

Izražaj glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (GFAP) u mozgu odraslih štakora nakon perinatalne hipoksije

Radošević, Marta

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:217:571659>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-19**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Marta Radošević

**Istraživanje izražaja glijalnog fibrilarnog
kiselog proteina (GFAP) u mozgu odraslog
štakora nakon perinatalne hipoksije**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Marta Radošević

**Study of expression of the glial fibrillary
acidic protein (GFAP) in the adult rat brain
following perinatal hypoxia**

Master thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u Hrvatskom institutu za istraživanje mozga na Medicinskom fakultetu u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Nataše Jovanov-Milošević, te komentorstvom izv. prof. dr. sc. Duje Lisičića. 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

Istraživanje izražaja glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (GFAP) u mozgu odraslog štakora nakon perinatalne hipoksije

Marta Radošević

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Cilj ovog pilot istraživanja je utvrditi učinak kratkotrajne perinatalne hipoksijske ozljede u odraslih štakora na razinu izražaja GFAP-a. Korišteno je osam ženki Wistar Han (RccHan:WIST) štakora dobi P(105) – četiri kontrolne i četiri perinatalno podvrgnute kratkotrajnoj hipoksiji. Histološki preparati bili su podvrgnuti imunofluorescentnom bojenju korištenjem anti-GFAP protutijela i fluorescentnom Nissl bojenju. Kvalitativna analiza 20 presjeka nije pokazala promjene u citoarhitektonici hipokampusa, dok je uočen viši intenzitet izražaja GFAP⁺ astrocita nakon kratkotrajne perinatalne hipoksije. Kvantitativna analiza 20 presjeka pokazala je tendenciju k povećanju gustoće astrociti/mm² u polju CA1 u hipoksijskoj skupini štakora. Gustoća astrociti/mm² u polju CA2 ne pokazuje razlike između hipoksijske i kontrolne skupine. Izazvana kratkotrajna perinatalna hipoksija bila je blaga i uzrokovala je suptilne promjene koje nisu detektirane na ovom broju uzoraka. Potencijalno daljnje istraživanje povećanjem broja životinja u eksperimentu te samim time i broja uzoraka, moglo bi pokazati je li promjena morfologije astrocita ili je povećanje izražaja GFAP⁺ astrocita, razlog kvalitativnog utiska da je GFAP pozitivnih astrocita više u hipokampusu perinatalno hipoksijsko ozlijeđenih štakora.

Ključne riječi: hipokampus, Nissl, astrociti, hipoksijska ozljeda, Fiji/ImageJ

(40 stranica, 8 slika, 1 tablica, 114 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Nataša Jovanov-Milošević

Komentor: izv. prof. dr. sc. Duje Lisičić

Ocjenitelji:

Izv. prof. dr. sc. Duje Lisičić

Izv. prof. dr. sc. Marija Ivković

Doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Rad prihvaćen: 8.12.2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Master thesis

Study of expression of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the adult rat brain following perinatal hypoxia

Marta Radošević

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The aim of this pilot study was to research the effects of short-term perinatal hypoxia on the expression of GFAP. For this purpose, eight female Wistar Han (RccHan:WIST) rats age P(105) – four controls and four perinatally treated with short-term hypoxia, were used. Samples were double stained using anti-GFAP antibody and Nissl stain. Qualitative analysis of 20 slices didn't indicate any change in the cytoarchitecture of the hippocampus, while there was a slight increase detected in the GFAP⁺ astrocyte signal after hypoxia. Quantitative analysis of 20 slices shows a tendency towards an increase in density of astrocyte/mm² in the CA1 field of the hypoxic rat group. Density of astrocyte/mm² in the CA2 field didn't show any difference between hypoxic and control group. The perinatal hypoxic injury in this study was short-term and mild, and it caused subtle changes which could not be registered on this small sample size. Future experiments, with a bigger sample size, might show if the qualitative phenomenon of more GFAP positive astrocytes in the hippocampus of perinatal hypoxically injured rats, is due to change in astrocyte morphology or due to an increase in GFAP expression in astrocytes.

Keywords: hippocampus, Nissl, astrocytes, hypoxic injury, Fiji/ImageJ
(40 pages, 8 figures, 1 table, 114 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Prof. Nataša Jovanov-Milošević, PhD

Co-mentor: Asst. Prof. Duje Lisičić, PhD

Reviewers:

Asst. Prof. Duje Lisičić, PhD

Asst. Prof. Marija Ivković, PhD

Assoc. Prof. Sofia Ana Blažević, PhD

Thesis accepted: 8.12.2022.

Istraživanje je financirano sljedećim projektima:

1. "Eksperimentalna i klinička istraživanja hipoksijsko-ishemijskog oštećenja mozga u perinatalnoj i odrasloj dobi", ZCI-Neuro (GA KK.01.1.1.01.0007, voditelj projekta prof. dr. sc. Miloš Judaš);
2. "Moždani izvanstanični matriks u razvitku i perinatalnoj hipoksiji" (HRZZ, IP-2019-04-3182, voditeljica projekta prof. dr. sc. Nataša Jovanov-Milošević);
3. Sveučilišna potpora br. 10106-22-3116, voditeljica projekta prof. dr. sc. Nataša Jovanov-Milošević).



Zahvalila bih se svojoj mentorici prof.dr.sc. Nataši Jovanov Milošević, koja me prihvatila u svoju radnu skupinu te mi bila velika podrška i savjetnik kroz cijelo vrijeme izrade ovog diplomskog rada.

Posebnu zahvalu upućujem i dr.sc. Sari Trnski, dr.vet.med. s kojom sam blisko surađivala cijeli ovaj period, uživo i online. Svojim strpljenjem i iznimnom spremnošću pomoći, Sara mi je bila velika potpora i usudila bih se reći da moj diplomski ne bi bio ovakav kakav je, da nije bilo nje.

Zahvalila bih se i ostatku tima na projektu BrainECM koji su me dočekali otvorenih ruku te mi kroz svoje savjete i strpljenje vodili kroz proces izrade ovog diplomskog rada, ali i pokazali mi pravo značenje rada na projektu i izrade znanstvenih radova.

Zahvalu zaslužuju i moja obitelj te prijatelji koji su mi bili iznimna podrška kroz ovo cijelo razdoblje, hrabreći me, bodreći i pružajući mi potporu.

Svima još jedno veliko HVALA !

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Glijalni fibrilarni kiseli protein (GFAP)	2
1.1.1. Izražaj GFAP-a i vizualizacija astrocita	4
1.2. Astrociti	6
1.2.1. Uloga astrocita	6
1.2.2. Oštećenja središnjeg živčanog sustava	9
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	11
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. Laboratorijske životinje	12
3.2. Postupci s tkivima	12
3.3. Mikroskopiranje	13
3.4. Fiji analiza	14
3.5. Statistička obrada podataka	18
4. REZULTATI	19
4.1. Kvalitativne promjene u izražaju GFAP u hipokampusu nakon perinatalne hipoksije u štakora	19
4.2. Kvantitativne promjene u izraženosti GFAP u hipokampusu nakon preinatalne hipoksije u štakora	20
4.3. Promjene u gustoći GFAP pozitivnih astrocita u hipokampusu štakora nakon perinatalne hipoksije	21
5. RASPRAVA	25
5.1. Izražaj GFAP⁺ astrocita i citoarhitektonika odraslog štakorskog mozga (P105) nakon kratkotrajne perinatalne hipoksije	26
5.2. Učinak kratkotrajne perinatalne hipoksije na izražaj GFAP⁺ astrocita u hipokampusu odraslog štakora	26
6. ZAKLJUČAK	28
7. LITERATURA	29
8. ŽIVOTOPIS	41

KRATICE:

CA1 – polje CA1 hipokampusa

CA2 – polje CA2 hipokampusa

eGFP – od engl. *enhanced green fluorescent protein*, pojačani zeleni fluorescentni protein

GABA – od engl. *gamma-aminobutyric acid*, gama-aminomaslačna kiselina

GFAP – od engl. *glial fibrillary acidic protein*, glijalni fibrilarni kiseli protein

IFs – od engl. *intermediate filaments*, intermedijarna filamentozna vlakna

IGFBP-6 – od engl. *insulin like growth factor binding protein 6*, inzulinu nalik čimbenik rasta receptor 6

IL-1 β – interleukin jedan beta

IL-6 – interleukin šest

ROI – regija od interesa

ROS – od engl. *reactive oxygen species*, reaktivne kisikove vrste

SŽS – središnji živčani sustav

TNF- α – od engl. *tumor necrosis factor alpha*, čimbenik nekroze tumora alfa

Wnt3 – pro-onkogeni protein Wnt3

1. UVOD

Kisik je nužan za gotovo sve oblike života na zemlji zbog svoje centralne uloge u metabolizmu (Yun i sur., 2002). Promjene u koncentraciji kisika, odnosno oksidativni stres, važan je fiziološki i patološki regulator koji potencijalno može utjecati na osnovne procese. Fluktuacije u razini kisika mogu djelovati na procese od embriogeneze i razvoja, preko održavanja normalnih funkcija i disfunkcija, pa sve do starenja i smrti (Zhu i sur., 2005). Hipoksija je pomanjkanje kisika u stanicama organizma, a uzrok je raskorak između potrebe stanica za kisikom i mogućnosti njegove dopreme stanicama u dovoljnim količinama ili (rijetko) mogućnosti iskorištenja u stanici (*Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*). Prisutna je za vrijeme ranog embrionalnog razvoja zbog toga što tijekom prvog tromjesečja trudnoće nije prisutna izražena endovaskularizacija te se zato placentarni razvoj odvija u blago hipoksijskim uvjetima (Genbacev 2001; Zhu i sur., 2005). U embriju štakora izmjerene su izrazito niske razine kisika 9,5 dana nakon snošaja (od lat. *dies post coitum*, dpc) (Mitchell i Yochim, 1968; Zhu i sur., 2005). Ljudski embrio također se nalazi u okolišu niske koncentracije kisika, gdje zasićenost s kisikom iznosi oko 3 % (Rodesch i sur., 1992; Zhu i sur., 2005).

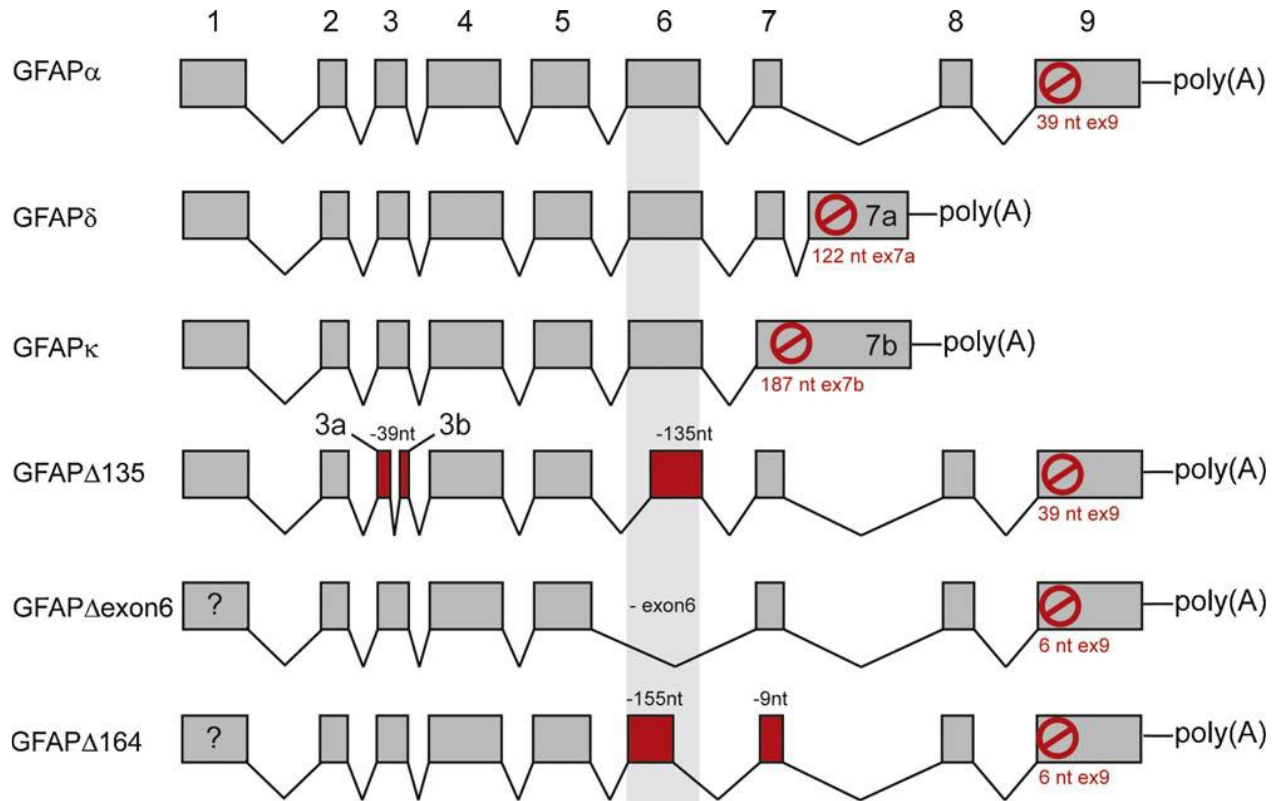
In vivo istraživanja u kojima su praćeni biljezi hipoksije, potkrijepila su hipotezu o hipoksijskom mikro okolišu tijekom embrionalnog razvoja. Imunoreaktivnost biljega hipoksije bila je izrazito visoka u razvijajućoj neuralnoj tubi, srcu i intersomitskom mezenhimu tijekom rane faze organogeneze (Lee i sur., 2001; Zhu i sur., 2005). Ipak, pretjerana izloženost fetusa hipoksijskim uvjetima, uslijed izloženosti majke, utječe na funkcionalnost mozga takvih jedinki u odrasloj dobi. Navedeno su dokazali i Wang i sur. (2010) u svome pokusu s gravidnim Sprague-Dawley ženkama (Wang i sur., 2010). Hipoksija nije samo prisutna u embrionalnom mozgu već i u zreлом mozgu, što je dokazano korištenjem mikro elektroda i mjerenjem razine kisika u pojedinim regijama mozga štakora. Rezultati su pokazali raznoliku zasićenost kisika u regijama, pri čemu je siva tvar imala najveći postotak kisika, dok je u moždanom deblu, odnosno mostu (lat. *pons*) i svodu (lat. *fornix*) zabilježena najmanja koncentracija kisika. Između ovih vrijednosti nalaze se i bijela tvar, korteks te hipotalamus i hipokampus (Silver i Erecińska, 1998; Zhu i sur., 2005).

