

Sveučilište u Zagrebu

Medicinski fakultet

Iva Šimunić

**IZLAGANJE NEURONA MIŠA TIJEKOM DIFERENCIJACIJE HIPOKSIJI POVEĆAVA DULJINU I
RAZGRANJENOST DENDRITA U RAZVOJNO ZRELIJIM STANICAMA**

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Hrvatskom institutu za istraživanje mozga, pod vodstvom prof. dr. sc. Dinka Mitrečića, u sklopu znanstvenog projekta „Matične stanice usne šupljine čovjeka za liječenje ishemijske bolesti mozga“ (Hrvatska zaklada za znanost, šifra projekta IP-2016-06-9451; voditelj projekta: prof. dr. sc. Dinko Mitrečić). Rad je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020./2021.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Građa živčanog sustava	1
1.2. Razvoj stanica živčanog sustava	2
1.3. Izrastanje nastavaka živčanih stanica	3
1.4. Uloga kisika u živčanom sustavu	4
2. HIPOTEZA.....	6
3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA.....	6
4. MATERIJALI I METODE.....	7
4.1. Izolacija živčanih matičnih stanica.....	7
4.2. Izazivanje hipoksije.....	7
4.3. Izrada imunocitokemijskih preparata	8
4.4. Mikroskopija i fotografiranje	8
4.5. Razvoj programa za obradu fotografija	8
4.6. Statistička analiza.....	9
5. REZULTATI	9
5.1. Vlastiti razvijeni algoritam pisan u programskom jeziku Java omogućuje prepoznavanje i kvantificiranje jezgara, tijela i nastavaka neurona.....	9
5.2. Ukupna duljina i broj ogranaka dendrita tijekom <i>in vitro</i> diferencijacije neurona u fiziološkim uvjetima normoksije se povećavaju	14
5.3. Ukupna duljina i broj ogranaka aksona tijekom <i>in vitro</i> diferencijacije neurona u fiziološkim uvjetima normoksije se povećavaju	15
5.4. Izlaganje neurona tijekom <i>in vitro</i> diferencijacije hipoksiji dovodi do porasta broja i razgranjenosti dendrita u većini analiziranih točaka.....	17
5.5. Izlaganje neurona tijekom <i>in vitro</i> diferencijacije hipoksiji ne utječe na porast broja i razgranjenosti aksona	19
6. RASPRAVA.....	21
7. ZAKLJUČCI	24
8. ZAHVALA.....	24
9. POPIS LITERATURE.....	25
10. SAŽETAK.....	28
11. SUMMARY	29
12. ŽIVOTOPIS	30

1. UVOD

Živčani sustav je organski sustav ljudskog tijela koji privlači veliku pozornost znanstvenika. Razlozi tome su njegova još uvijek nedovoljno poznata kompleksna građa i funkcija te činjenica kako živčani sustav pogađa mnogo bolesti koje bitno utječu na kvalitetu života. Glavne funkcije živčanog sustava su registriranje, prijenos i obrada podataka iz okoline i unutrašnjih organa. Morfološki ga možemo podijeliti na središnji živčani sustav (SŽS) kojeg čine mozak i leđna moždina te periferni živčani sustav (PŽS) građen od snopova živčanih vlakana i nakupina tijela živčanih stanica koje nazivamo ganglijima. Funkcionalno razlikujemo somatski živčani sustav, koji je odgovoran za obradu podražaja iz okoline i ljudskog tijela, te autonomni živčani sustav, koji je odgovoran za održavanje homeostaze u tijelu.

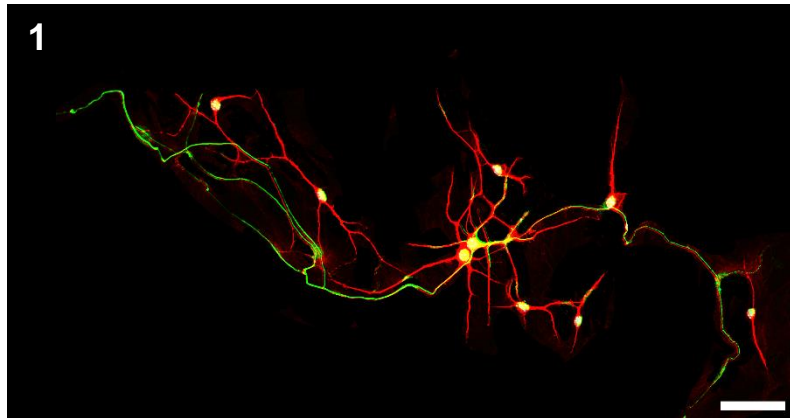
1.1. Građa živčanog sustava

Živčano tkivo je jedno od četiri osnovna tkiva u histologiji (Junquiera i Carniero, 2005). Građeno je od dvije vrste stanica: živčanih stanica ili neurona te glija stanica. Glija stanice se dijele na: astrocite, oligodendrocite, Schwannove stanice, mikrogliju i ependimske stanice. Osnovne uloge tih stanica su opisane u Tablici 1.

Tablica 1. Prikaz vrsta glija stanica, njihovo podrijetlo, smještaj i funkcija u ljudskom tijelu

GLIJA STANICE	PODRIJETLO	FUNKCIJA
astrociti	neuralna cijev	tvore krvno-moždanu barijeru, reguliraju koncentraciju K^+ iona i acidobaznu ravnotežu karboanhidrazom, pohranjuju glikogen i imaju sposobnost glikolize, sudjeluju u cijeljenju
oligodendrociti	neuralna cijev	mijeliniziraju više centralnih aksona, ubrzavaju akcijski potencijal skokovitim vođenjem
Schwannove stanice	neuralna cijev	stvaraju mijelinske ovojnice u PŽS-u, omogućavaju skokovito vođenje akcijskog potencijala
mikroglija	mezenhimske stanice – koštana srž (podvrsta makrofaga)	fagocitna aktivnost u SŽS
ependimske stanice	neuralna cijev	pridonose gibanju cerebrospinalne tekućine trepetljikama, oblažu šupljine SŽS-a

Osnovnu zadaću živčanog sustava obavljaju stanice koje nazivamo neuroni. Neuroni stvaraju, primaju, prenose i obrađuju podražaje. Većina neurona sastoji se od dendrita, tijela stanice i aksona (Slika 1.).



Slika 1. Fotografija neurona miša u staničnoj kulturi, crveno – dendriti, zeleno – aksoni. Crta mjerila – 100 μm .

