%)
ACTB	0,99	-3,59	90
HPRT1	0,99	-3,52	92
VIP	0,99	-3,43	96

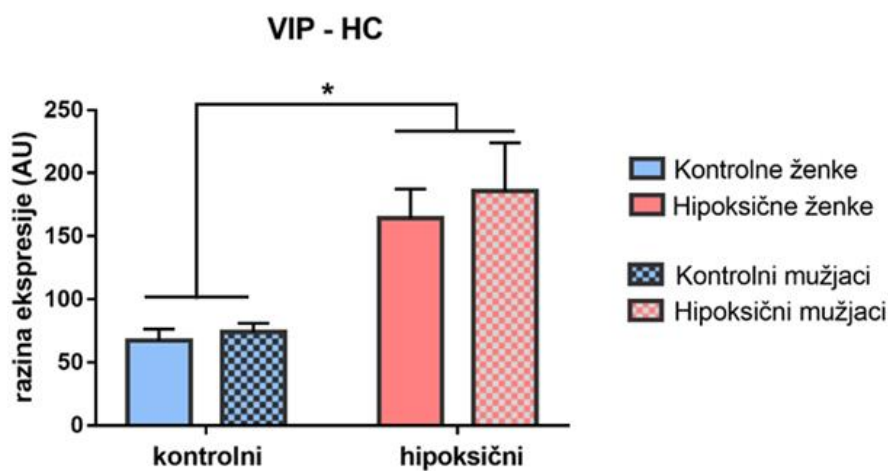
4.3. Potvrda diferencijalne ekspresije gena *VIP*

Metodom kvantitativnog PCR-a (qPCR), odnosno PCR-a u stvarnom vremenu, određena je razlika u relativnoj ekspresiji gena za *VIP* između kontrolne i hipoksične skupine.

Tablica 7. Relativna ekspresija gena *VIP* s obzirom na spol i tretman. Vrijednosti su izražene u arbitrarnim jedinicama i prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška.

	Kontrolna skupina	Hipoksična skupina	prosječna vrijednost po spolu
ženke	67,3 \pm 8,93	164 \pm 23,3	116 \pm 17,4
mužjaci	73,9 \pm 6,54	186 \pm 38,4	134 \pm 25,0
prosječna vrijednost po tretmanu	70,3 \pm 5,80	175 \pm 21,9	

Iz podataka u Tablici 7 je vidljivo da su u hipoksičnoj skupini i ženke i mužjaci imali oko 2,5 puta jaču ekspresiju gena za *VIP* od ženki i mužjaka u kontrolnoj skupini. Dvosmjerna analiza varijance pokazala je značajan utjecaj tretmana ($F=18,99$, $p=0,0002$) na ekspresiju gena *VIP*, dok spol ($F=0,347$, $p=0,5606$) i interakcija spol x tretman ($F=0,098$, $p=0,7563$) na nju nisu značajno utjecali (Slika 8.)



Slika 8. Diferencijalna ekspresija gena *VIP* u hipokampusu kontrolnih i hipoksičnih štakora. Rezultati su izraženi u arbitrarnim jedinicama (AU) i prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška ($M \pm SEM$).

* $p < 0,001$, utjecaj tretmana u dvosmjernoj analizi varijance.

5. RASPRAVA

Diferencijalno RNA-sekvenciranje pokazalo je značajnu razliku u ekspresiji gena čiji su produkti uključeni u stanični metabolizam (*Slc19a3*, *Gpd1*, *Slc35c2*), vezikularni transport (*Yif1b*, *Dnah2*, *Sec14l4*, *Sytl3*), sinaptičku plastičnost (*Itgb8*, *Vgf*) i neuroprotekciju (*VIP*, *Eno2*). Svi navedeni geni igraju ulogu u pravilnoj funkciji hipokampusa, a promjena njihove ekspresije u skupini hipoksičnih životinja može biti ili izravna posljedica hipoksije ili kompenzatorni (protektivni) odgovor na hipoksiju, koji se zadržao i do adolescentne dobi.