Animalni modeli služe za oponašanje bolesti koje zahvaćaju ljude, a posljedica su hipoksije moždanog tkiva. Razlikujemo animalne modele bazirane na općoj ishemiji, koji imitiraju posljedice srčanog zastoja ili okluzije koronarnih arterija kod ljudi. Nasuprot toga, animalni modeli bazirani na ciljanoj ishemiji imitiraju posljedice moždanog udara (Zhu i sur., 2005). Ozljeda nastala uslijed hipoksije dovodi do aktivacije mikroglije, nakon čega slijedi oslobađanje upalnih medijatora što uključuje i interleukin 1 beta (IL-1 β) te čimbenik nekroze tumora alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- α). Antagonisti IL-1 β receptora pokazali su terapijski učinak na smanjenje koncentracije IL-1 β kod mladunaca štakora nakon hipoksije (Hagan i sur., 1996; Teo i sur., 2015).

1.1. Glijalni fibrilarni kiseli protein (GFAP)

Glijalni fibrilarni kiseli protein (engl. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP) pripada obitelji intermedijarnih filamentoznih vlakana (engl. *intermediate filaments*, IFs), koji zajedno s mikrotubulima i mikrofilamentima čine većinu citoskeleta eukariotskih stanica. IFs-ovi su dobili naziv zbog svojeg nitastog oblika i intermedijarnog promjera (8 – 12 nm) između tankih aktinskih niti (7 nm) i debljih mikrotubula (25 nm). Intermedijarni filamentozni proteini dijele se u 6 razreda na temelju homologije sekvenci, a GFAP zajedno s vimentinom, desminom i periferinom, klasificira se kao tip 3 intermedijarnog filamentoznog proteina (Middeldorp i Hol, 2011). Inicijalno se GFAP otkrio u mozgu pacijenata oboljelih od multiple skleroze gdje je bio ekstrahiran u svom pročišćenom obliku iz velikih sklerotskih plakova. Navedeni plakovi su se primarno sastojali od fibroznih astrocita i demijeliniziranih aksona (Eng i sur., 1971). Alternativno izrezivanje javlja se samo kod malog broja interfilamentoznih proteina, kao što su lamin A, periferin, sinemin te GFAP. Najbrojnija izoforma GFAP-a je alfa (α) izoforma, a ona je i ujedno prva identificirana. Ljudski GFAP gen je uspješno kloniran 1989. godine (Reeves i sur., 1989) te je mapiran na kromosomu 17q21 (Bongcam-Rudloff i sur., 1991). U ljudskom živčanom sustavu detektiran je izražaj svih izoformi što je prikazano na slici 1. Iznimka je izoforma GFAP β koja je detektirana samo u živčanom sustavu štakora (Middeldorp i Hol, 2011). Condorelli i sur. objavili su potpunu sekvencu štakorskog GFAP gena, pri čemu su dokazali postojanje četvrtog GFAP transkripta tzv. GFAP δ .

Northern blot analiza sa specifičnim probama pokazala je postojanje mRNA (vel. 4.2 kb), što se poklapa s idejom da GFAP δ mRNA sadrži sve klasične GFAP eksone i još jedan dodatni tzv. 7+ ekson (Condorelli i sur., 1999.; Middeldorp i Hol, 2011).



Slika 1. Transkript ljudskih GFAP varijanti. Kvadratići prikazuju eksone koji se transkribiraju za različite izoforme. Terminalni kodon, označen crvenim prekrštenim krugom, lociran je na drugim mjestima u eksonu 9 i eksonu 7, ovisno o izoformi. Crveni kvadratići označuju eksone čiji su dijelovi obrisani (izrezani), što rezultira drugačijom varijantom. Slika preuzeta i izmijenjena prema Middeldorp i Hol, 2011.

Intermedijarni filamentozni proteini, pa tako i GFAP, dijele se na 3 osnovne domene, a to su: amino kraj tzv. "glava", središnji dio tzv. "tijelo" i karboksilni kraj tzv. "rep" (Reeves i sur., 1989.; Weber i Geisler, 1985.; Middeldorp i Hol, 2011). IFs se podvrgavaju različitim post-translacijskim promjenama koje imaju značajan učinak na njihovu strukturu i svojstva. Fosforilacija igra važnu ulogu u regulaciji, ali i slaganju i rastavljanju (proto)filamenata (Sihag i sur., 2007; Middeldorp i Hol, 2011).

Do sada je za GFAP identificirano ukupno 6 mjesta fosforilacije, ali istraživanja koja se baziraju na njihovom utjecaju na konačnu formu i funkciju samog GFAP-a su malobrojna. Poznato je da su fosforilacija i defosforilacija specifičnih aminokiselinskih ostataka u području "glave" uključene u regulaciju GFAP sastavljanja. Navedeno je važno za redistribuciju GFAP tijekom staničnog ciklusa (Ralton i sur., 1994; Middeldorp i Hol, 2011). Iako je domena "glave" jako polimorfna između vrsta, aminokiselinskih ostatci koji se fosforiliraju su izrazito konzervirani. Navedeno ukazuje na fiziološku važnost fosforilacije GFAP proteina. Većina mjesta fosforilacije prisutna su i u izoformama GFAP, pri čemu je za izoformu GFAP δ otkrivena i dodatna pozicija (Singh i sur., 2003; Middeldorp i Hol, 2011). Osim fosforilacije, druge post-translacijske promjene koje bi mogle utjecati na strukturu i svojstva GFAP su glikozilacija i citrulinacija (Korolainen i sur., 2005; Nicholas i sur., 2004; Middeldorp i Hol, 2011).

1.1.1. Izražaj GFAP-a i vizualizacija astrocita

Vimentin je glavni IFs neonatalnog mozga, dok je GFAP glavni kod zrelog mozga te zrelih astrocita (Middeldorp i Hol, 2011). U normalnim uvjetima GFAP se uparuje s vimentinom, ali to ko-sparivanje nije nužno potrebno za stvaranje GFAP filamenata. Navedeno je dokazano na vimentin knock-out miševima (Vim^{-/-}) gdje je uočena prisutnost GFAP filamenata. Razlika je ipak prisutna jer navedeni GFAP filamentu nisu imali normalni izgled već su bili 60 – 70 % gušće složeni negoli kod normalnog slaganja s vimentinom (Quinlan i Franke, 1983; Middeldorp i Hol, 2011). Transmisijskom elektronskom mikroskopijom GFAP knock-out miševa (GFAP^{-/-}) pokazalo se da je količina IFs smanjena. Odnosno, za uspješnu polimerizaciju vimentina u nereaktivnim astrocitima potreban je GFAP (Eliasson i sur., 1999; Pekny i sur., 1998a; Middeldorp i Hol, 2011). Klasično se GFAP koristi kao biljeg za astrocite, a poznato je da se njegov izražaj povećava kod oštećenja mozga ili tijekom degeneracije središnjeg živčanog sustava (SŽS). Osim u navedenim patološkim stanjima, izražaj GFAP-a je u normalnim fiziološkim uvjetima povećan u zreлом mozgu, u usporedbi s mladim odnosno juvenilnim mozgom (Middeldorp i Hol, 2011). Velik broj znanstvenika u svojim istraživanjima koristi GFAP protutijela za vizualizaciju astrocita. Ovim pristupom vizualiziraju se stanice zvjezdaste morfologije koje su okarakterizirane kao zreli astrociti. Novije metode koriste se za bolju vizualizaciju morfologije samih astrocita, koja pri klasičnom korištenju GFAP protutijela ne dolazi do značajnog izražaja.

Neki od novijih pristupa baziraju se na sintezi pojačanog zelenog fluorescentnog proteina (engl. *enhanced green fluorescent protein*, eGFP) koji je pod utjecajem GFAP promotora (Nolte i sur., 2001; Suzuki i sur., 2003; Middeldorp i sur., 2011). Originalno se mislilo da je GFAP specifičan samo za astrocite, ali istraživanja su pokazala njegovu prisutnost i u perifernim glija stanicama, uključujući i enteričke glije i Schwannove stanice. Osim u SZS-u, izražaj ovog proteina prisutan je i u ne-živčanom tkivu (Eng i sur., 1971; Kato i sur., 1990; Bianchini i sur., 1992; Hainfellner i sur., 2001; Middeldorp i Hol, 2011).

Regulacija izražaja GFAP-a je iznimno složena, pri čemu na njegov izražaj utječu razni čimbenici kao što su ozljeda moždanog tkiva i razne bolesti. Također je dokazano i djelovanje cirkadijanog dnevno-noćno ritma na fluktuaciju GFAP- α (Eng i sur., 2000; Hajos, 2008; Middeldorp i Hol, 2011). Početni izražaj GFAP-a u razvijajućem ljudskom mozgu započinje u radijalnim glija stanicama. To su posebne bipolarne stanice u ventrikularnoj zoni koje eksprimiraju vimentin i nestin, a igraju ulogu u neuralnim stem stanicama (Götz i sur., 2002; Hartfuss i sur., 2001; Malatesta i sur., 2000; Noctor i sur., 2002; Middeldorp i Hol, 2011). Točan trenutak u kojem započinje izražaj GFAP proteina ipak nije sasvim jasan. Brojna istraživanja na tom području rezultirala su izrazito šarolikom rezultatima. Neka istraživanja pokazuju početak izražaja GFAP-a u 9. – 12. gestacijskom tjednu (Antanitus i sur., 1976; deAzevedo i sur., 2003; Honig i sur., 1996; Messam i sur., 2002; Middeldorp i sur., 2010; Simonati i sur., 1997; Stagaard i Mollgard, 1989), dok druga tek od 14. – 25. gestacijskog tjedna (Aquino i sur., 1996; Middeldorp i sur., 2010; Sarnat, 1992; Sasaki i Maruyama, 1994). Razlika u rezultatima može se pripisati različitim regijama koje su istraživane, drugačijim primarnim protutijelima te metodama bojenja. Sve navedeno ima velik utjecaj na sam ishod eksperimenta, ali također se poboljšavalo tijekom godina.

Izražaj GFAP-a, mjereno prema mRNA i koncentraciji proteina, progresivno se povećava s godinama, kako kod ljudi tako i kod laboratorijskih glodavaca (Goss i sur., 1991; Morgan i sur., 1997, 1999; Nicholas i sur., 1993; Middeldorp i sur., 2011). Navedeno povećanje izražaja GFAP-a tijekom starenja rezultat je povećane transkripcije GFAP-a, što se dokazalo i *in situ* hibridizacijom korištenjem cRNA proba (Morgan i sur., 1997, 1999; Middeldorp i sur., 2011). Povećanje veličine samih astrocita, zajedno s povećanjem izražaja GFAP, indikatori su reaktivne gliolize. Reaktivna glioliza je proces koji se znatno povezuje s ozljedom moždanog tkiva, ali i starenjem. Različiti dijelovi mozga su različito izloženi ovim procesima, a među najviše zahvaćenima je hipokampus (Middeldorp i sur., 2011).

Razlike u izražaju GFAP, koje se odvijaju tijekom razvoja i starenja mozga, indikatori su različitih funkcija astrocita te promjene istih tijekom vremena. Promjene u izražaju GFAP-a mogu utjecati na morfologiju samih astrocita što bi indirektno moglo utjecati i na druge tipove stanica i samu strukturu mozga (Middeldorp i sur., 2011). Istraživanja su ukazala da GFAP utječe na staničnu pokretljivost i migraciju, ali u kojoj mjeri on doprinosi fiziološkim ili patološkim funkcijama u različitim sub-populacijama astrocita, nije još poznato (Middeldorp i sur., 2011). *In vitro* istraživanja pokazala su da promjena u izražaju GFAP-a utječe na proliferaciju i druge transformacije astrocita. Navedeno vrijedi i za transgenične i GFAP mutante astrocita, gdje su u oba slučaja zabilježeni poremećaji u rastu stanica u kulturi. Uzrok ovog fenomena vjerojatno je kombinacija čimbenika kao što su povećanje razine stanične smrti i smanjena sposobnost proliferacije (Messing i sur., 1998).