Dendriti su stanični nastavci specijalizirani za primanje i vođenje podražaja prema tijelu neurona. To su tanki stanični izdanci koji se granaju i time povećavaju površinu za primanje podražaja. Za razliku od aksona, dendriti grananjem postaju tanji, dok aksoni cijelom svojom dužinom održavaju jednak promjer. Važan dio dendrita čine dendritske spine, formacije oblika gljive, koje se posebnom vezom zvana sinapsa spajaju s aksonima. Dendritske spine su značajne u procesima neuroplastičnosti, učenju i pamćenju (Chidambaram i ostali, 2019). Dendriti izrastaju iz tijela živčane stanice, some. Tamo je smještena jezgra i ostali organeli koji obavljaju razne zadaće živčane stanice. Tijelo također može primiti živčane impulse iz drugih neurona i/ili u njega pristižu impulsi iz dendrita koji se zbrajaju i u konačnici prevode u akson.

Akson je stanični izdanak specijaliziran za primanje i provođenje živčanog impulsa na druge stanice. Počinje aksonskim brežuljkom, produljuje se i završava razgranjenjem na kojem pojedinačni presinaptički aksonski ogranci dolaze u kontakt s drugim stanicama putem sinapse. Živčana vlakna, aksoni, mogu imati lipidnu mijelinsku ovojnica, čime ta vlakna postaju mijelinizirana. Mijelin u SŽS oblikuju membrane oligodendrocita dok u PŽS mijelin oblikuju membrane Schwannovih stanica. Mijelinska ovojnica zatvara kalijeve kanale u staničnoj membrani aksona, dok kanali za natrij ostaju prohodni jer su oni smješteni na dijelovima aksona između mijelinskih ovojnica, Ranvierovim čvorovima. Takav raspored kanala osigurava skokovito vođenje akcijskog potencijala, što značajno ubrzava provođenje impulsa. Kontinuirano, znatno sporije vođenje akcijskog potencijala se pojavljuje u nemijeliniziranih aksona jer su kod njih kanali za natriji i kalij prohodni. Poruku koja se prenosi akcijskim potencijalima aksona važno je prenijeti do druge stanice, a to je omogućeno aksonskim povezivanjem s drugim dendritima, somama i aksonima te se tako formiraju sinapse. Akcijske potencijale aksona, odnosno električne živčane impulse, sinapsa pretvara u kemijske signale izlučivanjem neurotransmitera koji se oslobađaju iz završetka presinaptičkog neurona u sinaptičku pukotinu. Neurotransmiteri se vežu na inotropne ili metabotropne receptore membrane postsinaptičkog neurona kojeg dalje inhibicijski ili ekscitacijski električno podražuju.

1.2. Razvoj stanica živčanog sustava

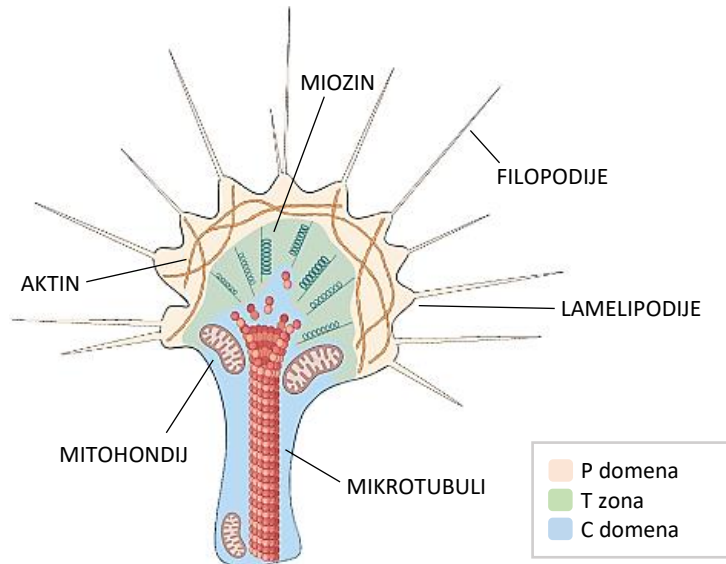
Živčani sustav se u čovjeka počinje razvijati početkom trećeg tjedna, kada se pojavljuje zadebljanje ektoderma koje nazivamo neuralna ploča (Sadler, 2008). Neuralna ploča je smještena na sredini dorzalne strane zametka, a njezine lateralne strane se uzdižu i tvore neuralne nabore. Daljnjim uzdizanjem neuralnih nabora, oni se međusobno približavaju središnjoj crti u kojoj se konačno i spoje, formirajući neuralnu cijev iz koje će nastati

mozak i leđna moždina. Otvori neuralne cijevi, neuroporusi, se zatvore, a šupljina koja ostane formira ventrikularni sustav mozga i središnji kanal leđne moždine.

Stanice živčanog sustava nastaju zbivanjem koje nazivamo neurogeneza. Neurogeneza započinje tako što se neuroepitelne stanice intenzivno dijele i stvaraju višeredni epitel. Uz lumen neuralne cijevi neuroepitelne stanice formiraju odebljanje, to jest neuroepitel. Iz neuroepitelnih stanica u fazi intenzivne diobe nastaju neuroblasti, primitivne živčane stanice, i glioblasti, primitivne potporne stanice. U daljnjem razvoju, nakon nastanka neuroblasta i glioblasta, neuroepitelne stanice se pretežno diferenciraju u endodimske stanice koje oblažu šupljine u SŽS, a ponegdje ostaju kao razvojne preteče neurona ili živčane matične stanice (Cameron i Glover, 2015). Iz neuroblasta koji su u početku okrugli, pa se nazivaju apolarni neuroblasti, daljnjom diferencijacijom se formiraju dva izdanka na suprotnim stranama. Ti se izdanci izdužuju i formiraju primitivne aksone i primitivne dendrite.

1.3. Izrastanje nastavaka živčanih stanica

Budući da nastavci živčanih stanica služe obavljanju temeljnih uloga živčanog sustava, potrebno je dobro razumjeti način kako oni izrastaju te kako na ta zbivanja utječu vanjski čimbenici. Primitivni aksoni i dendriti se produljuju tijekom embrionalnog razvoja, a cilj produljivanja je povezivanje s drugim neuronima i stvaranje sinapsi. U rastu izdanaka neurona se najviše izdvajaju proteini citoskeleta koji imaju potpornu i transportnu ulogu, proteini i lipidi koji sudjeluju u izgradnji i produljenju stanične membrane, mitohondriji stanice koji osiguravaju ATP potreban u izgradnji rastućeg kraja i zaštitna aktinska kapa na samom vršku rastućeg izdanka koju nazivamo konus rasta (engl. *growth cone*) (Slika 2.).