Na modelu akutne blage neonatalne hipoksije ranije je uočen deficit u prostornom učenju, koji se donekle kompenzirao kada je u proces učenja bila uključena nagrada kao motivacija. Naime, kod eksperimentalne skupine isprva je uočeno brže učenje tijekom prvih nekoliko dana testiranja: to se očitivalo većim brojem „točnih odabira“ kraka T-labirinta u kojem se nalazila nagrada (hrana). Međutim, odmakom eksperimenta, kontrolna je skupina postigla jednak ili veći broj „točnih odabira“. Stoga se može pretpostaviti da su štakori iz eksperimentalne skupine možda bili motiviraniji za učenje, te stoga u početku brže savladavaju zadatak. S obzirom na indiciranost uloge VIP-a u prostornom učenju povezanom s nagradom (Turi i sur., 2019), odlučili smo dalje istražiti gen *VIP* i potvrditi njegovu diferencijalnu ekspresiju kvantitativnim PCR-om. Zaista, qPCR je pokazao 2,5 puta jaču ekspresiju u eksperimentalnih nego u kontrolnih životinja. Spol nije imao značajan učinak na ekspresiju *VIP-a*, kao ni interakcija tretmana i spola, što indicira da nema međureakcije spolnih hormona s VIP-om ni nizvodnim molekulama u putu koji VIP aktivira.

VIP ostvaruje svoju funkciju putem sustava posredovanih receptorima, aktivirajući sustave prijenosa signala, uključujući cAMP. Djeluje kao neuromodulator, neurotransmiter, te sekretagog. Igra ključnu ulogu u preživljenju neurona, kao faktor rasta i razvoja. Neki od učinaka VIP-a uključuju sistemsku vazodilataciju, pojačan rad srca, bronhodilataciju, hiperglikemiju, relaksaciju glatkih mišića, te glikogenolizu u jetri i cerebralnom korteksu. VIP se može naći u moždanim strukturama blisko asociranim s krvnim žilama, gdje uzrokuje njihovu vazodilataciju te tako povećava cerebralni protok krvi (Gozes i Brenneman, 1989).

Dosadašnja istraživanja pokazala su neuroprotektivni potencijal VIP-a. U studiji iz 2015, provedeno je uskraćenje glukoze i kisika kao *in vitro* model ishemičnog stresa na neuronima i glija-stanicama; pritom se mjerila proizvodnja cAMP-a posredovana receptorom te izazvana VIP-om. Utvrđeno je da hipoksija/ishemija može smanjiti ekspresiju receptora za VIP spregnutih s adenilil ciklazom, što posljedično smanjuje VIP-ovisno signaliziranje potaknuto cAMP-om. Štoviše, VIP može umanjiti poguban učinak manjka kisika i glukoze na neuronalne stanice. (Józwiak-Bębenista, Kowalczyk, Nowak, 2015). Budući da je istraživanje provedeno u ovom diplomskom radu pokazalo povišenu ekspresiju VIP-a u hipokampusu hipoksičnih štakora, može se zaključiti da se radi o prirodnom

obrambenom mehanizmu mozga, pri čemu se smanjena ekspresija receptora kompenzira višom ekspresijom peptida.

Nadalje, hipoksično-ishemijski inzult povisuje količinu slobodnih radikala u tkivu (Yager, 2004), što je dodatan razlog za lučenje VIP-a kao neuroprotektivnog agensa. Osim toga, VIP utječe na rast neurona i mitozu, kako *in vitro* tako i *in vivo*. Pokazana je zaštitna uloga VIP-a protiv ekscitotoksičnih lezija u mozgu neonatalnih miševa (Gressens i sur., 1997). Woodley i suradnici (2019) pokazali su da VIP sudjeluje u regeneraciji perifernih živaca tako što potiče ekspresiju gena za mijelin te sprječava lučenje upalnih citokina u Schwannovim stanicama. Protuupalni učinak VIP-a još je jedan argument za njegovu ulogu kao endogenog neuroprotektanta.