1.2. Astrociti

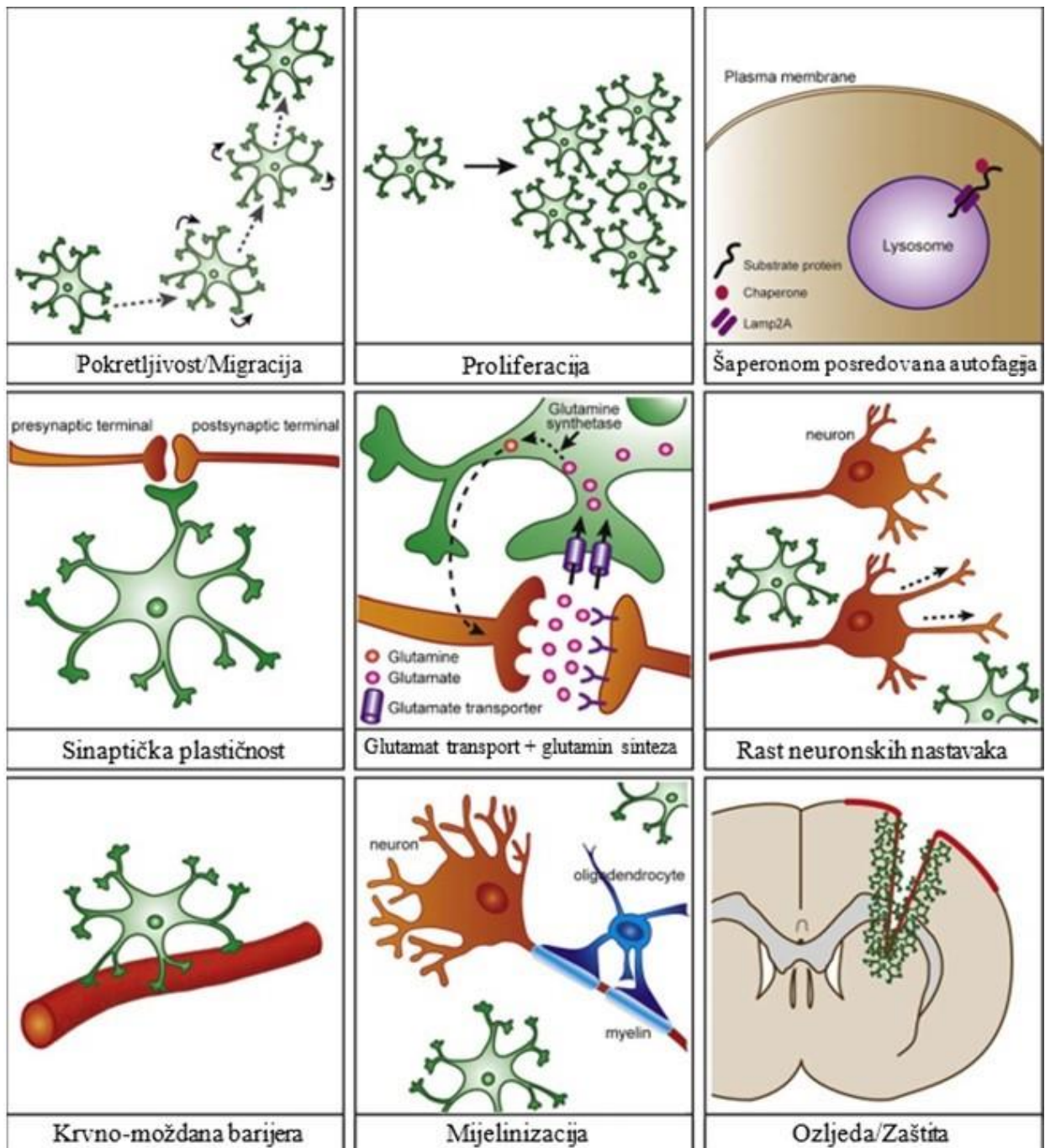
Proteklih godina velik broj istraživanja na tematiku astrocita i GFAP-a doprinio je širenju znanja o stvarnoj ulozi astrocita u normalnoj funkciji živčanog sustava. Neke od tih funkcija su: indukcija i reguliranje protoka krvi kroz krvno-moždanu barijeru; zaštita neurona od prevelike razine neurotransmitera; promoviranje sinaptičke plastičnosti; koordinacija neuronske aktivnosti. U svrhu ovih istraživanja stvoreno je i nekoliko mišjih modela koji nemaju GFAP (Gomi i sur., 1995; Liedtke i sur., 1996; McCall i sur., 1996; Pekny i sur., 1995) ili u kojima je prekomjeren izražaj GFAP-a (Messing i sur., 1998).

1.2.1. Uloga astrocita

Astrociti kroz različite mehanizme oslobađaju razne gliotransmitere kao što su klasični transmiteri, peptidi, kemokini i citokini (Halassa i Haydon, 2010; Middeldorp i sur., 2011). Veliki broj dokaza prikupljenih od strane različitih skupina znanstvenika ukazali su na veliki doprinos astrocita za funkcioniranje neurona. Astrociti reguliraju i sudjeluju u procesima kao što su formiranje sinapsi i plastičnosti, energetske i redoks metabolizmu. Nadalje, pomažu u održavanju sinaptičke homeostaze neurotransmitera i iona, ali i aktivno sudjeluju u prijenosu i skladištenju sinaptičkih informacija (Perea i Araque, 2007; Middeldorp i sur., 2011).

Egzocitoza je proces u kojem važnu ulogu imaju mikrotubuli i aktinski filamenti. Međutim, daljnja istraživanja su pokazala da opća depolimerizacija svih oblika IFs također utječe na mobilnost samih vezikula (Potokar i sur., 2007). Također, pokazalo se da poremećaj u mreži IFs smanjuje i dužinu samih vezikula te posljedično smanjuje njihovu mobilnost (Stenovec i sur., 2007; Potokar i sur., 2008). Specifični utjecaj GFAP-a na transport vezikula nije dokazan jer se istraživanje provelo na knock-out miševima koji, osim nefunkcionalnog GFAP gena, nisu imali ni funkcionalni gen za vimentin (Potokar i sur., 2010). Za točniji prikaz uključenosti GFAP-a u vezikularni transport potrebno je provesti istraživanje na animalni modelima koji jedino imaju nefunkcionalni gen za GFAP, dok funkcionalnost ostalih gena ostaje očuvana. Bandyopadhyayh i sur. (2010) pokazali su važnost GFAP-a u regulaciji šaperonom-posredovane autofagije (engl. *chaperone-mediated autophagy*, CMA), selektivnog procesa razgradnje proteina unutar lizosoma, u kojem GFAP služi kao negativni regulator (Bandyopadhyayh i sur., 2010).

Novija istraživanja na reaktivnim astrocitima dodatno podupiru hipotezu o ulozi GFAP-a u sinaptičkom formiranju. Ko-kulture neurona i astrocita pokazale su znatno smanjen broj sinaptičkih kontakata između reaktivnih astrocita i neurona, u usporedbi s manje reaktivnim astrocitima i neuronima (Emirandetti i sur., 2006). Astrociti se smatraju dominantnim tipom stanica odgovornih za unos glutamata koji se potom metabolizira u glutamin, a koji je pak važan supstrat za sintezu glutamata i gama-aminomaslačne kiseline (engl. *gamma-aminobutyric acid*, GABA) (Bak i sur., 2006). Istraživanjima se otkrila uloga GFAP-a u izražaju različitih glutamatnih transportera te time u regulaciji samog metabolizma glutamata (Hughes i sur., 2004; Sullivan i sur., 2007). Dokazan je i utjecaj GFAP-a na aktivnost glutamin sintaze, pri čemu smanjen izražaj GFAP-a korelira s povećanom aktivnosti glutamin sintaze (Weir i Thomas, 1984). Smanjena razina GFAP-a korelira pak sa smanjenom razinom glutamata i promjenom u omjeru glutamat-glutamin (Lieth i sur., 1998). Slika 2 shematski prikazuje stanične procese u živčanom sustavu u kojima je dokazana prisutnost i važnost GFAP-a.



Slika 2. Shematski prikaz staničnih procesa u kojima je prikazana uloga GFAP-a. Slika preuzeta i izmijenjena prema: Middeldorp i Holl, 2011.

1.2.2. Oštećenja središnjeg živčanog sustava

Različiti oblici oštećenja SŽS-a, kao što je mehanička ozljeda, dovode do glijalne reakcije s visokim izražajem GFAP-a i vimentina, a s vremenom i do stvaranja glijalnog ožiljka (Eddleston i Mucke, 1993). Ozljeda može biti i ishemijskog tipa, odnosno smanjen protok krvi do tkiva uzrokuje smanjenu opskrbljenost tkiva s kisikom. Nawashiro *i sur.* (2000) pokazali su da izražaj GFAP-a i astrociti imaju važnu ulogu u progresiji oštećenja tkiva za vrijeme ishemije s djelomičnom reperfuzijom, odnosno povratkom cirkulacije (Nawashiro *i sur.*, 2000). Gubitak piramidalnih neurona u hipokampusu GFAP^{-/-} miševa nakon ishemijske ozljede ukazuje na povećanu neuralnu smrt kao posljedicu nedostatka GFAP-a prilikom ozljede (Tanaka *i sur.*, 2002). Pokazalo se da je hipokampus, posebice polje CA1, osjetljivije na hipoksijsku ozljedu negoli polje CA3 ili *gyrus dentatus* (Maiti *i sur.*, 2007; Hota *i sur.*, 2007; Dheer *i sur.*, 2018). Kao odgovor na bilo koju ozljedu SŽS-a, astrociti mijenjaju svoje karakteristike i dolazi do njihove hipertrofije. Navedeni fenomen često se naziva "reaktivna gliozna" (Middeldorp *i sur.*, 2011). Dobro poznata karakteristika reaktivnih astrocita je povećana produkcija IFs što rezultira i povećanim izražajem GFAP, ali i vimentina i nestina (Pekny i Pekna, 2004). Uloga astrocita je i u uklanjanju viška glutamata i natrijevih iona na mjestu ozljede moždanog tkiva, čime omogućuju zaštitu i preživljavanje neurona (Navarrete i Araque, 2008; Zhang *i sur.*, 2017). Sekretijom pro-onkogenog proteina Wnt3 (Wnt3), interleukina 1 (IL-1), interleukina 6 (IL-6), inzulinu nalik čimbenik rasta receptor 6 (engl. *insulin like growth factor binding protein 6*, IGFBP-6) i drugih supstanci, promoviraju kolonizaciju stem stanica stvarajući tako pogodan mikro okoliš za regeneraciju živčanog tkiva (Barkho *i sur.*, 2006; Zhang *i sur.*, 2017).

Povećanje razine GFAP mRNA primijećena je i kod nekih neuralnih bolesti kao što su Alzheimerova bolest, grebež ovaca (*scrapie*) i Creutzfeldt-Jacob-ova bolest (Middeldorp *i sur.*, 2011). Hol *i sur.* (2003) proveli su istraživanje prisutnosti pogrešnog čitanja GFAP-a na molekularnoj razini kod Alzheimerove bolesti i Down sindroma. Otkrili su izražaj GFAP-a s pomakom u okviru čitanja, tzv. GFAP+1. Navedeni pomak pronađen je u neuronima i astrocitima hipokampusa pacijenata koji boluju od Alzheimer, Down sindroma i također epileptičnih pacijenata (Hol *i sur.*, 2003; Middeldorp i Hol, 2011). Druge vrste ozljeda, kao što su cerebrovaskularne nesreće, ubodne rane ili drugi oblici lezija, također se povezuju s povećanom razinom izražaja GFAP. Animalni modeli multiple skleroze i eksperimentalno izazvani alergijski

encefalomijelitisi, između ostalog su također stanja povećane razine izražaja GFAP (Eng i Ghirnikar, 1994).

Povećan izražaj GFAP jedan je od najvažnijih biljega aktivacije astrocita (Pekny i Pekna, 2004). Uzgojem astrocita i neurona u kulturi pokazalo je da inhibicija produkcije GFAP-a omogućuje rast aksona neurona unutar lezije nastale nakon ozljede, što je u normalnim uvjetima izražaja GFAP-a onemogućeno uslijed hipertrofije astrocita (Lefrançois i sur., 1997; Zhang i sur., 2017). Aktivacija astrocita i izražaj GFAP-a inhibira upalni odgovor nakon ozljede, što posljedično efektivno ograničava oštećenje unutar regije mozga (Cheon i sur., 2016; Zhang i sur., 2017). Animalni modeli GFAP i vimentin knock-out miševa pokazali su da nakon ishemičnog moždanog udara GFAP^{-/-} i Vim^{-/-} jedinke imaju veću površinu oštećenog tkiva negoli kontrolne jedinke. Isto tako, glukoza i kisik deprivacijski model (engl. *glucose and oxygen deprivation model*, GOD) ishemijske ozljede pokazao je nakupljanje reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) kod transgeničnih miševa u puno većoj koncentraciji negoli kod kontrolnih jedinki. Navedeno sugerira da GFAP ima važnu ulogu u redukciji oksidativnog stresa i ozljede nastale iz njega (de Pablo i sur., 2013; Zhang i sur., 2017).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Istraživanja izražaja GFAP-a nakon dugotrajne i/ili jake hipoksijske ozljede ukazuju na povećani izražaj GFAP-a kod hipoksijskih jedinki u usporedbi s kontrolnim jedinkama. Povećana razina izražaja GFAP-a rezultat je povećane aktivacije i broja astrocita, kao odgovor tkiva na ozljedu hipoksijom (Pekny i Pekna, 2004; Middeldorp i Hol, 2011; Zhang i sur., 2017; Dheer i sur., 2018). Događa li se sličan učinak samo nižeg intenziteta nakon umjerene perinatalne hipoksije nije istraženo.

Cilj ovog pilot istraživanja i diplomskog rada je utvrditi izražaj GFAP-a u hipokampusu odrasla štakora nakon umjerene perinatalne hipoksije.

Hipoteza je: Izražaj GFAP-a je povišen u hipokampusu štakora odrasle dobi nakon umjerene perinatalne hipoksije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Laboratorijske životinje

U ovom istraživanju korišteno je osam mozгова štakora – četiri kontrolna i četiri perinatalno podvrgnuta kratkotrajnoj hipoksiji prema protokolu opisanom u Trnski i sur. (2022). Ukupno je odabrano 24 koronarna reza telencefalona ženki Wistar Han (RccHan:WIST) štakora postnatalnog dana 105 (P105). Svaka životinja predstavljena je s po tri reza, tj. ukupno 12 rezova po grupi životinja. Rezovi su odabrani po kriteriju da mogu biti međusobno usporedivi unutar i između skupina. Struktura telencefalona odabrana za analizu bio je hipokampus u stereotaksijskim koordinatama od bregma - 3,12 mm do bregma - 4,36 mm, prema atlasu Paxinos i Watson (Paxinos i Watson, 2007). Razlog odabira hipokampusa je njegova morfološka očuvanosti na rezovima.