Slika 2. Prikaz konusa rasta staničnog nastavka građenog od mikrotubula i aktinskih filamenata koji formiraju lamelipodije i filopodije.

Konus rasta je građen od tri dijela: periferne (P) domene, tranzitne (T) zone i centralne (C) domene. P domena pretežno je građena od aktinskih filamenata koji polimeriziraju i formiraju lamelipodije i filopodije, to jest izdanke koji omogućavaju gibanje i rast nastavaka neurona. U C domeni su smješteni mitohondriji koji zadovoljavaju energetske potrebe procesa te mikrotubuli koji rastućem kraju izdanka pružaju potporu. Između P i C domene je T zona koja sadrži međusobno vezane kontraktilne bjelančevine aktin i miozin te tako regulira izrastanje

mikrotubula u C domeni te produljivanje aktina u P domeni (Omotade i ostali, 2017). Smjer rasta izdanaka kontroliran je kemotaktičnim molekulama okoline.

Ukoliko se izrastanje i međusobno povezivanje nastavaka živčanih stanica tijekom embrionalnog razvoja poremeti, moguć je nastanak bolesti. Tako postoje bolesti kod kojih je posve jasna osnova poremećeno izrastanje nastavaka, kao što su ageneza žuljevitog tijela (corpus callosum), Joubert sindrom, Kallmann sindrom i Duane retrakcijski sindrom, dok se za neke bolesti kod kojih patogeneza još uvijek nije posve jasna vjeruje kako je poremećeno izrastanje nastavaka i njihovo povezivanje vrlo važan, a možda i najvažniji čimbenik (npr. neurorazvojni koncept nastanka shizofrenije) (Engle, 2010; Gilmore, 2010). Osim bolesti u kojima se pojavljuju patološki procesi u kojima sudjeluju izdanci neurona, postoje i druga patološka stanja poput ozljede aksona, koja također uključuju obnovu ponovnim aksonskim izrastanjem. Važnost razumijevanja izrastanja živčanih nastavaka se dodatno ističe ako uzmemo u obzir i kliničke studije u kojima se istražuje potencijalna primjena matičnih stanica u liječenju bolesti središnjeg živčanog sustava. Naime, transplantirane stanice se i same diferenciraju te započinju pružati nastavke. Razumijevanje tih zbivanja je vrlo važno u finom podešavanju terapijskih doza i ostalih elemenata terapije temeljene na staničnim transplantatima (Pang i ostali, 2017).

1.4. Uloga kisika u živčanom sustavu

Razina kisika je jedan od najvažnijih fizioloških faktora reguliran središnjim i perifernim kemoreceptorima. Ukoliko, iz bilo kojeg razloga, organizam izgubi sposobnost kontrole razine kisika, nastaju akutna ili kronična patološka stanja.

Fiziološki smanjena razina kisika u živčanom sustavu nalazi se za vrijeme embrionalnog razvoja, a koliko je važna uloga hipoksije u razvoju živčanog sustava najbolje govore patološka stanja koja se mogu pojaviti u prerano rođene djece. Naime, organizam prerano rođene djece nije pripremljen za fiziološke razine kisika. Fetalni hemoglobin veže kisik većim afinitetom nego adultni hemoglobin, a takva djeca nemaju niti sposobnost sinteze antioksidansa, što njihov organizam dodatno izlaže opasnosti od oštećenja slobodnim radikalima kisika. Stoga se kao česta patološka stanja javljaju retinopatija prematurusa i kronična plućna bolest, a u živčanom sustavu se ističu poremećaji neuroplastičnosti i mijelinizacije (Deuber i Terhaar, 2011; Reich i ostali, 2016).

Nasuprot hiperoksijskih oštećenja u prerano rođene djece, javljaju se i hipoksijske ozljede, a najčešće prikazuje Tablica 2. Intermitentna hipoksijska ozljeda u prematurusa očituje se nizom patoloških stanja poput retinopatije, poremećaja disanja tijekom spavanja, poremećaja rasta, kardiovaskularnih bolesti i neurorazvojnih poremećaja najčešće vezanih uz formiranje sinapsi (Martin i ostali, 2011). Dugotrajne posljedice hipoksije u ranoj životnoj dobi uključuju: intelektualne teškoće, poremećaje pažnje, autizam, cerebralnu paralizu, depresiju, epilepsiju i motoričke smetnje (Bonkowsky i Son, 2018).

Tablica 2. Pregled najčešćih oblika perinatalnih ozljeda uzrokovanih manjkom kisika

OZLJEDA	MEHANIZAM OZLJEDE
hipoksijska ishemijska encefalopatija	hipoksijska ishemija koja vodi klasičnom putu ozljede
interventrikularno krvarenje	ozljeda nježnih krvnih žila mozga
periventrikularna leukomalacija	hipoperfuzija graničnih područja mozga
perinatalni moždani udar	regionalna ishemija mozga ovisno o okluziji arterija ili venskih sinusa ili krvarenja
cerebralna paraliza	multifaktorska bolest, 10-20% uzrokovana hipoksijom

U odrasloj je dobi hipoksija mozga, odnosno moždani udar prvi uzrok invaliditeta i drugi uzrok smrtnosti u razvijenom svijetu. Dijeli se na ishemijski i hemoragični. U oba razlikujemo područje mozga u kojem nastupaju ireverzibilne promjene likvefakcijske nekroze, zona ishemije, a zahvaljujući anastomozama u moždanoj cirkulaciji nastaje i zona penumbre, to jest područje granično s funkcionalnim i nekrotičnim promjenama.

Zbog svih navedenih patoloških stanja važno je proučavati stanična i molekularna zbivanja koja se događaju tijekom akutne i kronične faze oštećenja uzrokovana promjenama razine kisika te zbivanja koja se događaju tijekom akutne i kronične faze oporavka, uključujući i još uvijek vrlo slabo istražene promjene duljine staničnih nastavaka.