Neuroprotektivni potencijal VIP-a otvara mogućnost medicinske primjene ovog peptida. VIP, kao i PACAP (eng. *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) i druge endogeno prisutne molekule, ima visok potencijal kao terapeutik nakon moždanog udara i perinatalne hipoksije (Józwiak-Bębenista, Kowalczyk, Nowak, 2015), budući da se administracijom u tijelu već prisutnog spoja pojačava prirodno pokrenut proces. Navedeno je značajna prednost pred sintetskim neuroprotektantima, u smislu veće predvidivosti puteva u kojima molekula sudjeluje, te bržeg odobrenja za primjenu na pacijentima.

Druga moguća uloga VIP-a je da preko BDNF-a indirektno utječe na procese učenja i pamćenja. VIP-neuroni su homogena populacija intrakortikalnih bipolarnih stanica. Primaju ekscitatorne sinapse putem aferentnih krugova, te ostvaruju učinke kako na druge neurone, tako i na astrocite i kapilare, čime moduliraju lokalnu metaboličku aktivnost. VIP povećava neurotransmisiju posredovanu glutamatom potencirajući učinke glutamata na proizvodnju arahidonata, te na ekspresiju moždanog neurotrofnog čimbenika, tj. BDNF-a (Magistretti, Cardinaux, Martin, 1998). BDNF je uključen u razna složena ponašanja i kogniciju, a posebice u hipokampalnu dugotrajnu potencijaciju, gdje povećava sinaptičku efikasnost i omogućuje učenje i pamćenje (Lu, Nagappan, Lu, 2014).

Wakhloo i suradnici (2020) primijenili su blagu egzogenu inspiratornu hipoksiju na miševima te pokazali poboljšano učenje analogno administraciji eritropoetina, za koji je poznato da povećava gustoću dendritičkih trnova te potiče neurogenezu novih CA1 neurona. Na temelju uočenog, predlažu model neuroplastičnosti u kojem neuralne mreže tijekom kognitivnih zadataka prelaze u prolazno stanje blage hipoksije; lokalna, endogena hipoksija karakteristična je za piramidalne neurone hipokampusa. U njihovom je istraživanju primijećeno poboljšano učenje nakon tretmana; međutim, životinje u njihovom istraživanju bile su u odrasloj dobi, što ukazuje na različit odgovor neurona na uvjete hipoksije ovisno o stupnju razvoja. Zreli neuroni potaknuti blagom hipoksijom vjerojatno preko VIP-a ostvaruju prolazni period poboljšanog učenja; nasuprot tome, izlaganje hipoksiji u kritičnom periodu neuralnog razvoja očigledno rezultira trajno povišenim razinama VIP-a, što omogućuje inicijalno brže učenje tretiranih životinja, ali ne i sveukupno bolje rezultate.

Alternativno, pojačana motivacija za pronalazak nagrade mogla je biti povezana s pojačanom aktivnošću mezolimbickog puta dopamina u hipoksičnih životinja, kao posljedica povećane razine dopamina u moždanom deblu, koja je također uočena na ovom modelu. Dopaminergički neuroni srednjeg mozga glavni su izvor dopamina u mozgu. Pokazana je uloga dopamina u kontroli pokreta, kogniciji te motivaciji. Dopamin djeluje kao motivirajuća tvar zbog očekivanja nagrade – ako je nagrada veća od očekivane, pojačano okidaju određeni dopaminergični neuroni, što povećava motiviranost za daljnje traženje nagrade (Arias-Carrión i Pöppel, 2007).

Zamjetne promjene u hipokampusu i moždanom deblu uočene na našem modelu u skladu su s dosadašnjim podacima da su te regije osjetljive na hipoksično-ishemične ozljede (Yager, 2004). Ostaje za istražiti točan molekularni mehanizam kojim VIP utječe na prostorno učenje, njegovu interakciju s dopaminom te moguće utjecaje na druge molekularne puteve i neuroanatomske strukture koje nisu promatrane u ovom radu.