3.2. Postupci s tkivima

Histološki parafinski koronarni rezovi debljine 14 µm podvrgnuti su imunofluorescentnoj metodi obilježavanja prema protokolu i uputama laboratorija za imunohistokemiju. Prvi korak protokola bio je deparafinizacija i rehidracija rezova za što se koristio ksilen, potom 100 % etilni alkohol, 96 % etilni alkohol i u konačnici 70 % etilni alkohol. Rezovi su se uranjali u otopinu fosfatnog pufera (engl. *phosphate buffered saline*, PBS), nakon čega je slijedilo „kuhanje“ u tzv. „mikrovalnom puferu“ (engl. *microwave buffer*). Nakon kuhanja rezovi su isprani 10 minuta u PBS-u (1 x PBS; 0,1 M fosfatni pufer; pH = 7,2), uronjeni na 1 sat u otopinu za blokiranje koja sadrži normalni magareći serum, deterđent triton i PBS (5 % NDS; 0,5 % TRITON/PBS) pri sobnoj temperaturi, zatim inkubirani u otopini koja sadrži primarno protutijelo (Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP); Z0334; zečje poliklonalno; 1:1000; Agilent Dako; Santa Clara, Kalifornija, SAD) tijekom 24 sata pri + 4 °C. Sljedećeg dana rezovi su isprani 10 minuta u PBS-u (1 x PBS; 0,1 M fosfatni pufer; pH = 7,2) te inkubirani adekvatnim sekundarnim protutijelom (Alexa Fluor 546, Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody; A10040; Magareće anti-zečje,

IgG (H + L), poliklonalno; 1:1000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) tijekom 2 sata pri sobnoj temperaturi. Nakon toga rezovi su ponovno isprani 10 minuta u PBS-u (1 x PBS; 0,1 M fosfatni pufer; pH = 7,2).

Uz GFAP bojenje, uzorci su podvrgnuti i fluorescentnom Nissl bojenju. Rezovi su rehidrirani 40 minuta u PBS-u (1 x PBS; 0,1 M fosfatni pufer; pH = 7,2), zatim isprani 10 minuta u otopini koja sadrži PBS (1 x PBS; 0,1 M fosfatni pufer; pH = 7,2) i 0,1 % deterdžent triton te ponovo isprani 5 minuta u PBS-u (1 x PBS; 0,1 M fosfatni pufer; pH = 7,2). Rezovi su potom inkubirani s Nissl bojenjem (NeuroTrace 640/660 Deep-Red Fluorescent Nissl Stain - Solution in DMSO; N-21483; 1:150; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) tijekom 2 sata, isprani 10 minuta u otopini koja sadrži PBS (1 x PBS; 0,1 M fosfatni pufer; pH = 7,2) i 0,1 % deterdžent triton te ponovo isprani 2 x 5 minuta u PBS-u (1 x PBS; 0,1 M fosfatni pufer; pH = 7,2). Rezovi su pokriveni koristeći vodeno pokrivalo (VectaMount, H-5501-60, Vector Laboratories, SAD). Konačni korak za potpunu vizualizaciju astrocita bio je postavljanje pokrovnog stakalca i mikroskopiranje preparata.

3.3. Mikroskopiranje

Uspješnost bojenja procijenjena je pregledom preparata pomoću fluorescentnog mikroskopa, Olympus BX53 mikroskop (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Njemačka), 10x objektiv (UPlanXApo, NA 0,4). Uslijed greške prilikom bojenja i/ili oštećenosti samog tkiva, rezovi ženke F5T₃₁ nisu prošli gore navedeni kriterij te se nisu koristili za daljnju analizu. Isto tako, treći rez jedinke F7K₃₁ nije prošao gore navedenu selekciju te je stoga izuzet iz analize. Rezovi koji su zadovoljavali kriterij su dalje obrađeni korištenjem konfokalnog Olympus FV3000 mikroskopa (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Njemačka), 10x objektiv (UPlanSApo, NA 0,40), a digitalne fotografije snimljene pomoću CellSens programa (CellSens Dimension imaging software FV31S-SW) 2048 x 2048 piksel rezolucije. Prilikom izrade fotografija za opciju „Z stack“ odabran je broj pet, a faktor konverzije iznosio je 1,243 μm /pikselu. Navedeni faktor je korišten prilikom računanja površine regija od interesa (ROI) na fotografijama uzoraka. Svaka životinja predstavljena je s jednim stakalcem na kojem se nalaze 3 reza, a svaki rez reprezentiran je jednom digitalnom fotografijom. Konačni broj jedinki čiji su uzroci obrađeni iznosi sedam, 4

kontrolne jedinke i 3 jedinke perinatalno podvrgnute hipoksiji. Ukupan broj rezova iznosi 20, od čega 11 rezova pripada kontrolnoj skupini, a 9 rezova skupini podvrgnutoj hipoksiji.

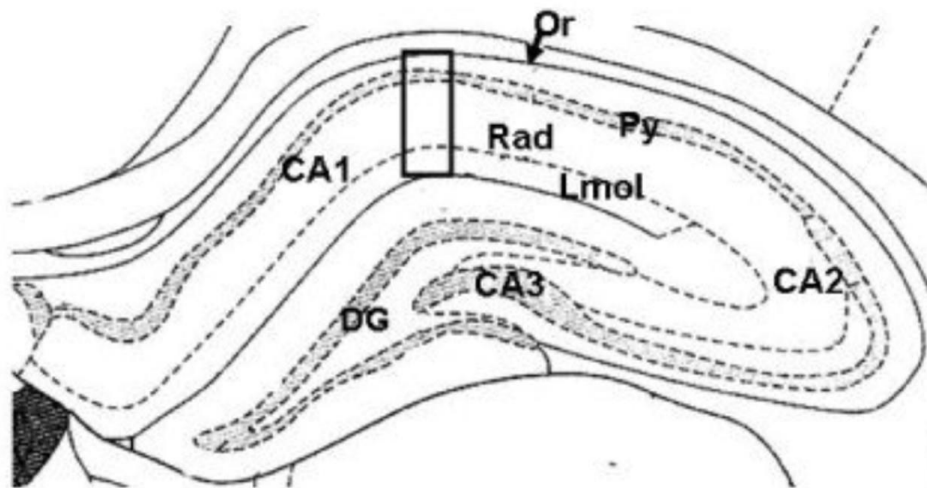
3.4. Fiji analiza

Fotografije rezova dobivene konfokalnim mikroskopom analizirane su korištenjem programa Fiji/ImageJ, dostupnog na stranici: <https://imagej.net/software/fiji/downloads>. Ukupan broj fotografija za analizu iznosio je 20. U svrhu izrade najtočnijeg protokola, sve fotografije su podvrgnute i ručnoj obradi, odnosno ručnom brojanju stanica. Fotografije dobivene konfokalnim mikroskopom bile su tzv. „crveno, zeleno, plavo“ formata (engl. „*red, green, blue*“, RGB) na kojima je vidljiv signal nastao dvostrukim bojenjem. Prvi korak analize fotografija je bio postavljanje pravilnog omjera dimenzija piksela i stvarnih dimenzija, za što se koristila opcija „*Analyze*“ – „*Set scale*“ i konverzijski faktor 1,243. Nakon toga uslijedilo je razdvajanje kanala u odvojene prikaze, za što je korištena opcija „*Image*“ – „*Color*“ – „*Split channel*“. Stvaraju se tri nova skočna prozora, unutar svakog se nalazi jedan kanal (engl. *channel*). Crveni kanal (engl. *red channel*) predstavlja GFAP bojenje i prikazuje astrocite, dok plavi kanal (engl. *blue channel*) predstavlja Nissl bojenje te prikazuje jezgre stanica i Nissl tjelešca. Zeleni kanal (engl. *green channel*) u ovom slučaju je nepostojeći te se kao takav prikazuje kao potpuno zacrnjena fotografija. Za daljnju analizu izražaja GFAP-a korišten je isključivo crveni kanal te su ostali skočni prozori ugašeni. Određeni broj fotografija, koje prikazuju GFAP obojene astrocite, analizirane su ručno i postavljen je odgovarajući protokol za njihovu analizu.

Protokol se sastojao od postavljanja odgovarajućeg „*Lookup table*“ (LUT), odnosno funkcije koja omogućuje promatraču bolju vizualizaciju i raspoznavanje pozadine od stanice od interesa. Odabrana je opcija „*ICA*“ zbog subjektivnog dojma, kako upravo ovaj LUT omogućuje najbolju vizualizaciju astrocita, ali i dostupne literature (Figueres-Oñate i López-Mascaraque, 2016; <https://forum.image.sc/>). Zatim je uslijedio korak postavljanja „*Threshold*“ opcije, ona predstavlja algoritam u kojem program razlučuje pozadinu od ciljanog objekta, na način da pikselima određene svjetline pripisuje brojčanu vrijednost. Odabrana je opcija „*Default*“, jer se ovaj pristup temelji na autonomnom programskom odabiru najboljeg raspona intenziteta piksela za svaku pojedinu fotografiju.

Navedeni pristup je izabran kako bi se smanjila subjektivna greška nastala od promatrača, ali i zbog velike raznolikosti između fotografija koja otežava korištenje jedinstvenoga *threshold*-a za sve. Postavljanjem *threshold*-a ponovno se dobiva crno-bijela fotografija u kojoj je objekt od interesa (astrociti) prikazan bijelo, a pozadina crno.

Ovakva fotografija je naizgled crno-bijela, ali je i dalje u 8-bitnoj formi, odnosno program ju registrira kao fotografiju u sivim tonovima. Sljedeći korak analize je bio prebacivanje fotografije u stvarnu crno-bijelu formu. Navedeno se postiglo korištenjem opcije „*Process*“ – „*Binary*“ – „*Convert to mask*“. Nakon što je fotografija bila spremna za analizu, bilo je potrebno odrediti regiju od interesa (tzv. ROI) unutar koje će se vršiti brojanje astrocita. Prilikom odabira lokacije ROI-a važni detalji bili su pravilna lokacija ROI-a unutar željene regije, ali isto tako i zahvaćenost svih slojeva stanica (slika 3). ROI su crtani u obliku trapeza i bili su približno iste površine te je svaki ROI na svim fotografijama bio postavljen približno na istoj lokaciji unutar željene regije (slika 4A i 4B). Zbog oštećenosti uzoraka u nekim slučajevima nije bilo moguće točno pozicioniranje ROI-a kao na ostalim uzorcima. Tada je ROI postavljen na najbliže moguće mjesto originalu, a pri čemu su se uspješno izbjegla oštećenja ili nepravilnosti.

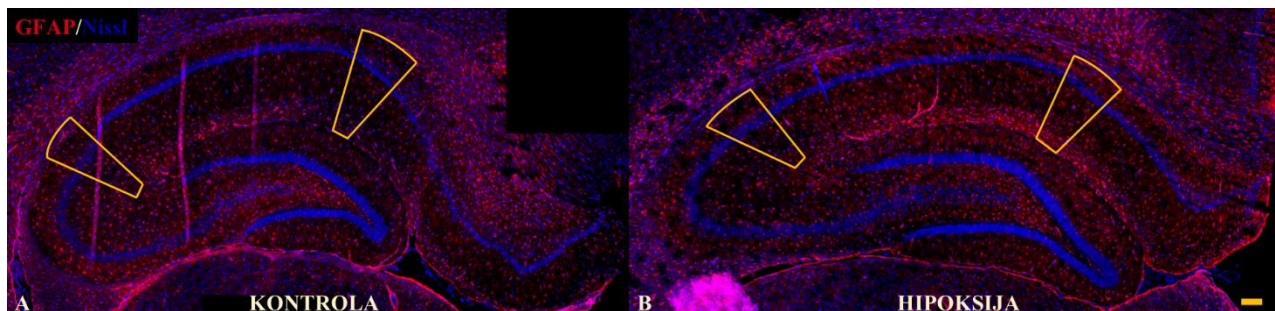


Slika 3. Shematski prikaz anatomске građe hipokampusa štakora s jasno naznačenim poljima (CA1, CA2, CA3, DG) te slojevima. CA1 – polje Amonovog roga 1 hipokampusa (engl. *field CA1 of the hippocampus*), CA2 – polje Amonovog roga 2 hipokampusa (engl. *field CA2 of the hippocampus*), CA3 – polje Amonovog roga 3 hipokampusa (engl. *field CA3 of the hippocampus*), DG – nazubljena vijuga (engl. *dentate gyrus*), Or – sloj, stratum oriens (lat. *stratum oriens*), Py – sloj, stratum pyramidale (lat. *stratum pyramidale*), Rad – sloj, stratum radiatum (lat. *stratum radiatum*), LMol – sloj, stratum lacunosum moleculare (lat. *stratum lacunosum moleculare*). Slika preuzeta i izmijenjena prema Yasuda i sur., 2011.

ROI se dodao pomoću opcije „*ROI Manager*“, nakon čega je slijedilo brojanje samih astrocita za što se koristila opcija „*Analyze particles*“. Postavljeni su sljedeći parametri: veličina čestice 15-*infinity*, opcija „*pixel units*“ treba biti označena. Veličina čestica odabrana je po principu pokušaj-pogreška, odnosno isprobavanjem različitih veličina i usporedbom sa manualnim brojkama. Cirkularnost postaviti na 0,00 – 1,00, pod opcijom „*Show*“ odabere se „*Overlay mask*“ prikaz. Od dodatnih opcija trebaju biti označene „*Display results*“ i „*Clear results*“, ostale kućice trebaju biti prazne. Rezultati se prikazuju na fotografiji koja je otvorena u programu i u obliku skočnog prozora gdje su izlistani brojevi i svojstva svake stanice. Rezultati su iz skočnog prozora prekopirani u Excel tablicu korištenjem opcije „*Ctrl – A*“ (kako bi se označili svi podatci) i „*Ctrl – C*“ + „*Ctrl – V*“ kako bi se kopirali i zalijepili u Excel dokument.

Budući da se protokol sastojao od velikog broja koraka, kako bi se analiza fotografija olakšala i ubrzala, proces se automatizirao korištenjem računalnog jezika „Macro“. Naredbe su glasile:

```
macro "Analiza... [g]" {  
  
run ("ICA");  
  
setAutoThreshold("Default dark");  
  
//run("Threshold...");  
  
//setThreshold;  
  
setOption("BlackBackground", true);  
  
run("Convert to Mask");
```



Slika 4. Prikaz označavanja regije od interesa (ROI) u hipokampusu odraslog štakorskog mozga (P105) nakon perinatalne hipoksije. U svrhu kvantitativne analize gustoće astrociti/mm² za polje CA1 i polje CA2, prikazani su reprezentativni trapezi u kontrolnoj (A) i hipoksijskoj (B) skupini te su kao takvi nacrtani na istim pozicijama i istih površina na ostalim fotografijama.