Od osnovnih molekularnih poluga na koje djeluje smanjena razina kisika se izdvaja ona posredovana porodicom proteina hipoksijom induciranih faktora (HIF). Od njih se ističe HIF-1, koji sudjeluje u akutnoj prilagodbi na hipoksiju (Bartoszewska i ostali, 2015; Koh i Powis, 2012). HIF je heterodimerni protein koji se sastoji od α i β podjedinice. Razina kisika utječe na degradaciju α podjedinice te pokreće niz molekularnih odgovora (Ke i Costa, 2006; Majmundar i ostali, 2010). Stanični odgovor na izlučivanje HIF-1 aktivira gene koji sudjeluju u angiogenezi (vaskularni endotelni čimbenik rasta – VEGF), gene koji sudjeluju u stvaranju eritrocita (eritropoetin), mitohondrijske gene uključene u iskorištavanju energije, gene glikolitičkih enzima uključene u anaerobni metabolizam i gene koji povećavaju koncentraciju NO koji potiče plućnu vazodilataciju (Guyton i Hall, 2017).

Budući da ima poveznicu s ovim istraživanjem, važno je pogledati vezu aktivacije HIF-a i embrionalnog razvoja. U embrionalnom razvoju su zbog smanjene razine kisika aktivni molekularni putevi HIF-1 i HIF-2. Aktivacija HIF molekula potiče ekspresiju VEGF-a koji ima važnu ulogu za razvitak krvnih žila mozga. Ipak, razvoj krvnih žila mozga nije prostorno ujednačen. Pokazano je kako u područjima mozga s većom proliferacijom stanica postoji manje krvnih žila, što je povezano i s drugim studijama koje pokazuju kako smanjena razina kisika pozitivno djeluje na preživljenje i proliferaciju živčanih matičnih stanica (Yan i ostali, 2019; Zhang i ostali, 2011).

Cilj današnje terapije moždanog udara je zaustaviti navedeni proces tako da stanice u zoni penumbre prežive i time više moždanog tkiva ostane očuvano. To se postiže trombolizom ili trombektomijom. Međutim, takvi reperfuzijski postupci imaju vremensko ograničenje nakon kojeg se zona penumbre ne može vratiti u funkcionalno stanje, kako zbog toga što su stanice nepovratno oštećene, tako i zbog činjenice kako odgođena reperfuzija jako

oštećuje tkivo reaktivnim kisikovim radikalima. Upravo zbog navedenih razloga, u svrhu terapije ishemijskih i neurodegenerativnih bolesti živčanog sustava sve se više istražuje učinak živčanih matičnih stanica na eksperimentalne modele neuroloških bolesti (Hribljan i ostali, 2018). Dobri rezultati su doveli do niza kliničkih studija, od kojih su neke pokazale odlične rezultate (Grochowski i ostali, 2018). Ipak, ono što još uvijek ostaje neistraženo jest što se događa sa živčanim matičnim stanicama nakon transplantacije te kako točno one djeluju na oštećeno živčano tkivo. Ovo istraživanje daje doprinos tome jer pokazuje kako matične stanice u diferencijaciji razvijaju svoje nastavke u normalnim i hipoksijskim uvjetima.

Iako sve više znamo o nastanku i normalnom razvoju te o obnovi živčanog sustava nakon ozljede, vrlo slabo razumijemo utjecaj razine kisika na staničnu razinu navedenih zbivanja. Razlozi tome su potreba za pouzdanim *in vitro* modelom te metodom koja bi omogućila prepoznavanje i kvantifikaciju morfoloških promjena. U ovom radu pokazujemo rezultate dobivene uporabom vlastitog *in vitro* modela koji omogućuje praćenje neurona u diferencijaciji te kvantifikaciju nastalih razlika potpuno novim programom kodiranim programskim jezikom Java, a razvijenim na temelju strojnog učenja.

2. HIPOTEZA

Hipoksija smanjuje sposobnost izrastanja nastavaka živčanih stanica u razvoju.

3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Opći cilj rada je bio razviti metodu koja omogućuje prepoznavanje i kvantificiranje nastavaka živčanih stanica tijekom diferencijacije te zatim primijeniti tu metodu kako bi usporedili izrastanje staničnih nastavaka između normoksijskih i hipoksijskih uvjeta.

Specifični ciljevi rada:

1. Razviti računalni algoritam koji omogućuje prepoznavanje staničnih nastavaka te njihovu kvantifikaciju;
2. Kvantificirati duljinu te razgranjenost aksona i dendrita tijekom diferencijacije neurona miša u fiziološkim uvjetima;
3. Kvantificirati duljinu te razgranjenost aksona i dendrita tijekom diferencijacije neurona miša izloženih hipoksiji;
4. Usporediti duljinu i razgranjenost staničnih nastavaka između živčanih stanica miša uzgajanih u fiziološkim i hipoksijskim uvjetima.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Izolacija živčanih matičnih stanica

Živčane matične stanice izolirane su iz mišjih zametaka starih 14 dana. Ženke miševa usmrćene su cervikalnom dislokacijom, postupkom kojim fiksiranjem životinje u kaudalnom području glave uz istovremeno povlačenje repa dolazi do prekida kralježničke moždine u području vrata i trenutne smrti. Nakon izolacije oba roga maternice, izvađeni su zameci te su stavljani u sterilnu Petrijevu posudu s fosfatnim puferom. Sagitalnim rezom glave zametka pristupljeno je telencefalonu, koji je zatim izvađen i premješten u novu sterilnu posudicu s čistim puferom. Izolirani telencefaloni su usitnjeni škaricama, a zatim im je dodano 5 mL proteolitičkog enzima akutaze da se dobije suspenzija odvojenih stanica. Nakon dobivanja guste suspenzije stanica, u smjesu smo dodali 10 mL medija DMEM/F-12 koji blokira daljnje djelovanje akutaze. Nakon centrifugiranja na 300 g, 6 minuta, pipetom je odstranjen supernatant, a stanice su zatim resuspendirane u mediju za rast. Medij za rast je sadržavao: DMEM/F12, B27 i N2, što su zaštićene formulacije medija i koktela čimbenika te EGF (engl. *epidermal growth factor*, epidermalni čimbenik rasta), FGF (engl. *fibroblast growth factor*, čimbenik rasta fibroblasta), antibiotik i antimikotik Penicilin/Streptomycin (sve Gibco). Suspenziju stanica u mediju za rast pipetom smo nasadili u posudicu za uzgoj stanica od 75 cm² (BD Falcon).

Stanice su uzgajane u inkubatoru na 37 °C i 5% CO₂ sve do pojave neurosfera, odnosno kuglastih nakupina stanica. Neurosfere veličine 150-200 μm su disocirane istim postupkom kao i kod izolacije stanica (akutazom). Disocirane stanice su prebrojane te ponovno raspoređene u posudice za uzgoj stanica u koncentraciji od oko 1 milion stanica na 15 mL medija. Za pokuse opisane u ovom radu su se koristile stanice iz pete pasaže.