6. ZAKLJUČAK

Na štakorskom modelu blage akutne neonatalne hipoksije, na kojem su prethodno opažene promjene u prostornom učenju, analizirana je diferencijalna ekspresija gena u hipokampusu – regiji odgovornoj za prostorno učenje. Dobiveni rezultati upućuju na sljedeće zaključke:

1. Analiza rezultata RNA-sekvenciranja pokazala je diferencijalnu ekspresiju 17 gena, od kojih smo 11 procijenili kao relevantne za pravilnu funkciju hipokampusu. Radi se o genima čiji su produkti uključeni u stanični metabolizam (*Slc19a3*, *Gpd1*, *Slc35c2*), vezikularni transport (*Yif1b*, *Dnah2*, *Sec14l4*, *Syt13*), sinaptičku plastičnost (*Itgb8*, *Vgf*) i neuroprotekciju (*VIP*, *Eno2*).
2. Zbog pretpostavljene uloge u prostornom učenju motiviranom nagradom, za provjeru diferencijalne ekspresije qPCR-om odabrali smo gen za VIP.
3. Pokazali smo uspješnost reverzne transkripcije u svim uzorcima iz hipoksične i kontrolne skupine, vizualizacijom produkata RT-PCR-a agaroznom gel-elektroforezom. Izradom baždarnih krivulja pokazali smo prihvatljivu efikasnost umnažanja gena od interesa i oba kontrolna gena.
4. Kvantitativni PCR potvrdio je diferencijalnu ekspresiju gena za VIP, koja je bila 2,5 puta veća u uzorcima hipoksične skupine. Spol nije imao značajan utjecaj na ekspresiju ovog gena.
5. Pretpostavljamo da bi povećanje ekspresije gena za VIP moglo predstavljati kompenzatorni neuroprotektivni odgovor na hipoksijsku ozlijeđu u neonatalnoj dobi. Pojačana ekspresija VIP-a, koja se zadržala i u adolescentnoj dobi, mogla je modificirati proces prostornog učenja u smislu kompenzacije kognitivnog deficita pojačanom motivacijom.

7. LITERATURA

Alder, J., Thakker-Varia, S., Bangasser, D. A., Kuroiwa, M., Plummer, M. R., Shors, T. J., Black, I. B. (2003). Brain-Derived Neurotrophic Factor-Induced Gene Expression Reveals Novel Actions of VGF in Hippocampal Synaptic Plasticity. *The Journal of Neuroscience*, 23(34), 10800–10808

Argiolas, A., Melis, M. R. (2013). Neuropeptides and central control of sexual behaviour from the past to the present: A review. *Progress in Neurobiology*, 108, 80–107

Arias-Carrión O, Pöppel E. (2007). Dopamine, learning, and reward-seeking behavior. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 67(4):481-8

Barbu, M. C., Spiliopoulou, A., Colombo, M., McKeigue, P., Clarke, T.-K., Howard, D. M., Adams, M. J., Shen, X., Lawrie, S. M., McIntosh, A. M., Whalley, H. C. (2020). Expression quantitative trait loci-derived scores and white matter microstructure in UK Biobank: a novel approach to integrating genetics and neuroimaging. *Translational Psychiatry*, 10(1)

Bolton, T. B., Lang, R. J., Ottesen, B. (1981). Mechanism of action of vasoactive intestinal polypeptide on myometrial smooth muscle of rabbit and guinea-pig. *The Journal of Physiology*, 318(1), 41–55

Cunha-Reis, D., Caulino-Rocha, A. (2020). VIP Modulation of Hippocampal Synaptic Plasticity: A Role for VIP Receptors as Therapeutic Targets in Cognitive Decline and Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14