Gustoća astrocita po jedinici površine izračunata je dijeljenjem broja astrocita (dobivenog automatskim brojanjem) sa površinom ROI-a. Formula glasi:

$$\text{Gustoća stanica} = \frac{\text{Broj astrocita}}{\text{Površina ROI}}$$

Rezultati su prikazani u obliku tablice gdje je površina ROI-a prikazana u stupcu pod nazivom „Površina CA1“ i „Površina CA2“ te je u oba slučaja izražena u mm^2 . Gustoća stanica izražena je po mm^2 i nalazi se u stupcu „astrociti/ mm^2 CA1“ i „astrociti/ mm^2 CA2“.

3.5. Statistička obrada podataka

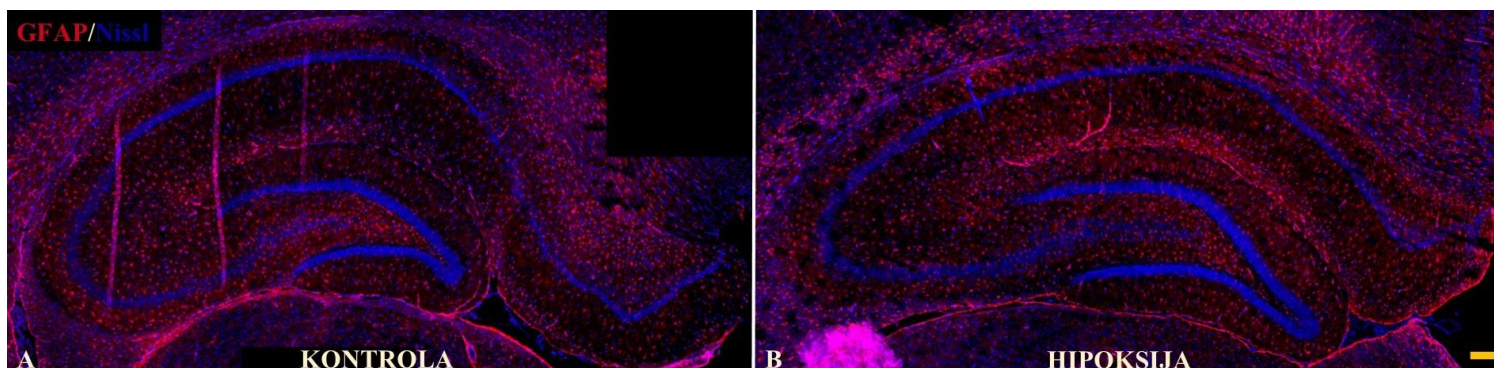
Za rezultate dobivene kvantifikacijom broja astrocita po mm^2 (N/mm^2) unutar polja CA1 i polja CA2 hipokampusa statistička analiza provedena je koristeći GraphPad Prism 9 statistički program (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, SAD). Uslijed malog broja uzoraka i nenormalne raspodjele podataka, za utvrđivanje utjecaja hipoksije na gustoću astrocita unutar polja CA1 i CA2 korišten je neupareni, neparametrijski Mann-Whitney test. Uspoređivane su gustoće astrocita, odnosno broj astrocita po mm^2 (N/mm^2) svih rezova unutar polja CA1 kontrolne i hipoksijske skupine te isto tako za polje CA2. Također, uspoređivani su medijani dobivenih vrijednosti N/mm^2 po životinji. Vrijednosti u tekstu izražene su kao medijan s interkvartilnim rasponom.

Za utvrđivanje omjera CA1/CA2 po rezu, dobiveni N/mm^2 po rezu u polju CA1 podijeljeni su s N/mm^2 u polju CA2. Isto tako, za utvrđivanje omjera CA1/CA2 po životinji, dobiveni medijani po životinji u polju CA1 podijeljeni su s medijanom dobivenim u polju CA2. Vrijednosti u tekstu izražene su kao medijan. Razina značajnosti u svim korištenim statističkim testovima postavljena je na 0,05 (tj., značajnom se smatrala p vrijednost $< 0,05$).

4. REZULTATI

4.1. Kvalitativne promjene u izražaju GFAP u hipokampusu nakon perinatalne hipoksije u štakora

Analizirani su koronarni rezovi hipokampusu, točnije polja CA1 i CA2 (slika 5). Kvalitativna analiza rezova hipokampusu obojenih Nissl bojenjem nije pokazala značajne razlike u citoarhitektonskim karakteristikama hipokampusu između kontrolne (slika 5A) i hipoksijske (slika 5B) skupine. Razlike između skupina bile su vidljive u GFAP bojenju, gdje su jedinke iz hipoksijske skupine (slika 5B) imale viši izražaj GFAP⁺ astrocita (slika 5A). Ovo opažanje potvrđeno je analizom gustoće astrocita po jedinici površine (mm²).



Slika 5. Prikaz dvostruko obilježenog reza koji prikazuje izražaj GFAP-a i fluorescentno obojenu Nisslovu tvar u hipokampusu odraslog štakorskog mozga (P105) nakon perinatalne hipoksije. Kvalitativnom analizom nisu zabilježene promjene u citoarhitektonici hipokampusu u hipoksijskih štakora (B) u usporedbi s kontrolnim (A), dok je za GFAP uočen viši izražaj kod hipoksijskih jedinki (B) u usporedbi s kontrolnim jedinkama (A).

4.2. Kvantitativne promjene u izraženosti GFAP u hipokampusu nakon preinatalne hipoksije u štakora

Ukupan broj fotografija podvrgnutih analizi u programu iznosi 20, a rezultati su prikazani u obliku tablice 1. Rezultati automatskog brojanja korištenjem protokola navedeni su u stupcu „Broj N“.

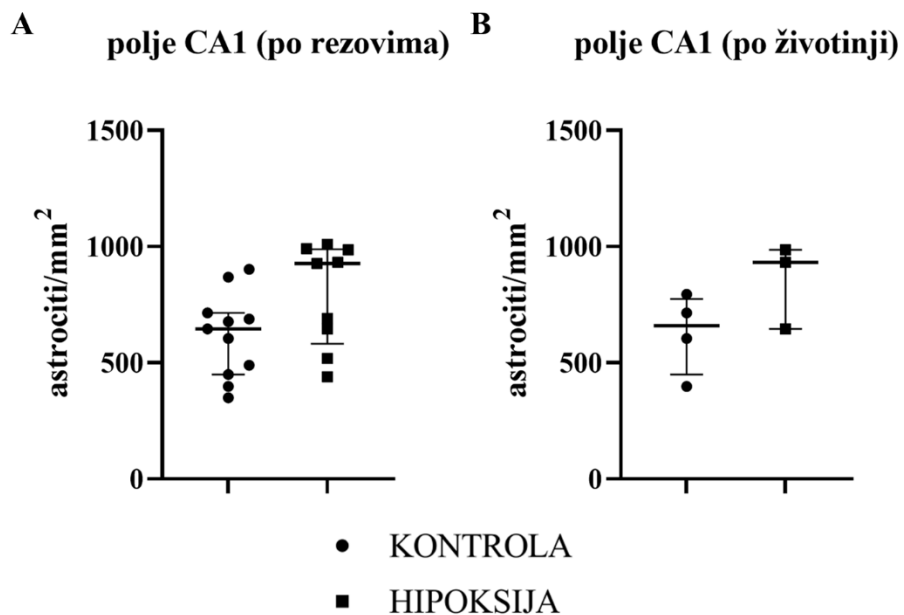
Tablica 1. Rezultati automatskog brojanja astrocita (Broj N) i gustoća po površini (astrociti/mm²) unutar CA1 i CA2 polja hipokampusu za kontrolne (oznaka „K“) i hipoksijske (oznaka „T“) jedinice.

Ime životinje	Broj N u CA1	Površina CA1 mm ²	astrociti/mm ² CA1	Broj N u CA2	Površina CA2 mm ²	astrociti/mm ² CA2	CA1/CA2
F5K 33_1	118	0.26266606	449.239625	81	0.163172625	496.4067962	0.904982825
F5K 33_2	90	0.25746388	349.563604	82	0.178975386	458.16356	0.762966841
F5K 33_3	104	0.26160924	397.539472	99	0.178343461	555.1086619	0.716147125
F7K 31_1	235	0.26068376	901.475423	97	0.178874958	542.2782545	1.662385344
F7K 31_2	169	0.24575858	687.666723	127	0.174193459	729.0744482	0.943205079
F8K 32_1	132	0.26947045	489.849627	143	0.176328717	810.9853144	0.604017876
F8K 32_2	154	0.25489755	604.164303	127	0.174465388	727.9380825	0.82996661
F8K 32_3	174	0.25695246	677.168054	135	0.165116297	817.605545	0.828233196
F9K 32_1	169	0.23659658	714.296045	143	0.182887554	781.9012113	0.913537458
F9K 32_2	194	0.22336168	868.546472	173	0.185047534	934.8949227	0.929031114
F9K 32_3	153	0.23716039	645.133037	101	0.173139736	583.3438489	1.105922412
F4T 30_1	252	0.25434597	990.776476	135	0.178094708	758.0236466	1.307052202
F4T 30_2	239	0.25789803	926.722846	130	0.164040942	792.4850858	1.169388374
F4T 30_3	257	0.26068376	985.868866	166	0.178874958	928.0225799	1.062332844

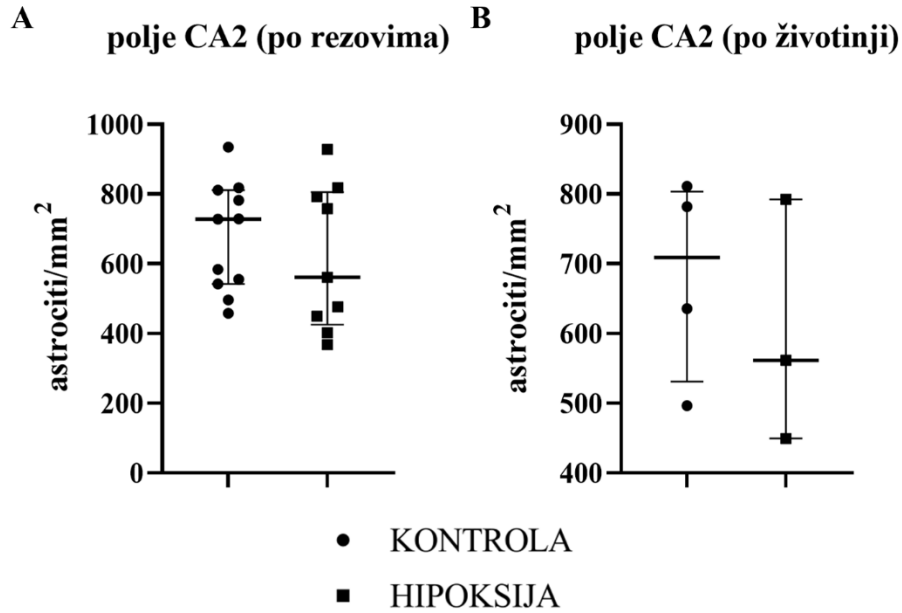
F6T 32_1	109	0.2482152 1	439.135052	81	0.18030258 3	449.244812	0.97749610 1
F6T 32_2	177	0.2564194 2	690.275326	71	0.17670416 4	401.8015105	1.71795104 7
F6T 32_3	151	0.2339451 4	645.45047	84	0.17622828 9	476.6544604	1.35412657 2
F7T 33_1	110	0.2121105 1	518.597601	56	0.15230166	367.6913305	1.41041563 3
F7T 33_2	244	0.2417847 2	1009.16221	93	0.16564779 3	561.4321707	1.79747841 5
F7T 33_3	216	0.2317867 1	931.891236	140	0.17109100 1	818.2779876	1.13884431 7

4.3. Promjene u gustoći GFAP pozitivnih astrocita u hipokampusu štakora nakon perinatalne hipoksije

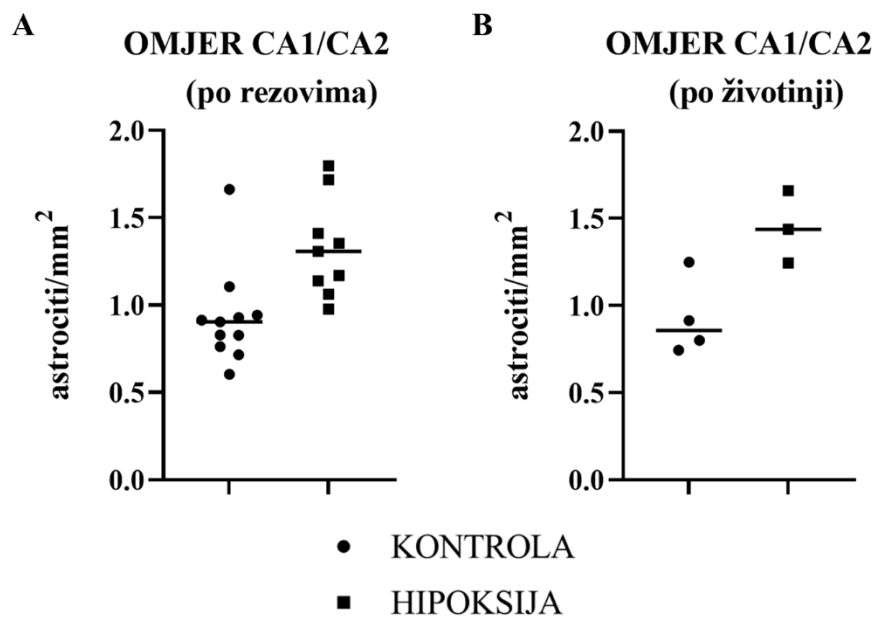
Kvantitativna analiza provedena neuparenim, neparametrijskim Mann-Whitney testom (gledano prema rezu), pokazala je nešto veći broj GFAP pozitivnih astrocita, tj. veću gustoću astrocita u jedinici površine (/mm²) u polju CA1 (p = 0,0562; slika 6A) u hipoksijskoj skupini. Analiza gustoće astrociti/mm² u polju CA1 (gledano po životinji) ne pokazuje statističku značajnost razlike (p = 0,2286; slika 6B) između hipoksijske i kontrolne skupine, ali je vidljiv trend većeg broja astrociti/mm² koji izražavaju GFAP u hipoksijskoj skupini. U polju CA2 (p = 0,5027; slika 7) nije nađena značajna razlika u gustoći astrociti/mm² između hipoksijske i kontrolne skupine, ali je uočen suprotan trend, niži broj astrocita po površini CA2 polja. Navedeno vrijedi i za gustoću astrociti/mm² u polju CA2 (gledano po životinji) gdje također nije uočena razlika (p = 0,6286; slika 7B) između hipoksijske i kontrolne skupine. Omjer CA1/CA2 dobivenih vrijednosti po rezovima, pokazao je da su u kontrolnoj skupini astrociti brojniji u polju CA2, dok je u hipoksijskoj skupini daleko veći broj astrocita u polju CA1 negoli u polju CA2 (slika 8A). Navedeni trend vidljiv je i nakon analize omjera CA1/CA2 dobivenih vrijednosti gustoće astrociti/mm² po životinji (slika 8B).