Za potrebe ovog pokusa je bilo potrebno dobiti stanice stare jedan, pet i sedam dana diferencijacije. Za to je bilo potrebno pripremiti stakalca promjera 12 mm i stanice za diferencijaciju. Kako bi se stanice počele diferencirati, bilo je potrebno omogućiti im da se prihvate za podlogu. To se postiglo tako što su stakalaca prvo preko noći ostavljena u dušičnoj kiselini. Slijedeći dan su stakalca ispirana dva sata sterilnom vodom i opet preko noći ostavljena u 70% etanolu. Zatim su stavljena u sterilizator 12 sati na temperaturi od 250 °C. Potom je na stakalca stavljeno 130 μL poli-D-lizina koncentracije 500 μg/mL tijekom 24 sata. Slijedilo je ispiranje sterilnom vodom i postavljanje stakalaca u ploče s 24 bazena. Na stakalca se stavilo 400 μL laminina koncentracije 10 μg/mL koji se ostavio stajati 24 sata. Nakon ispiranja medijem za rast, stakalca su bila spremna za stanice. Stanice su nasađivane u koncentraciji od 50 000 stanica po bazeniću s jednim stakalcem, u mediju za diferencijaciju. Medij je sadržavao: DMEM/F12, B27, N2, antibiotik i antimikotik Penicilin/Streptomycin. Svaka tri dana pola medija se zamijenilo novim, a napredak stanica u diferencijaciji se pratio pod mikroskopom.

4.2. Izazivanje hipoksije

Živčane matične stanice podijeljene su u tri skupine stanica. Sve skupine su za vrijeme diferencijacije boravile u normoksijskim uvjetima (21% kisika) na temperaturi od 37 °C u inkubatoru. Prva skupina stanica imala je vrijeme diferencijacije od jednog dana, druga skupina od pet dana, a treća skupina se diferencirala sedam dana. Potom je na zadnji dan diferencijacije (1., 5. ili 7.) svaka skupina podijeljena u dvije podskupine. Jedna podskupina bila je izložena hipoksijskim uvjetima (1% kisika) tijekom šest sati u inkubatoru, što je predstavljalo hipoksijsku ozljedu,

dok je druga ostala u normoksijskim uvjetima kao kontrola. Nakon 6 sati hipoksije, stanice se vraćene u normoksijske uvjete na 4 sata, kako bi se pokrenula zbivanja koja se pripisuju reoksigenaciji. Za ovaj pokus su korištena dva identična inkubatora Ico50Med (Memmert), od kojih jedan stalno održava normoksiju, a drugi stalno hipoksiju. Time su isključene varijacije koje bi mogle doći zbog različitih razina vlage ili drugih parametara u različitim sustavima.

4.3. Izrada imunocitokemijskih preparata

Za izradu imunocitokemijskih preparata stanice su fiksirane svježim 4% paraformaldehidom, u trajanju od 10 minuta. Fiksativ je zatim ispran tri puta po pet minuta s otopinom PBS-a (engl. *phosphate buffered saline*). Nakon fiksacije i ispiranja stanice su permeabilizirane dodatkom detergenta (0.2% Triton, razrijeđen u PBS-u) tijekom 10 minuta. Potom su ponovo isprane tri puta po pet minuta s PBS-om. Sljedeća 2 sata traje postupak blokiranja serumom životinje (3%) čija su sekundarna protutijela korištena za obilježavanje. Nakon ispiranja stanice su bile izložene primarnim protutijelima. Korištena su dva primarna protutijela: anti-MAP2 protutijelo (Abcam, 1:1000) koje se veže za protein povezan s mikrotubulima 2 (engl. *microtubule-associated protein 2*), to jest jedan od proteina citoskeleta dendrita, te pan-aksonalno protutijelo anti-SMI312 (Biolegend, 1:200) koje se veže za nerofilamente M i H, odnosno dijelove citoskeleta aksona (Davoust i ostali, 2017). Stanice su inkubirane na 4 °C preko noći. Nakon ispiranja primarnog protutijela, stanice su bile inkubirane dva sata s dva sekundarna protutijela (Alexa 488, Alexa 546, Life Technologies). Jednim koje se veže na anti-MAP2 protutijelo, podrijetla pileta, i drugim koje se veže na anti-SMI312 protutijelo, podrijetla koze. Na kraju postupka su jezgre označene fluorescentnom bojom DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Stakalca su postavljena na predmetnicu i preparati su stavljeni na sušenje u hladnjaku pri 4 °C. Kontrolni preparati su napravljeni na isti opisani način samo bez koraka s primarnim protutijelima. Imunocitokemija je rađena u tri ponovljena pokusa prvi, peti i sedmi dan diferencijacije stanica.

4.4. Mikroskopija i fotografiranje

Mikroskopiranje preparata je rađeno konfokalnim mikroskopom Olympus FV3000. Vidna polja su izabirana nasumično te ih je ukupno poslikano 48, po 16 za svaki stadij diferencijacije.

4.5. Razvoj programa za obradu fotografija

Za kvantifikaciju imunocitokemijskih prikaza razvijen je vlastiti program pisan programskim kodom Java u sučelju programa za obradu slika ImageJ, dodatka Fiji. Program omogućava automatsku analizu svih imunocitokemijskih prikaza spremljenih u jednoj mapi, a pritom sprema rezultate mjerenja (broj stanica, duljinu staničnih nastavaka te broj grananja staničnih nastavaka) u automatski novoformiranu mapu „Rezultati“. Detaljan razvoj programa je opisan u prvom poglavlju Rezultata (5.1. Vlastiti razvijeni algoritam pisan u programskom jeziku Java omogućuje prepoznavanje i kvantificiranje jezgara, tijela i nastavaka neurona), a uspoređen je i s drugim dostupnim programima za tu namjenu u Raspravi.

4.6. Statistička analiza

Statistička obrada provedena je u programu GraphPad Prism. Uspoređivana je duljina nastavaka neurona izloženih fiziološkim i hipoksijskim uvjetima prvog, petog i sedmog dana diferencijacije. Isto je napravljano i za broj ogranaka na nastavcima neurona. Duljina nastavaka i broj ogranaka neurona normalizirani su po broju tijela neurona pozitivnih na MAP2 i SMI312. Za statističke izračune korišteni su F-test i t-test za nezavisne uzorke (Petz i ostali, 2012). F-testom uspoređene su varijance između duljina nastavaka neurona u hipoksiji i normoksiji te broj ogranaka na neuronima u hipoksiji i normoksiji za svaki navedeni dan diferencijacije. Stupanj slobode uzet je ovisno o broju uzoraka u različitim uvjetima. P-vrijednost <0.05 korištena je kao statistički značajna za sve rezultate F-testa. Prosječne duljine nastavaka u hipoksiji i normoksiji te prosječni broj ogranaka u hipoksiji i normoksiji uspoređeni su t-testom za nezavisne uzorke. Stupanj slobode uzet je ovisno o zbroju uzoraka u različitim uvjetima. Dvostrana p-vrijednost <0.05 korištena je kao statistički značajna za sve rezultate t-testa.