Diaz, J., Gérard, X., Emerit, M.-B., Areias, J., Geny, D., Dégardin, J., Simonutti, M., Guerquin, M., Collin, T., Viollet, C., Billard, J., Metin, C., Hubert, L., Larti, F., Kahrizi, K., Jobling, R., Agolini, E., Shaheen, R., Zigler, A., Rouiller-Fabre, V., Rozet, J., Picaud, S., Novelli, A., Alameer, S., Najmabadi, H., Cohn, R., Munnich, R., Barth, M., Lugli, L., Alkuraya, F., Blaser, S., Gashlan, M., Besmond, C., Darmon, M., Masson, J. (2020). YIF1B mutations cause a post-natal neurodevelopmental syndrome associated with Golgi and primary cilium alterations. *Brain*, 143(10), 2911–2928

Dong, X., Yang, L., Liu, K., Ji, X., Tang, C., Li, W., Ma, L., Mei, Y., Peng, T., Feng, B., Wu, Z., Tang, Q., Gao, Y., Yan, K., Zhou, W., Xiong, M. (2021). Transcriptional networks identify synaptotagmin-like 3 as a regulator of cortical neuronal migration during early neurodevelopment. *Cell Reports*, 34(9), 108802.

Finder, M., Boylan, G. B., Twomey, D., Ahearne, C., Murray, D. M., Hallberg, B. (2019). Two-Year Neurodevelopmental Outcomes After Mild Hypoxic Ischemic Encephalopathy in the Era of Therapeutic Hypothermia. *JAMA Pediatrics*

- Gaudet, P., Livstone, M. S., Lewis, S. E., Thomas, P. D. (2011). Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium. *Briefings in Bioinformatics*, 12(5), 449–462
- Giannopoulou, I., Pagida, M. A., Briana, D. D., Panayotacopoulou, M. T. (2018). Perinatal hypoxia as a risk factor for psychopathology later in life: the role of dopamine and neurotrophins. *Hormones*, 17(1), 25–32
- Golan, H., Huleihel, M. (2006). The effect of prenatal hypoxia on brain development: short- and long-term consequences demonstrated in rodent models. *Developmental Science*, 9(4), 338–349
- Gozes, I., Brenneman, D. E. (1989). VIP: Molecular biology and neurobiological function. *Molecular Neurobiology*, 3(4), 201–236
- Gressens, P., Marret, S., Hill, J.M., Brenneman, D.E., Gozes, I., Fridkin, M., Evrard, P. (1997). Vasoactive Intestinal Peptide Prevents Excitotoxic Cell Death in the Murine Developing Brain. *The Journal of Clinical Investigation*, 100(2), 390–397
- Guindalini, C., Lee, K. S., Andersen, M. L., Santos-Silva, R., Bittencourt, L. R. A., Tufik, S. (2010). The influence of obstructive sleep apnea on the expression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase1 gene. *Experimental Biology and Medicine*, 235(1), 52–56
- Gwynn B., Lyford K.A., Birkenmeier E.H. (1990). Sequence conservation and structural organization of the glycerol-3-phosphate dehydrogenase promoter in mice and humans. *Molecular and Cellular Biology* Oct;10(10):5244-56
- Halder, S. K., Milner, R. (2020). Mild hypoxia triggers transient blood–brain barrier disruption: a fundamental protective role for microglia. *Acta Neuropathologica Communications*, 8(1)
- Hattori, T., Takei, N., Mizuno, Y., Kato, K., Kohsaka, S. (1995). Neurotrophic and neuroprotective effects of neuron-specific enolase on cultured neurons from embryonic rat brain. *Neuroscience Research*, 21(3), 191–198
- Hefter, D., Marti, H. H., Gass, P., Inta, D. (2018). Perinatal Hypoxia and Ischemia in Animal Models of Schizophrenia. *Frontiers in Psychiatry*, 9
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K., Kageyama, R. (2010). Essential Roles of Notch Signaling in Maintenance of Neural Stem Cells in Developing and Adult Brains. *Journal of Neuroscience*, 30(9), 3489–3498
- Józwiak-Bębenista, M., Kowalczyk, E., Nowak, J. Z. (2015). The cyclic AMP effects and neuroprotective activities of PACAP and VIP in cultured astrocytes and neurons exposed to oxygen-glucose deprivation. *Pharmacological Reports*, 67(2), 332–338