Slika 6. Kvantitativne razlike u gustoći astrociti/mm² u polju CA1 hipokampusa odraslog štakorskog mozga (P105) između kontrolne i hipoksijske skupine nakon perinatalne hipoksije, gledano po rezovima (11 kontrolnih i 9 tretmana) i po životinji (4 kontrole i 3 tretmana). Kvantitativni rezultati pokazuju tendenciju povećanja broja astrociti/mm² u polju CA1 u hipoksijskoj skupini u usporedbi s kontrolnom skupinom, gledano po rezovima (A). Podatci za gustoću astrociti/mm² u polju CA1 po životinji (B) pokazuju tendenciju povećanja gustoće astrociti/mm² u hipoksijskoj skupini, ali navedena razlika nije bila značajna. Vrijednosti na grafikonima izražene su kao medijan s interkvartilnim rasponom od 9 – 11 rezova po skupini (A), odnosno 3 – 4 životinje po skupini (B).



Slika 7. Kvantitativne razlike u gustoći astrociti/mm² u polju CA2 hipokampusa odraslog štakorskog mozga (P105) između kontrolne i hipoksijske skupine nakon perinatalne hipoksije, gledano po rezovima (11 kontrolnih i 9 tretmana) i po životinji (4 kontrole i 3 tretmana). U polju CA2 gledano po rezovima (A) nema razlike u gustoći astrociti/mm² između hipoksijske i kontrolne skupine. Navedeno vrijedi i za gustoću astrociti/mm² u polju CA2 po životinji (B) gdje također nije uočena razlika između hipoksijske i kontrolne skupine. Vrijednosti na grafikonima izražene su kao medijan s interkvartilnim rasponom od 9 – 11 rezova po skupini (A), odnosno 3 – 4 životinje po skupini (B).



Slika 8. Omjer dobivenih vrijednosti astrociti/mm² u poljima CA1 i CA2 hipokampusa odraslog štakorskog mozga (P105) između kontrolne i hipoksijske skupine nakon perinatalne hipoksije. Omjer CA1/CA2 dobivenih vrijednosti gustoće astrociti/mm² po rezovima (A) pokazuje da su u kontrolnoj skupini (11 rezova) astrociti nešto brojniji u polju CA2, dok je u hipoksijskoj skupini (9 rezova) daleko veći broj astrocita u polju CA1 negoli u polju CA2. Navedeno potvrđuje i omjer CA1/CA2 vrijednosti gustoće astrociti/mm² po životinji (4 kontrole i 3 tretmana) (B). Vrijednosti na grafikonima izražene su kao medijan od 9 – 11 rezova po skupini (A), odnosno 3 – 4 životinje po skupini (B).

5. RASPRAVA

Morfologija i funkcioniranje mozga je direktno povezano s njegovom staničnom građom i umreženosti, a navedeno se formira tijekom prenatalnog i postnatalnog razvoja. Štakorski mozak povećava svoju masu više od šest puta u periodu od rođenja do odrasle dobi. Dosadašnja pretpostavka je bila da dolazi do povećanja mase uslijed povećanja broja glija stanica i povećanja veličine postojećih neurona, ali bez nastanka novih neurona. Bandeira i sur., (2009) pokazali su da tijekom prvog postnatalnog tjedna rast mozga većinom je koreliran s povećanjem broja neurona koji su veće prosječne veličine. Drugi i treći tjedan pak korelira s povećanjem broja ne-neuralnih stanica koje su manje veličine nego već postojeći neuroni. Stoga, zaključuju da je razvoj postnatalnog mozga štakora okarakteriziran dramatičnim promjenama u staničnoj građi mozga, čiji rast je nadziran različitim kombinacijama dobivanja i gubitka stanica, ali isto tako i promjena u veličini stanica u prvim mjesecima nakon rođenja (Bandeira i sur., 2009). Prema tome, određivanje kako se tijekom razvoja mozga postiže konačna stanična građa i umreženost je izrazito važan korak prema razumijevanju kako mozak funkcionira (Bandeira i sur., 2009).

U ovom diplomskom radu istražen je utjecaj umjerene, kratkotrajne perinatalne hipoksije na izražaj GFAP-a u zreлом štakorskom mozgu (P105). Analizirana je gustoća GFAP⁺ astrocita (astrociti/mm²) između jedinki hipoksijske i kontrolne skupine. Podatci su prikupljeni na razini rezova, tri reza po jedinki, i na razini jedinice, 4 kontrolne i 3 hipoksijske jedinice. Većina dosada objavljenih istraživanja bila je usmjerena na proučavanja utjecaja teške hipoksije na promjenu u izražaju raznih biljega (NeuN, GFAP, Iba-1, itd.) i/ili promjenu brojnosti samih stanica (Jansen i Low, 1996; Cowell i sur., 2002; Sizonenko i sur., 2003). Iako korisni, modeli teške hipoksijske ili hipoksijsko-ishemijske ozljede mozga ne mogu simulirati suptilne promjene u brojnosti stanica i/ili izražajnosti proteina. Isto tako, zbog najčešće velikog opsega lezije koja zahvaća različite stanične populacije, a ponekad i razvojne procese, ovakvi modeli nisu uspješni u prikazivanju pojedinosti o selektivnoj ranjivosti pojedinih regija mozga. Zbog toga je ovaj diplomski rad proveden kao pilot istraživanje s ciljem otkrivanja prisutnosti suptilnih promjena u izražaju GFAP kao glavnog biljega astrocita. Rezultati ovog rada mogli bi se iskoristiti na moguća daljnja, veća istraživanja

potencijalnog utjecaja ovih suptilnih promjena na konačnu morfologiju, funkcionalnost mozga te bihevioralne promjene ovakvih jedinki.

5.1. Izražaj GFAP⁺ astrocita i citoarhitektonika odraslog štakorskog mozga (P105) nakon kratkotrajne perinatalne hipoksije

Provedeno dvostruko fluorescentno bojenje, korištenjem anti-GFAP protutijela i Nissl boje, prikazuje izražaj astrocita, a može se iskoristiti i za praćenje promjena u citoarhitekturi zahvaćenog područja. Nissl bojenje (Nissl, 1894) uobičajeno se koristi za praćenje morfologije i patologije SŽS-a (Kádár i sur., 2009; Pilati i sur., 2008). Mikroskopiranje korištenjem epifluorescentnog mikroskopa nije pokazalo vidljive patološke promjene u morfologiji stanica niti u jednom polju hipokampusa, a isto tako niti u jednom sloju stanica. Tome može biti razlog nedovoljan intenzitet i/ili trajanje hipoksijske ozljede kako bi se mogao stvoriti vidljivi utjecaj. Promatrajući intenzitet izražaja GFAP⁺ astrocita pod mikroskopom, vidljiva je tendencija k višem izražaju GFAP⁺ astrocita u hipoksijskoj skupini. Ovakvi rezultati sukladni su dosadašnjim istraživanjima izražaja GFAP nakon teških hipoksijskih ili hipoksijsko-ishemijskih ozljeda (Zimmer i sur., 1991; Burtrum i Silverstein, 1994; Kaur i sur., 2006; Zhang i sur., 2017). Navedeno nas vodi prema zaključku da i kratkotrajna perinatalna hipoksija uzrokuje povećanje u izražaju GFAP⁺ astrocita, što je kasnije i potvrđeno za određena polja, analizom gustoće astrocita.

5.2. Učinak kratkotrajne perinatalne hipoksije na izražaj GFAP⁺ astrocita u hipokampusu odraslog štakora

Kvalitativna analiza pokazala je trend višeg izražaja GFAP⁺ astrocita u jedinkama iz hipoksijske skupine u usporedbi s kontrolnom. Za potvrdu ovih rezultata kvalitativne analize provedena je i kvantitativna analiza. Astroцити se smatraju specijaliziranim stanicama zaduženim za detekciju smanjene razine kisika dostupnog u mozgu (Angelova i sur., 2015). Astroglia se uobičajeno smatra korisnim procesom jer omogućuje reoksidaciju i popravak tkiva. Ipak, u nekim slučajevima ona može biti štetna jer uzrokuje promjenu fenotipa astrocita iz "mirujućeg" u "reaktivni" oblik. Naveden reaktivni oblik rezultat je postupnih i kontinuiranih promjena od reverzibilnih promjena u izražaju gena pa do hipertrofije stanica i formiranja ožiljka (Pekny i Pekna, 2014; Sofroniew i Vinters, 2015). Coimbra-Costa i sur. (2021) pokazali su da je promjena

u fenotipu astrocita okarakterizirana i povećanjem izražaja GFAP proteina u hipokampusu, točnije u proučavanom polju CA1. Također, pokazali su i morfološke promjene u obliku hipertrofije "tijela" astrocita te smanjenje dužine astrocitnih nastavaka.

Dobiveni rezultati poklapaju se s dosadašnjom literaturom koja ukazuje da je polje CA1 hipokampusa osjetljivije na hipoksijsku ozljedu u usporedbi sa ostalim poljima hipokampusa (Gozal i sur., 2002; Kreisman i sur., 2000; Schmidt-Kastner i Freund, 1991; Schmidt-Kastner, 2015; Dheer i sur., 2018). Polje CA1 hipokampusa je najčešće i najosjetljivija struktura mozga, nakon čega ju prema osjetljivosti slijede neokorteks (lat. *neocortex*) i potom strijatum (lat. *striatum*). Razlog veće osjetljivosti polja CA1 na hipoksijsku ozljedu može se pripisati "neuralnim faktorima" ili alternativno objašnjenje su "vaskularni faktori" (Schmidt-Kastner, 2015). Kratkotrajne hipoksijske ozljede ne utječu na polje CA2, ali određena istraživanja pokazala su da ozljeda polja CA2 prethodi ozljedi polja CA1 (Schmidt-Kastner i Hossmann, 1988). Hipoksijska ozljeda može zahvatiti samo polje CA1 kada se radi o kratkotrajnoj ozljedi, ili se može proširiti iz polja CA1 prema polju CA2, pa čak i do polja CA3 u slučajevima teške hipoksijske ozljede (Schmidt-Kastner, 2015). Navedeno potvrđuje da je u ovom pilot istraživanju izazvana blaga perinatalna hipoksijska ozljeda, zbog čega nije zahvaćeno CA2 polje. Potencijalno daljnje istraživanje povećanjem broja životinja u eksperimentu te samim time i broja uzoraka, moglo bi pokazati statistički značajnu razliku u gustoći astrociti/mm² unutar polja CA1 i CA2 gledano i po rezu, ali i po životinji.

6. ZAKLJUČAK

Kvalitativna analiza pokazala je da kratkotrajna perinatalna hipoksija nije utjecala na normotipičnu citoarhitektoniku hipokampusa u zreлом štakorskom mozgu (P105) odraslih jedinki koje su perinatalno izložene hipoksiji. Pokazan je trend višeg intenziteta izražaja GFAP⁺ astrocita u jedinkama iz hipoksijske skupine u usporedbi s kontrolnom. Za potvrdu ovih rezultata kvalitativne analize provedena je kvantitativna analiza.

Rezultati kvantitativne analize pokazuju tendenciju k povećanom broju astrociti/mm² u polju CA1 hipoksijske skupine u usporedbi s kontrolnom. Rezultati gustoće astrociti/mm² za polje CA2 ne pokazuju razliku između hipoksijske i kontrolne skupine.

Izazvana kratkotrajna perinatalna hipoksija bila je blaga i uzrokovala je suptilne promjene koje se nisu mogle potvrditi kvantitativnom analizom. Ostaje otvoreno pitanje je li promjena morfologije GFAP imunoreaktivnih astrocita odgovor za kvalitativan utisak da je GFAP pozitivnih astrocita više u hipokampusu perinatalno hipokično ozlijeđenih štakora, a drugi bi odgovor mogao biti viši izražaj samog GFAP u stanicama bez povećanja broja i promjene morfologije, što će biti predmet daljnjeg istraživanja. Povećanje broja uzoraka potencijalno bi moglo dovesti do uočavanja statistički značajne razlike u gustoći astrociti/mm² CA1 polja hipoksijske skupine u usporedbi s kontrolnom.