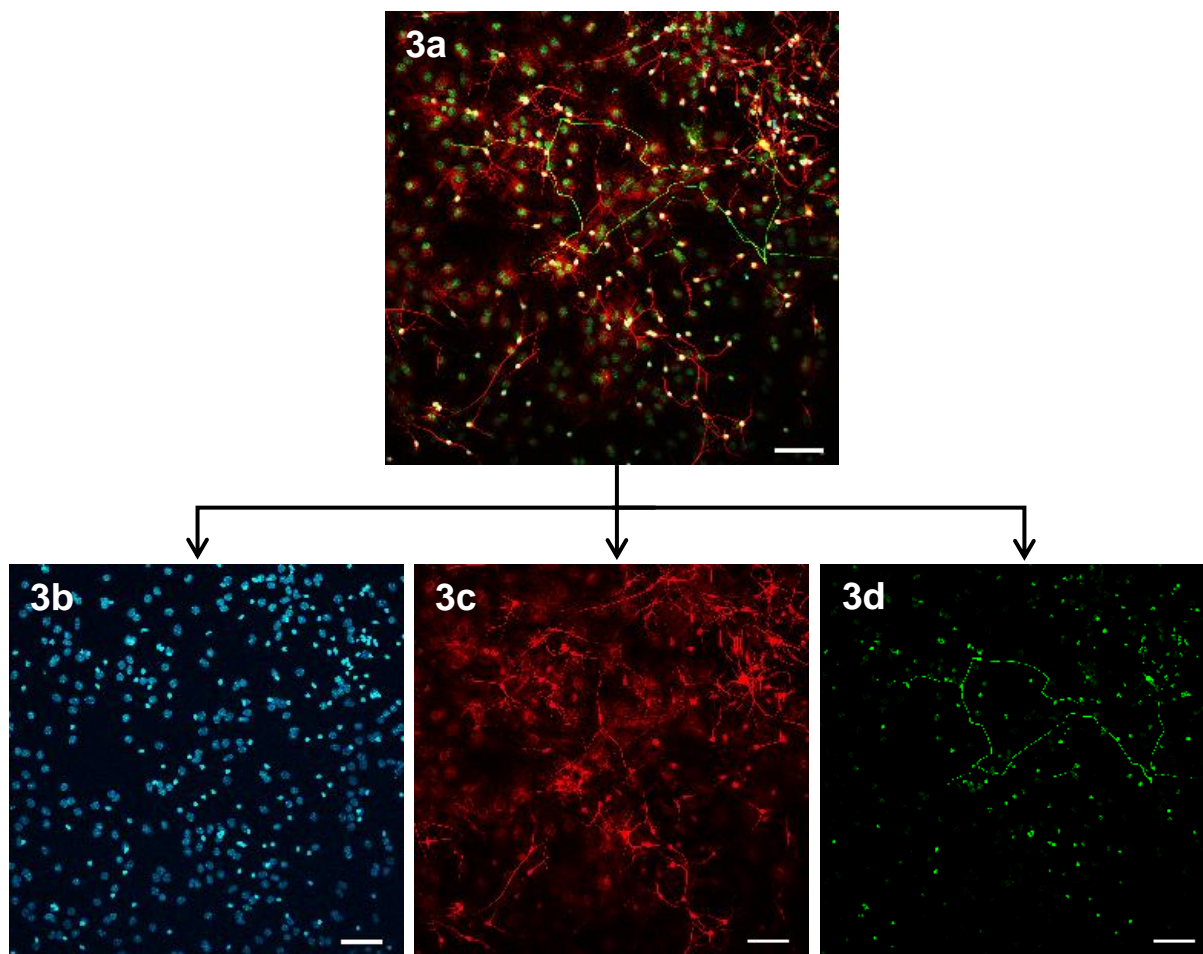
5. REZULTATI

5.1. Vlastiti razvijeni algoritam pisan u programskom jeziku Java omogućuje prepoznavanje i kvantificiranje jezgara, tijela i nastavaka neurona

Budući da u živčanom sustavu postoji velik broj stanica koje se međusobno povezuju, što je nužno za zadaće koje taj sustav obavlja, vrlo su važni parametri broj i stupanj razgranjenja staničnih nastavaka. Budući da programi pomoću kojih smo pokušali prepoznavati i mjeriti nastavke u staničnoj kulturi (CellProfiler, Imaris, MATLAB, AxonTracer i NeuronJ, opisani u Raspravi) nisu to radili na zadovoljavajući način, odlučili smo sami razviti program za prebrojavanje stanica i kvantificiranja njihovih nastavaka.

Algoritam za prepoznavanje jezgara, nastavaka i njihovih razgranjenja smo razvili programiranjem u sučelju programa za obradu slika ImageJ, varijanti nazvanoj Fiji. Svi koraci koji se odvijaju u ovdje opisanom postupku su kontrolirani algoritmom koji ih automatski pokreće (tzv. *macro*). Napisani algoritam smo dodatno proširili kodiranjem koje omogućuje automatsku analizu neograničenog uzorka slika i odabir dodatnih mogućnosti koje olakšavaju obradu slika. Sve je napravljeno tako da nakon pokretanja programa korisnik odabire mapu u kojoj se nalaze imunocitokemijski prikazi koje treba analizirati, a potom program stvara potpuno novu mapu „Rezultati“ u kojoj se automatski spremaju sva mjerenja u Excel tablicama i određeni prikazi dijela analize u *Tiff* formatu. Na početku analize korisnik odabire trebaju li se imunocitokemijski prikazi razdvojiti u slučaju da obuhvaćaju više kanala u jednoj slici (tzv. *hyperstack*), odabire treba li dodatno podesiti mjerne jedinice u kojima će biti izraženi rezultati te odabire postoji li već spreman algoritam za prepoznavanje dijelova na imunocitokemijskom prikazu.