- Joye, D. A. M., Rohr, K. E., Keller, D., Inda, T., Telega, A., Pancholi, H., Carmona-Alcocer, V., Evans, J. A. (2020). Reduced VIP Expression Affects Circadian Clock Function in VIP-IRES-CRE Mice (JAX 010908). *Journal of Biological Rhythms*, 074873042092557
- Kadowaki, K., Koike, K., Hirota, K., Ohmichi, M., Kurachi, H., Miyoke, A., Tanizawa, O. (1992). Vasoactive Intestinal Peptide Enhances Dopamine Accumulation in Primary Cell Culture of Rat Hypothalamus. *Endocrinologia Japonica*, 39(2), 197–202
- Kim, S. H., Lee, W. S., Lee, N. M., Chae, S. A., Yun, S. W. (2015). Neuroprotective effects of mild hypoxia in organotypic hippocampal slice cultures. *Korean J Pediatr*, Apr;58(4):142-7
- Kingsbury, M. A., Jan, N., Klatt, J. D., Goodson, J. L. (2015). Nesting behavior is associated with VIP expression and VIP–Fos colocalization in a network-wide manner. *Hormones and Behavior*, 69, 68–81
- Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. *Current Biology*, 25(23), R1116–R1121
- Louzoun-Kaplan, V., Zuckerman, M., Regino Perez-Polo, J., Golan, H. M. (2008). Prenatal hypoxia down regulates the GABA pathway in newborn mice cerebral cortex; partial protection by MgSO₄. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 26(1), 77–85
- Lu, B., Nagappan, G., Lu, Y. (2014). BDNF and Synaptic Plasticity, Cognitive Function, and Dysfunction. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 223–250
- MacIntyre, N. R. (2014). Tissue Hypoxia: Implications for the Respiratory Clinician. *Respiratory Care*, 59(10), 1590–1596
- Magistretti, P. J., Cardinaux, J.-R., Martin, J.-L. (1998). VIP and PACAP in the CNS: Regulators of Glial Energy Metabolism and Modulators of Glutamatergic Signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 865(1 VIP, PACAP, A), 213–225.
- McClelland, J. L., McNaughton, B. L., O'Reilly, R. C. (1995). Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: Insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. *Psychological Review*, 102(3), 419–457
- McClung, C. A., Nestler, E. J. (2007). Neuroplasticity Mediated by Altered Gene Expression. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), 3–17
- Millar, L. J., Shi, L., Hoerder-Suabedissen, A., Molnár, Z. (2017). Neonatal Hypoxia Ischaemia: Mechanisms, Models, and Therapeutic Challenges. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11(78), 7-10
- Moody, T. W., Hill, J. M., Jensen, R. T. (2003). VIP as a trophic factor in the CNS and cancer cells. *Peptides*, 24(1), 163–177