7. LITERATURA

1. Angelova, P.R., Kasymov, V., Christie, I., Sheikhabaei, S., Turovsky, E., Marina, N., Korsak, A., Zwicker, J., Teschemacher, A.G., Ackland, G.L., Funk, G.D., Kasparov, S., Abramov, A.Y., i Gourine, A.V. (2015). Functional oxygen sensitivity of astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 35(29), 10460-10473.
2. Bak, L.K., Schousboe, A., i Waagepetersen, H.S. (2006). The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of neurochemistry*, 98(3), 641-653.
3. Bandeira, F., Lent, R., i Herculano-Houzel, S. (2009). Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(33), 14108-14113.
4. Bandyopadhyay, U., Sridhar, S., Kaushik, S., Kiffin, R., i Cuervo, A.M. (2010). Identification of regulators of chaperone-mediated autophagy. *Molecular cell*, 39(4), 535-547.
5. Barkho, B.Z., Song, H., Aimone, J.B., Smrt, R.D., Kuwabara, T., Nakashima, K., Gage, F.H., i Zhao, X. (2006). Identification of astrocyte-expressed factors that modulate neural stem/progenitor cell differentiation. *Stem cells and development*, 15(3), 407-421.
6. Bianchini, D., De Martini, I., Cadoni, A., Zicca, A., Tabaton, M., Schenone, A., Anfosso, S., Akkad Wattar, A.S., Zaccheo, D., i Mancardi, G. L. (1992). GFAP expression of human Schwann cells in tissue culture. *Brain research*, 570(1-2), 209-217.
7. Bongcam-Rudloff, E., Nistér, M., Betsholtz, C., Wang, J.L., Stenman, G., Huebner, K., Croce, C.M., i Westermark, B. (1991). Human glial fibrillary acidic protein: complementary DNA cloning, chromosome localization, and messenger RNA expression in human glioma cell lines of various phenotypes. *Cancer research*, 51(5), 1553-1560.
8. Burtrum, D., i Silverstein, F. S. (1994). Hypoxic-ischemic brain injury stimulates glial fibrillary acidic protein mRNA and protein expression in neonatal rats. *Experimental neurology*, 126(1), 112-118.
9. Cheon, S.Y., Cho, K.J., Song, J., i Kim, G.W. (2016). Knockdown of apoptosis signal-regulating kinase 1 affects ischaemia-induced astrocyte activation and glial scar formation. *European Journal of Neuroscience*, 43(7), 912-922.

10. Coimbra-Costa, D., Garzón, F., Alva, N., Pinto, T.C., Aguado, F., Torrella, J.R., Carbonell, T., i Rama, R. (2021). Intermittent hypobaric hypoxic preconditioning provides neuroprotection by increasing antioxidant activity, erythropoietin expression and preventing apoptosis and astrogliosis in the brain of adult rats exposed to acute severe hypoxia. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10), 5272.
11. Condorelli, D.F., Nicoletti, V.G., Barresi, V., Conticello, S.G., Caruso, A., Tendi, E.A., i Giuffrida Stella, A.M. (1999). Structural features of the rat GFAP gene and identification of a novel alternative transcript. *Journal of neuroscience research*, 56(3), 219-228.
12. Cowell, R.M., Xu, H., Galasso, J.M., i Silverstein, F. S. (2002). Hypoxic-ischemic injury induces macrophage inflammatory protein-1 α expression in immature rat brain. *Stroke*, 33(3), 795-801.
13. de Pablo, Y., Nilsson, M., Pekna, M., i Pekny, M. (2013). Intermediate filaments are important for astrocyte response to oxidative stress induced by oxygen–glucose deprivation and reperfusion. *Histochemistry and cell biology*, 140(1), 81-91.
14. Dheer, A., Jain, V., Kushwah, N., Kumar, R., Prasad, D., i Singh, S.B. (2018). Temporal and spatial changes in glial cells during chronic hypobaric hypoxia: role in neurodegeneration. *Neuroscience*, 383, 235-246.
15. Eddleston, M., i Mucke, L. (1993). Molecular profile of reactive astrocytes—implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience*, 54, 15–36.
16. Eliasson, C., Sahlgren, C., Berthold, C.H., Stakeberg, J., Celis, J.E., Betsholtz, C., Eriksson, J.E., i Pekny, M. (1999). Intermediate filament protein partnership in astrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 274(34), 23996-24006.
17. Emirandetti, A., Zanon, R.G., Sabha Jr, M., i de Oliveira, A.L.R. (2006). Astrocyte reactivity influences the number of presynaptic terminals apposed to spinal motoneurons after axotomy. *Brain research*, 1095(1), 35-42.
18. Eng, L., Vanderhaeghen, J.J., Bignami, A., i Gerstl, B. (1971). An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain research*, 28(2), 351-354.
19. Eng, L.F., i Ghirnikar, R.S. (1994). GFAP and astrogliosis. *Brain pathology*, 4(3), 229-237.
20. Eng, L.F., Ghirnikar, R.S., i Lee, Y.L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty one years (1969–2000). *Neurochemical research*, 25(9), 1439-1451.

21. Figueres-Oñate, M., i López-Mascaraque, L. (2016). Adult olfactory bulb interneuron phenotypes identified by targeting embryonic and postnatal neural progenitors. *Frontiers in neuroscience*, *10*, 194.
22. Genbacev, O. (2001). To proliferate or to divide-to be or not to be. *Early Pregnancy (Online)*, *5*(1), 63-64.
23. Gomi, H., Yokoyama, T., Fujimoto, K., Ikeda, T., Katoh, A., Itoh, T., i Itohara, S. (1995). Mice devoid of the glial fibrillary acidic protein develop normally and are susceptible to scrapie prions. *Neuron*, *14*(1), 29-41.
24. Goss, J.R., Finch, C.E., i Morgan, D.G. (1991). Age-related changes in glial fibrillary acidic protein mRNA in the mouse brain. *Neurobiology of aging*, *12*(2), 165-170.
25. Gozal, E., Gozal, D., Pierce, W.M., Thongboonkerd, V., Scherzer, J.A., R. Sachleben Jr, L., Brittan, K.R., Guo, S.-Z., Cai, J., i Klein, J.B. (2002). Proteomic analysis of CA1 and CA3 regions of rat hippocampus and differential susceptibility to intermittent hypoxia. *Journal of neurochemistry*, *83*(2), 331-345.
26. Hagan, P., Barks, J.D., Yabut, M., Davidson, B.L., Roessler, B., i Silverstein, F.S. (1996). Adenovirus-mediated over-expression of interleukin-1 receptor antagonist reduces susceptibility to excitotoxic brain injury in perinatal rats. *Neuroscience*, *75*, 1033-45.
27. Hainfellner, J.A., Voigtlander, T., Strobel, T., Mazal, P.R., Maddalena, A.S., Aguzzi, A., i Budka, H. (2001). Fibroblasts can express glial fibrillary acidic protein (GFAP) in vivo. *Journal of Neuropathology i Experimental Neurology*, *60*(5), 449-461.
28. Hajós, F. (2008). Changes in glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity reflect neuronal states. *Neurochemical research*, *33*(8), 1643-1650.
29. Halassa, M.M., i Haydon, P.G. (2010). Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annual review of physiology*, *72*, 335.
30. Hartfuss, E., Galli, R., Heins, N., i Götz, M. (2001). Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Developmental biology*, *229*(1), 15-30.
31. Healy, S., McMahon, J., i FitzGerald, U. (2018a). Seeing the wood for the trees: towards improved quantification of glial cells in central nervous system tissue. *Neural regeneration research*, *13*(9), 1520.

32. Healy, S., McMahon, J., Owens, P., Dockery, P., i FitzGerald, U. (2018b). Threshold-based segmentation of fluorescent and chromogenic images of microglia, astrocytes and oligodendrocytes in FIJI. *Journal of neuroscience methods*, 295, 87-103.
33. Herland, A., van derMeer, A.D., FitzGerald, E.A., Park, T.-E., Sleeboom, J.J., Ingber, D.E. (2016). Distinct contributions of astrocytes and pericytes to neuroinflammation identified in a 3D human blood-brain barrier on a chip. *PLoS One*, 11, e0150360.
34. Hol, E.M., Roelofs, R.F., Moraal, E., Sonnemans, M.A.F., Sluijs, J.A., Proper, E.A., de Graan, P.N., Fischer, D.F., i Van Leeuwen, F.W. (2003). Neuronal expression of GFAP in patients with Alzheimer pathology and identification of novel GFAP splice forms. *Molecular psychiatry*, 8(9), 786-796.
35. Hota, S.K., Barhwal, K., Singh, S.B., i Ilavazhagan, G. (2007). Differential temporal response of hippocampus, cortex and cerebellum to hypobaric hypoxia: a biochemical approach. *Neurochemistry international*, 51(6-7), 384-390.
36. *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. Pristupljeno 17. 8. 2022. <<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=25676>>.
37. Hughes, E.G., Maguire, J.L., McMinn, M.T., Scholz, R.E., i Sutherland, M.L. (2004). Loss of glial fibrillary acidic protein results in decreased glutamate transport and inhibition of PKA-induced EAAT2 cell surface trafficking. *Molecular brain research*, 124(2), 114-123.
38. Ingiosi, A.M., i Opp, M.R. (2016). Sleep and immunomodulatory responses to systemic lipopolysaccharide in mice selectively expressing interleukin-1 receptor 1 on neurons or astrocytes. *Glia*, 64(5), 780-791.
39. Jansen, E.M., i Low, W. C. (1996). Long-term effects of neonatal ischemic-hypoxic brain injury on sensorimotor and locomotor tasks in rats. *Behavioural brain research*, 78(2), 189-194.
40. Järlestedt, K., Rousset, C.I., Faiz, M., Wilhelmsson, U., Ståhlberg, A., Sourkova, H., Pekna, M., Mallard, C., Hagberg, H., i Pekny, M. (2010). Attenuation of reactive gliosis does not affect infarct volume in neonatal hypoxic-ischemic brain injury in mice. *PLoS one*, 5(4), e10397.
41. Joly, L.M., Mucignat, V., Mariani, J., Plotkine, M., i Charriaut-Marlangue, C. (2004). Caspase inhibition after neonatal ischemia in the rat brain. *Journal of Cerebral Blood Flow i Metabolism*, 24(1), 124-131.

42. Kádár, A., Wittmann, G., Liposits, Z., i Fekete, C. (2009). Improved method for combination of immunocytochemistry and Nissl staining. *Journal of neuroscience methods*, 184(1), 115-118.
43. Kalman, M., i Hajos, F. (1989). Distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in the rat brain. *Experimental brain research*, 78(1), 147-163.
44. Kato, H., Yamamoto, T., Yamamoto, H., Ohi, R., So, N., i Iwasaki, Y. (1990). Immunocytochemical characterization of supporting cells in the enteric nervous system in Hirschsprung's disease. *Journal of pediatric surgery*, 25(5), 514-519.
45. Kaur, C., Sivakumar, V., Zhang, Y., i Ling, E. A. (2006). Hypoxia-induced astrocytic reaction and increased vascular permeability in the rat cerebellum. *Glia*, 54(8), 826-839.
46. Korolainen, M.A., Goldsteins, G., Alafuzoff, I., Koistinaho, J., i Pirttilä, T. (2002). Proteomic analysis of protein oxidation in Alzheimer's disease brain. *Electrophoresis*, 23(19), 3428-3433.
47. Kreisman, N.R., Soliman, S., i Gozal, D. (2000). Regional differences in hypoxic depolarization and swelling in hippocampal slices. *Journal of neurophysiology*, 83(2), 1031-1038.
48. Lee, Y.M., Jeong, C.-H., Koo, S.-Y., Son, M.J., Song, H.S., Bae, S.-K., Raleigh, J.A., Chung, H.-Y., Yoo, M.-A., i Kim, K.-W. (2001). Determination of hypoxic region by hypoxia marker in developing mouse embryos in vivo: a possible signal for vessel development. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 220(2), 175-186.
49. Lefrançois, T., Fages, C., Peschanski, M., i Tardy, M. (1997). Neuritic outgrowth associated with astroglial phenotypic changes induced by antisense glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA in injured neuron-astrocyte cocultures. *Journal of Neuroscience*, 17(11), 4121-4128.
50. Liedtke, W., Edelmann, W., Bieri, P.L., Chiu, F.C., Cowan, N.J., Kucherlapati, R., i Raine, C.S. (1996). GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron*, 17(4), 607-615.
51. Lieth, E., Barber, A.J., Xu, B., Dice, C., Ratz, M.J., Tanase, D., i Strother, J.M. (1998). Glial reactivity and impaired glutamate metabolism in short-term experimental diabetic retinopathy. Penn State Retina Research Group. *Diabetes*, 47(5), 815-820.

52. Magdalena, G., Eva, H., i Paolo, M. (2002). Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice. *Brain Research Bulletin*, 57(6), 777-788.
53. Maiti, P., Singh, S.B., Muthuraju, S., Veleri, S., i Ilavazhagan, G. (2007). Hypobaric hypoxia damages the hippocampal pyramidal neurons in the rat brain. *Brain research*, 1175, 1-9.
54. Malatesta, P., Hartfuss, E., i Gotz, M. (2000). Isolation of radial glial cells by fluorescent activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development*, 127(24), 5253-5263.
55. McCall, M.A., Gregg, R.G., Behringer, R.R., Brenner, M., Delaney, C.L., Galbreath, E.J., Zhang, C.L., Pearce, R.A., Chiu, S.Y., i Messing, A. (1996). Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(13), 6361-6366.
56. Messing, A., Head, M.W., Galles, K., Galbreath, E. J., Goldman, J.E., i Brenner, M. (1998). Fatal encephalopathy with astrocyte inclusions in GFAP transgenic mice. *The American journal of pathology*, 152(2), 391.
57. Middeldorp, J., i Hol, E.M. (2011). GFAP in health and disease. *Progress in neurobiology*, 93(3), 421-443.
58. Mitchell J.A., i Yochim J.M. (1968). Intrauterine oxygen tension during the estrous cycle in the rat: its relation to uterine respiration and vascular activity. *Endocrinology*, 83, 701–715.
59. Morgan, T.E., Rozovsky, I., Goldsmith, S.K., Stone, D.J., Yoshida, T., i Finch, C.E. (1997). Increased transcription of the astrocyte gene GFAP during middle-age is attenuated by food restriction: implications for the role of oxidative stress. *Free radical biology and medicine*, 23(3), 524-528.
60. Morgan, T.E., Xie, Z., Goldsmith, S., Yoshida, T., Lanzrein, A.-S., Stone, D., Rozovsky, I., Perry, G., Smith, M.A., i Finch, C.E. (1999). The mosaic of brain glial hyperactivity during normal ageing and its attenuation by food restriction. *Neuroscience*, 89(3), 687-699.
61. Nakajima, W., Ishida, A., Lange, M.S., Gabrielson, K.L., Wilson, M.A., Martin, L.J., Blue, M.E., i Johnston, M.V. (2000). Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. *Journal of Neuroscience*, 20(21), 7994–8004.