Ovdje opisujemo osnovne korake ovog automatiziranog postupka – algoritma. Budući da su naši imunocitokemijski prikazi snimljeni u obliku u kojem su sve boje prikazane zajedno (*hyperstack*) (Slika 3a.) bilo je potrebno prvo razdvojiti dijelove prikaza na: imunocitokemijski prikaz jezgara (Slika 3b.), dendrita (Slika 3c.) i aksona (Slika 3d.).

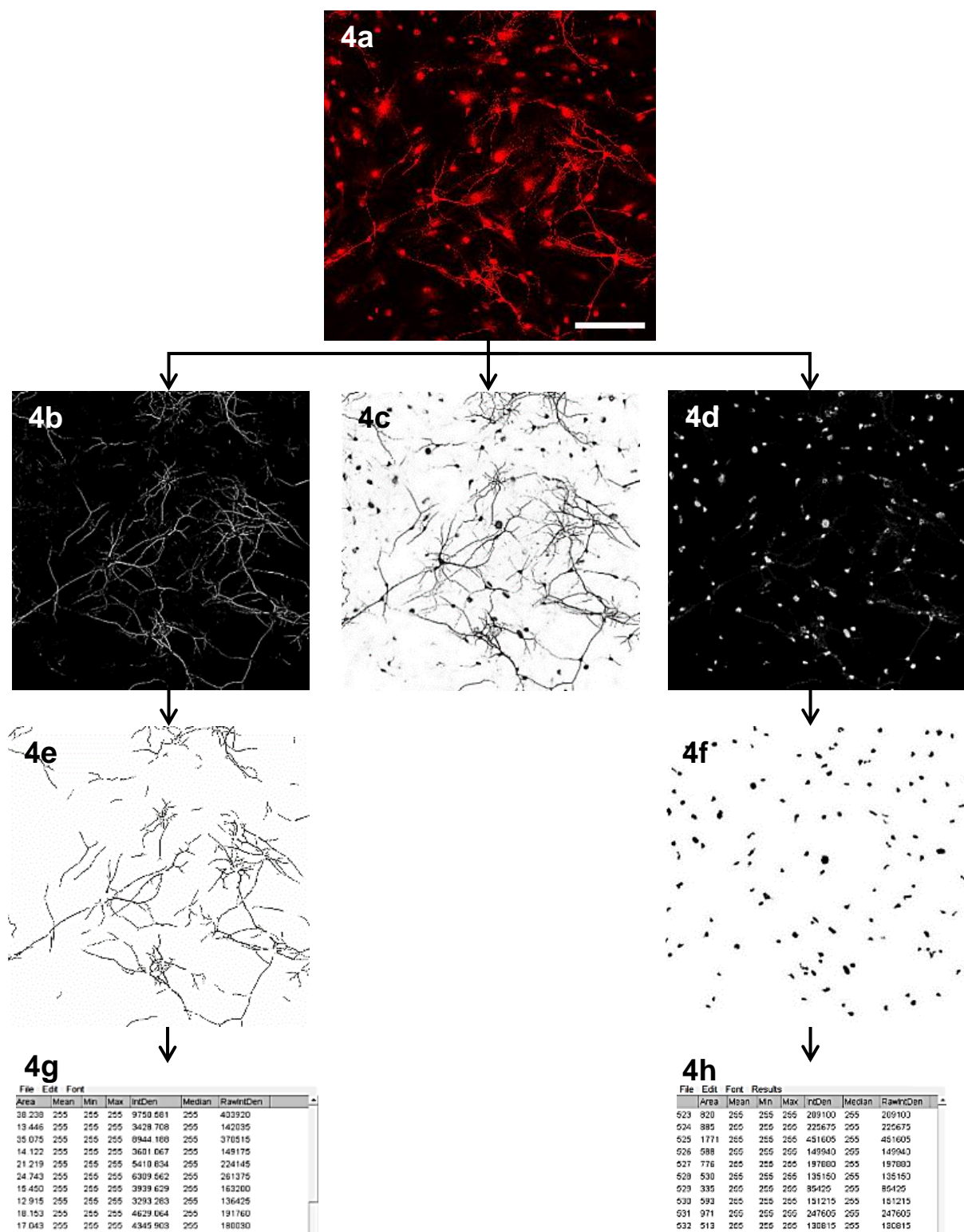


Slika 3. Imunocitokemijski prikaz svih elemenata slike zajedno (3a) se razdvaja na odvojene prikaze jezgara (3b), dendrita (3c) i aksona (3d). Crta mjerila – 100 μm .