- Nagai, K. (2004). Role of VIP-neurons in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus in the control of blood glucose. *Folia Pharmacologica Japonica*, 123(4), 253–260. doi:10.1254/fpj.123.253
- Northington, F. J. (2006). Brief Update on Animal Models of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy and Neonatal Stroke. *ILAR Journal*, 47(1), 32–38
- Otellin, V. A., Khozhai, L. I., Vataeva, L. A., Shishko, T. T. (2013). Long-Term Consequences of Hypoxia During the Perinatal Period of Development on the Structural-Functional Characteristics of the Brain in Rats. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 43(5), 623–628.
- Pleša, I. (2017). Fetalna hipoksija i perinatalno oštećenje mozga, diplomski rad pri Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.
- Rice, J.E., Vannucci, R.C., Brierley, J.B. (1981). The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Annals of Neurology* 9, 131–141.
- Schänzer, A., Döring, B., Ondruschek, M., Goos, S., Garvalov, B. K., Geyer, J., ... Hahn, A. (2014). Stress-Induced Upregulation of SLC19A3 is Impaired in Biotin-Thiamine-Responsive Basal Ganglia Disease. *Brain Pathology*, 24(3), 270–279
- Renolleau, S., Aggoun-Zouaoui, D., Ben-Ari, Y., Charriaut-Marlangue, C. (1998). A model of transient unilateral focal ischemia with reperfusion in the P7 neonatal rat: morphological changes indicative of apoptosis. *Stroke*, American Heart Association, 29 (7), 1454-1461.
- Stadlin, A., James, A., Fiscus, R., Wong, Y. F., Rogers, M., Haines, C. (2003). Development of a postnatal 3-day-old rat model of mild hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Research*, 993(1-2), 101–110.
- Swierczynski, J., Zabrocka, L., Goyke, E., Raczynska, S., Adamonis, W., Sledzinski, Z. (2003). *Molecular and Cellular Biochemistry*, 254(1/2), 55–59
- Turi, G. F., Li, W.-K., Chavlis, S., Pandi, I., O'Hare, J., Priestley, J. B., Grosmark, A.D., Liao, Z., Ladow, M., Zhang, J.F., Zemelman, B.V., Poirazi, P., Losonczy, A. (2019). Vasoactive Intestinal Polypeptide-Expressing Interneurons in the Hippocampus Support Goal-Oriented Spatial Learning. *Neuron*, 101(6), 1150–1165.e8.
- Vosko, A. M., Schroeder, A., Loh, D. H., Colwell, C. S. (2007). Vasoactive intestinal peptide and the mammalian circadian system. *General and Comparative Endocrinology*, 152(2-3), 165–175.
- Wakhloo, D., Scharkowski, F., Curto, Y., Butt, U.J., Bansal, V., Steixner-Kumar, A. A., Wüstefeld, L., Rajput, A., Arinrad, S., Zillmann, M. R., Seelbach, A., Hassouna, I., Schneider, K., Ibrahim, A. Q., Werner, H. B., Martens, H., Miskowiak, K., Wojcik, S. M., Bonn, S., Nacher, J., Nave, K.-A.,

Ehrenreich, H. (2020). Functional hypoxia drives neuroplasticity and neurogenesis via brain erythropoietin. *Nature Communications* 11, 1313

Wingo, T., Nesil, T., Choi, J.-S., Li, M. D. (2015). Novelty Seeking and Drug Addiction in Humans and Animals: From Behavior to Molecules. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 11(3), 456–470

Witter, M. P., Amaral, D. G. (2004). Hippocampal Formation. *The Rat Nervous System*, 635–704

Woodley, P. K., Min, Q., Li, Y., Mulvey, N. F., Parkinson, D. B., Dun, X. (2019). Distinct VIP and PACAP Functions in the Distal Nerve Stump During Peripheral Nerve Regeneration. *Frontiers in Neuroscience*, 13

Yager, J. Y. (2004). Animal models of hypoxic-ischemic brain damage in the newborn. *Seminars in Pediatric Neurology*, 11(1), 31–46

Yang, Y., Chen, J., Li, L., Gao, Y., Chen, J., Fei, Z., Liu, W. (2012). Effect of Different Mild Hypoxia Manipulations on Kainic Acid-Induced Seizures in the Hippocampus of Rats. *Neurochemical Research*, 38(1), 123–132

Yamagami, T., Ohsawa, K., Nishizawa, M., Inoue, C., Gotoh, E., Yanaihara, N., Yamamoto, H., Okamoto, H. (1988). Complete Nucleotide Sequence of Human Vasoactive Intestinal Peptide/PHM-27 Gene and Its Inducible Promoter. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 527(1 Vasoactive In), 87–102

Zeng, W.-Q., Al-Yamani, E., Acierno, J. S., Slaugenhaupt, S., Gillis, T., MacDonald, M. E., Ozand, P. T., Gusella, J. F. (2005). Biotin-Responsive Basal Ganglia Disease Maps to 2q36.3 and Is Due to Mutations in SLC19A3. *The American Journal of Human Genetics*, 77(1), 16–26

<https://www.rcsb.org/structure/2RRH> (pristupljeno 8. listopada, 2021.)