62. Navarrete, M., i Araque, A. (2008). Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron*, 57(6), 883-893.
63. Nawashiro, H., Brenner, M., Fukui, S., Shima, K., i Hallenbeck, J.M. (2000). High susceptibility to cerebral ischemia in GFAP-null mice. *Journal of Cerebral Blood Flow i Metabolism*, 20(7), 1040-1044.
64. Nicholas, A.P., Sambandam, T., Echols, J.D., i Tourtellotte, W.W. (2004). Increased citrullinated glial fibrillary acidic protein in secondary progressive multiple sclerosis. *Journal of Comparative Neurology*, 473(1), 128-136.
65. Nichols, N.R., Day, J.R., Laping, N.J., Johnson, S.A., i Finch, C.E. (1993). GFAP mRNA increases with age in rat and human brain. *Neurobiology of aging*, 14(5), 421-429.
66. Nissl, F. (1894). Ueber eine neue Untersuchungsmethode des Centralorgans zur Feststellung der Localisation der Nervenzellen. *Neurologisches Centralblatt*, 13, 507-508.
67. Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Wong, W.S., Clinton, B.K., i Kriegstein, A.R. (2002). Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *Journal of Neuroscience*, 22(8), 3161-3173.
68. Nolte, C., Matyash, M., Pivneva, T., Schipke, C.G., Ohlemeyer, C., Hanisch, U.K., Kirchhoff, F., i Kettenmann, H. (2001). GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia*, 33(1), 72-86.
69. Northington, F.J., Zelaya, M.E., O’Riordan, D.P., Blomgren, K., Flock, D.L., Hagberg, H., Ferriero, D.M., i Martin, L.J. (2007). Failure to complete apoptosis following neonatal hypoxia–ischemia manifests as “continuum” phenotype of cell death and occurs with multiple manifestations of mitochondrial dysfunction in rodent forebrain. *Neuroscience*, 149(4), 822-833.
70. Nowicka, D., Rogozinska, K., Aleksy, M., Witte, O.W., i Skangiel-Kramska, J. (2008). Spatiotemporal dynamics of astroglial and microglial responses after photothrombotic stroke in the rat brain. *Acta Neurobiologiae Experimentalis (Wars)*, 68(2), 155–168.
71. Otsu, N. (1979). A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE transactions on systems, man, and cybernetics*, 9(1), 62-66.

72. Oudart, M., Tortuyaux, R., Mailly, P., Mazaré, N., Boulay, A. C., i Cohen-Salmon, M. (2020). AstroDot—a new method for studying the spatial distribution of mRNA in astrocytes. *Journal of cell science*, 133(7), jcs239756.
73. Paxinos, G., Watson, C. (2007). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates 6th ed. *Academic Press*, San Diego.
74. Pekny, M., Eliasson, C., Chien, C.L., Kindblom, L.G., Liem, R., Hamberger, A., i Betsholtz, C. (1998). GFAP-Deficient Astrocytes Are Capable of Stellationin VitroWhen Cocultured with Neurons and Exhibit a Reduced Amount of Intermediate Filaments and an Increased Cell Saturation Density. *Experimental cell research*, 239(2), 332-343.
75. Pekny, M., i Pekna, M. (2004). Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 204(4), 428-437.
76. Pekny, M., i Pekna, M. (2014). Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiological reviews*, 94(4), 1077-1098.
77. Pekny, M., Leveen, P., Pekna, M., Eliasson, C., Berthold, C.H., Westermark, B., i Betsholtz, C. (1995). Mice lacking glial fibrillary acidic protein display astrocytes devoid of intermediate filaments but develop and reproduce normally. *The EMBO journal*, 14(8), 1590-1598.
78. Perea, G., i Araque, A. (2007). Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science*, 317(5841), 1083-1086.
79. Pilati, N., Barker, M., Panteleimonitis, S., Donga, R., i Hamann, M. (2008). A rapid method combining Golgi and Nissl staining to study neuronal morphology and cytoarchitecture. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 56(6), 539-550.
80. Potokar, M., Kreft, M., Li, L., Daniel Andersson, J., Pangršič, T., Chowdhury, H.H., Pekny, M., i Zorec, R. (2007). Cytoskeleton and vesicle mobility in astrocytes. *Traffic*, 8(1), 12-20.
81. Potokar, M., Stenovec, M., Gabrijel, M., Li, L., Kreft, M., Grilc, S., Pekny, M., Zorec, R. (2010). Intermediate filaments attenuate stimulation-dependent mobility of endosomes/lysosomes in astrocytes. *Glia*, 58(10), 1208-1219.
82. Potokar, M., Stenovec, M., Kreft, M., Kreft, M.E., i Zorec, R. (2008). Stimulation inhibits the mobility of recycling peptidergic vesicles in astrocytes. *Glia*, 56(2), 135-144.

83. Qiao, W., Chaoshu, T., Hongfang, J., i Junbao, D. (2010). Endogenous hydrogen sulfide is involved in the pathogenesis of atherosclerosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 396(2), 182-186.
84. Qiu, Y., Pan, J., Li, Y., Li, X., Li, M., Abukhousa, I., i Wang, Y. (2011). Relationship between activated astrocytes and hypoxic cerebral tissue in a rat model of cerebral ischemia/reperfusion. *International Journal of Neuroscience*, 121(1), 1-7.
85. Quinlan, R.A., i Franke, W.W. (1983). Molecular Interactions in Intermediate-Sized Filaments Revealed by Chemical Cross-Linking: Heteropolymers of Vimentin and Glial Filament Protein in Cultured Human Glima Cells. *European Journal of Biochemistry*, 132(3), 477-484.
86. Ralton, J.E., Lu, X., Hutcheson, A.M., i Quinlan, R.A. (1994). Identification of two N-terminal non-alpha-helical domain motifs important in the assembly of glial fibrillary acidic protein. *Journal of Cell Science*, 107(7), 1935-1948.
87. Reeves, S.A., Helman, L.J., Allison, A., i Israel, M.A. (1989). Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(13), 5178-5182.
88. Renolleau, S., Benjelloun, N., Ben-Ari, Y., i Charriaut-Marlangue, C. (1997). Regulation of apoptosis-associated proteins in cell death following transient focal ischemia in rat pups. *Apoptosis*, 2(4), 368-376.
89. Renolleau, S., Fau, S., Goyenvale, C., Joly, L.M., Chauvier, D., Jacotot, E., Mariani, J., i Charriaut-Marlangue, C. (2007). Specific caspase inhibitor Q-VD-OPh prevents neonatal stroke in P7 rat: a role for gender. *Journal of neurochemistry*, 100(4), 1062-1071.
90. Rodesch, F., Simon, P., Donner, C., i Jauniaux X. (1992). Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstetrics and gynecology*, 80(2), 283-285.
91. Schmidt-Kastner, R. (2015). Genomic approach to selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia-hypoxia. *Neuroscience*, 309, 259-279.
92. Schmidt-Kastner, R., i Freund, T.F. (1991). Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience*, 40(3), 599-636.
93. Schmidt-Kastner, R., i Hossmann, K.A. (1988). Distribution of ischemic neuronal damage in the dorsal hippocampus of rat. *Acta neuropathologica*, 76(4), 411-421.

94. Shibuki, K., Gomi, H., Chen, L., Bao, S., Kim, J.J., Wakatsuki, H., Fujisaki, T., Fujimoto, K., Katoh, A., Ikeda, T., Chen, C., Thompson, R.F., i Itohara, S. (1996). Deficient cerebellar long-term depression, impaired eyeblink conditioning, and normal motor coordination in GFAP mutant mice. *Neuron*, 16(3), 587-599.
95. Sihag, R.K., Inagaki, M., Yamaguchi, T., Shea, T.B., i Pant, H.C. (2007). Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments. *Experimental cell research*, 313(10), 2098-2109.
96. Silver, I., i Erecińska, M. (1998). Oxygen and ion concentrations in normoxic and hypoxic brain cells. *Oxygen Transport to Tissue*, 454, 7-16.
97. Sizonenko, S.V., Sirimanne, E., Mayall, Y., Gluckman, P.D., Inder, T., i Williams, C. (2003). Selective cortical alteration after hypoxic-ischemic injury in the very immature rat brain. *Pediatric research*, 54(2), 263-269.
98. Sofroniew, M.V., i Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119(1), 7-35.
99. Stenovec, M., Kreft, M., Grilc, S., Potokar, M., Kreft, M.E., Pangršič, T., i Zorec, R. (2007). Ca²⁺-dependent mobility of vesicles capturing anti-VGLUT1 antibodies. *Experimental cell research*, 313(18), 3809-3818.
100. Sullivan, S.M., Lee, A., Bjorkman, S.T., Miller, S.M., Sullivan, R.K., Poronnik, P., Colditz, P.B., i Pow, D.V. (2007). Cytoskeletal anchoring of GLAST determines susceptibility to brain damage: an identified role for GFAP. *Journal of Biological Chemistry*, 282(40), 29414-29423.
101. Suzuki, R., Watanabe, J., Arata, S., Funahashi, H., Kikuyama, S., i Shioda, S. (2003). A transgenic mouse model for the detailed morphological study of astrocytes. *Neuroscience research*, 47(4), 451-454.
102. Tanaka, H., Katoh, A., Oguro, K., Shimazaki, K., Gomi, H., Itohara, S., Masuzawa, T., i Kawai, N. (2002). Disturbance of hippocampal long-term potentiation after transient ischemia in GFAP deficient mice. *Journal of neuroscience research*, 67(1), 11-20.
103. Teo, J.D., Morris, M.J., i Jones, N.M. (2015). Hypoxic postconditioning reduces microglial activation, astrocyte and caspase activity, and inflammatory markers after hypoxia–ischemia in the neonatal rat brain. *Pediatric research*, 77(6), 757-764.

104. VanGuilder, H.D., Bixler, G.V., Brucklacher, R.M., Farley, J.A., Yan, H., Warrington, J.P., Sonntag, W.E., i Freeman, W.M. (2011). Concurrent hippocampal induction of MHC II pathway components and glial activation with advanced aging is not correlated with cognitive impairment. *Journal of neuroinflammation*, 8(1), 1-21.
105. Wang, X., Karlsson, J.O., Zhu, C., Bahr, B.A., Hagberg, H., i Blomgren, K. (2001). Caspase-3 activation after neonatal rat cerebral hypoxia-ischemia. *Biology of the Neonate*, 79(3), 172–179.
106. Weber, K., i Geisler, N. (1985). Intermediate filaments: structural conservation and divergence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 455(1), 126-143.
107. Weir, M.D., i Thomas, D.G. (1984). Effect of dexamethasone on glutamine synthetase and glial fibrillary acidic protein in normal and transformed astrocytes. *Clinical Neuropharmacology*, 7(4), 303-306.
108. Widstrand, Å., Fajerson, J., Wilhelmsson, U., Smith, P.L., Li, L., Sihlbom, C., Eriksson, P.S., i Pekny, M. (2007). Increased neurogenesis and astrogenesis from neural progenitor cells grafted in the hippocampus of GFAP^{-/-} Vim^{-/-} mice. *Stem Cells*, 25(10), 2619-2627.
109. Wilhelmsson, U., Li, L., Pekna, M., Berthold, C.-H., Blom, S., Eliasson, C., Renner, O., Bushong, E., Ellisman, M., Morgan, T.E., i Pekny, M. (2004). Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration. *Journal of Neuroscience*, 24(21), 5016-5021.
110. Yasuda, Y., Shimoda, T., Uno, K., Tateishi, N., Furuya, S., Tsuchihashi, Y., Kawai, Y., Naruse, S., i Fujita, S. (2011). Temporal and sequential changes of glial cells and cytokine expression during neuronal degeneration after transient global ischemia in rats. *Journal of neuroinflammation*, 8(1), 1-10.
111. Yun, Z., Maecker, H.L., Johnson, R.S., i Giaccia, A.J. (2002). Inhibition of PPAR γ 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia. *Developmental cell*, 2(3), 331-341.
112. Zhang, S., Wu, M., Peng, C., Zhao, G., i Gu, R. (2017). GFAP expression in injured astrocytes in rats. *Experimental and therapeutic medicine*, 14(3), 1905-1908.

113. Zhu, C., Wang, X., Xu, F., Bahr, B.A., Shibata, M., Uchiyama, Y., Hagberg, H., i Blomgren, K. (2005). The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia–ischemia. *Cell Death i Differentiation*, 12(2), 162-176.
114. Zhu, L.L., Wu, L.Y., Yew, D.T., i Fan, M. (2005). Effects of hypoxia on the proliferation and differentiation of NSCs. *Molecular neurobiology*, 31(1), 231-242.
115. Zimmer, C., Sampalo, S., Sharma, H. S., i Cervo, J. (1991). Altered glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in rat brain following chronic hypoxia. *Neuroscience*, 40(2), 353-361.

8. ŽIVOTOPIS

Marta Radošević rođena je 16.02.1999. u Đakovu, Osječko-baranjska županija. Osnovnu školu „Viktor Car Emin“ je pohađala u svom selu Donjim Andrijevcima, koje pripada Brodsko-posavskoj županiji. Nakon završetka osnovne škole 2013. upisuje srednju školu „Klasična gimnazija fra Marijana Lanosovića s pravom javnosti Slavonski Brod“ u Slavonskom Brodu.

2017. upisuje preddiplomski studij Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Isti završava 2020. te upisuje diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija.

Tijekom studiranja sudjelovala je više puta na manifestacijama kao što su „Dan i noć na PMF-u“ te u radu udruge studenata „BIUS“. Koautor je znanstvenog rada koji je ušao u uži izbor za Rektorovu nagradu 2022. godine. Aktivni je sudionik u projektu istraživanja bioraznolikosti populacije Dvokrilaca (Insecta, Diptera) u nacionalnom parku Plitvička jezera.

Osvojila je stipendiju od strane Sveučilišta u Zagrebu za sudjelovanje u programu „Erasmus + stručna praksa“, koja se održavala u Milanu u periodu od listopada do prosinca 2022., u sklopu koje je usavršila svoje laboratorijske i mikroskopske vještine te je prisustvovala seminarima i *journal club*-ovima raznih medicinskih tematika, većinom vezanih uz područje neuroznanosti.