<https://rgd.mcw.edu/rgdweb/elasticResults.html> (pristupljeno 12. listopada, 2021.)

<https://rgd.mcw.edu/rgdweb/report/gene/main.html?id=1311250> (pristupljeno 22. ožujka, 2022.)

<https://rgd.mcw.edu/rgdweb/report/gene/main.html?id=1311374> (pristupljeno 22. ožujka, 2022.)

<https://rgd.mcw.edu/rgdweb/report/gene/main.html?id=15006128> (pristupljeno 10. studenog, 2021.)

<https://rgd.mcw.edu/rgdweb/report/gene/main.html?id=1561992> (pristupljeno 22. ožujka, 2022.)

<https://rgd.mcw.edu/rgdweb/report/gene/main.html?id=1565087> (pristupljeno 22. ožujka, 2022.)

<https://rgd.mcw.edu/rgdweb/report/gene/main.html?id=2554> (pristupljeno 10. studenog, 2021.)

<https://rgd.mcw.edu/rgdweb/report/gene/main.html?id=69399> (pristupljeno 15. listopada, 2021.)

<https://rgd.mcw.edu/rgdweb/report/gene/main.html?id=735199> (pristupljeno 22. ožujka, 2022.)

<https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0G2JYL5> (pristupljeno 22. ožujka, 2022.)

<https://www.uniprot.org/uniprot/P07323> (pristupljeno 15. listopada, 2021.)

<https://www.uniprot.org/uniprot/P21695> (pristupljeno 15. listopada, 2021.)

<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9BZV2> (pristupljeno 15. listopada, 2021.)

<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9UDX3> (pristupljeno 22. ožujka, 2022.)

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1. ožujka 1997., u Puli. Odrasla sam u Sisku, gdje sam pohađala osnovnu školu Viktorovac. Srednjoškolsko obrazovanje stekla sam u Zagrebu, u Prirodoslovnoj školi Vladimira Preloga, smjer prirodoslovna gimnazija. Godine 2016. upisala sam preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu (PMF) u Zagrebu. Tijekom preddiplomskog studija držala sam demonstrature iz kolegija Biologija stanice i Osnove fizikalne kemije. Svake sam godine sudjelovala na manifestaciji Noć biologije, bilo kao predavač ili volonter. Tri godine zaredom sam ostvarila pravo na državnu STEM stipendiju.

Godine 2019. upisala sam diplomski studij eksperimentalne biologije, modul fiziologija i imunobiologija, na PMF-u u Zagrebu. Tri sam godine bila suvoditeljica sekcije za genetiku u Udruzi studenata biologije (BIUS). Volontirala sam kao mentorica u znanstveno-edukacijskom centru Višnjan, te pisala za studentski časopis *In vivo*. Bila sam aktivni član udruge za razmjenu studenata IAESTE, te pasivni sudionik Simpozija studenata bioloških usmjerenja (SISB).

Odradila sam laboratorijske stručne prakse na: Zdravstvenom fakultetu sveučilišta u Ljubljani pod vodstvom prof. dr. sc. Klemena Bohinca (2018), Zavodu za animalnu fiziologiju PMF-a u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić (2020), te ILVO Institutu u Belgiji pod vodstvom dr. sc. Karen Goosens (2020). Također sam sudjelovala kao student-volonter na znanstveno-popularnom projektu „U društvu mikroba“, u organizaciji Hrvatskog mikrobiološkog društva (2019).

PUBLIKACIJE:

Zore, A., Bezek, K., Jevšnik, M., Abram, A., **Runko, V.**, Slišković, I., Raspor, P., Kovačević, D., Bohinc, K. (2020). Bacterial adhesion rate on food grade ceramics and Teflon as kitchen worktop surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, 332, 108764. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108764