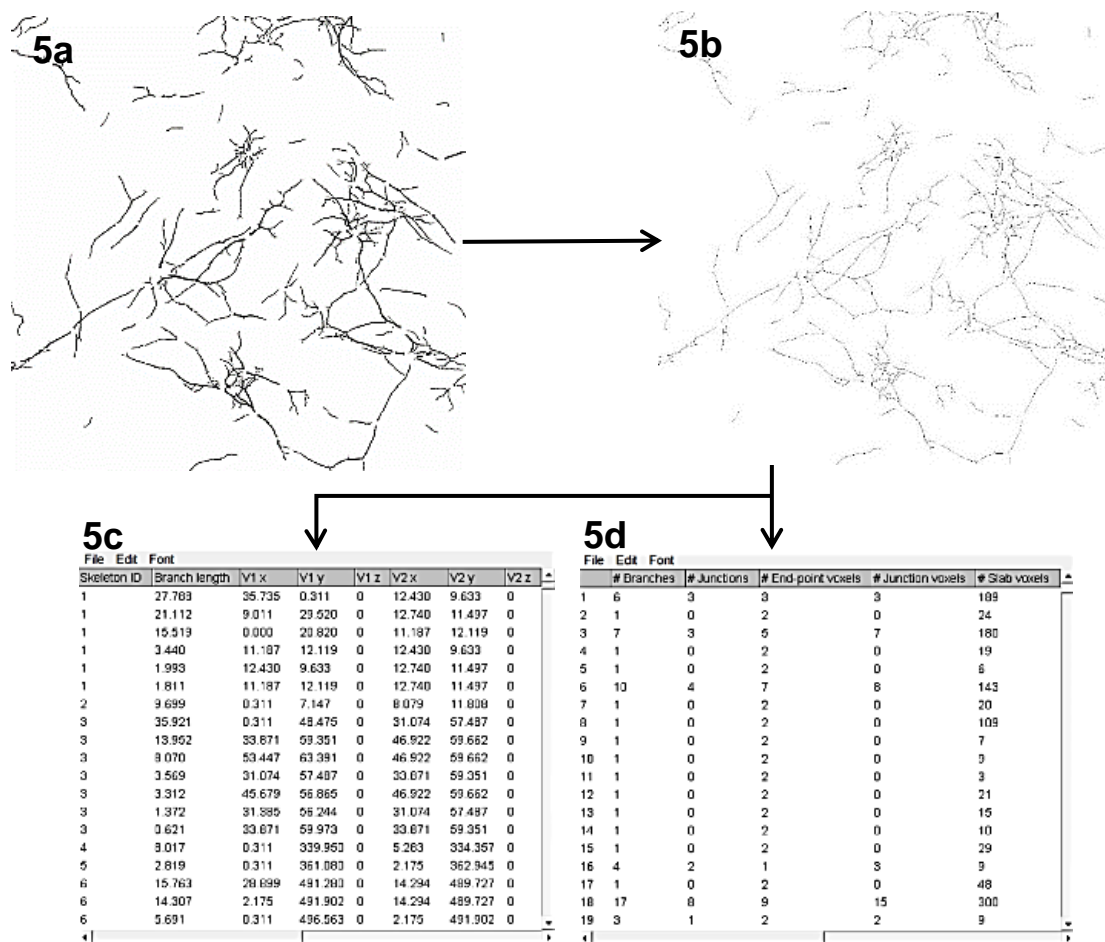
Daljnji korak u analizi je izrada algoritma koji postupkom strojnog učenja, odnosno umjetnom inteligencijom, automatski prepoznaje jezgre, tijela i nastavke na osnovu niza vizualnih kriterija. Oni uključuju oblike, duljine, kontrast prema pozadini, omjere dimenzija i neke složenije. Svi ti elementi zajedno oblikuju skup zadanih kriterija za raspoznavanje (engl. *classifier*). U našem slučaju je bilo potrebno napraviti dva kriterija, jedan za raspoznavanje staničnih nastavaka, a drugi za raspoznavanje jezgara. Kriterij za raspoznavanje nastavaka neurona sadrži tri klase: klasu nastavci, klasu tijela i klasu pozadina. Kriterij za raspoznavanje jezgara sadrži dvije klase: klasu jezgre i klasu pozadina. Priprema kriterija za raspoznavanje je uključivala pažljivo ocrtavanje dijelova slike koji pripadaju dijelu koji želimo da program nauči prepoznavati i spremanjem tih dijelova u odgovarajuću klasu. Jednom napravljeni kriterij se sprema i koristi za sve slike dobivene istim protokolom imunocitokemije. U ovom slučaju smo kriterij za raspoznavanje nastavaka neurona oblikovan za prvi dan diferencijacije mogli uspješno koristiti za sve imunocitokemijske prikaze nastavaka neurona za sve ostale ponovljene pokuse prvog dana diferencijacije. Isto je vrijedilo za treći i za pet dan diferencijacije. Važno je uočiti kako je primjena različitih kriterija za raspoznavanje nastavaka za različite dane diferencijacije neophodna za ispravnu analizu slike jer dendriti i aksoni vremenom rastu i time postaju duži i deblji što čini veliku razliku u njihovom izgledu. Upravo je u ovome jedna od prednosti našeg algoritma u odnosu na bilo koje druge: uzimamo u obzir morfološke specifičnosti određenog stupnja diferencijacije i imamo fino podešene kriterije koji značajno smanjuju mogućnost pogreške.

Budući da u konkretnom pokusu nismo trebali mjeriti intenzitete signala na slikama, algoritam sve slike automatski pretvara u vrijednost 8-bitna. Zatim slijedi primjena spremljenog odgovarajućeg kriterija za raspoznavanje i razdvajanje imunocitokemijskog prikaza (tzv. segmentacija) čiji je krajnji rezultat mapa koja svaki piksel na fotografiji pridružuje pojedinoj klasi. Tako su npr. u mapi koja prepoznaje jezgre bijelom bojom označeni pikseli koji pripadaju jezgri, dok crna područja označavaju piksele koji pripadaju drugim elementima fotografije, odnosno drugim klasama. Iz ovoga slijedi da imamo onoliko mapa koliko imamo dijelova na koje se određeni imunocitokemijski prikaz rastavlja, odnosno segmentira (Slika 4a-d.). Slijedi postavljanje praga (engl. *threshold*) za svaku mapu kako bi se slika dodatno pročistila, odnosno kako bi se dodatno odvojio signal od pozadine. Nakon toga algoritam automatski izvrši uklanjanje čestica po površini i obliku (engl. *circularity*) pa se dobije pročišćena slika obrisa podataka koje želimo analizirati (Slika 4e. i 4f.). Iz slika obrisa podataka dobivaju se i automatski spremaju prve tablice rezultata brojnosti analiziranih objekata (Slika 4g. i 4h.), ali i još mnogo drugih informacija koje nisu bile važne za ovo istraživanje.

Nakon što smo u prethodnom koraku prebrojali nastavke, tijela neurona i jezgre, bilo je potrebno napisati algoritam kojim se kvantificira duljina i broj ogranaka neurona. Za to je prvo bilo potrebno pretvoriti obrise izdanaka živčanih stanica (Slika 5a.) u linije debljine jedan piksel koje se nazivaju kosturima (engl. *skeleton*) (Slika 5b.). Takvim linijama se zatim mjeri duljina algoritmom koji uzima za činjenicu da je svaki piksel omeđen s 8 drugih piksela, a pikseli mogu imati dvije vrijednosti boje: crnu (tamo gdje je crta od staničnog izdanaka) ili bijelu (pozadina). Crni piksel koji je omeđen samo jednim crnim pikselom smatra se rubnim (engl. *endpoint voxel*), crni piksel koji je omeđen s dva druga crna piksela smatra se spojnim pikselom (engl. *slab voxel*), a piksel koji je omeđen s više od dva crna piksela smatra se pikselom grananja (engl. *junction voxel*). Za svaki kostur koji sada predstavlja izdanak neurona, mjeri se duljina odvojaka između: dva rubna piksela, dva piksela grananja, piksela grananja i rubnog piksela. Također, mjeri se i broj pojedinih piksela koji sačinjavaju kostur i ostali podaci koje ovim istraživanjem nisu obuhvaćeni. Broj crnih piksela se zbraja i ako su uneseni podaci o omjeru koliko piksela mjeri mikrometar, rezultati duljine odvojaka se ispisuju u tablice u mikrometrima, a u suprotnom se ispisuje samo broj u pikselima (Slika 5c.). Kvantifikacija broja grananja obavlja se zbrajanjem opisanih odvojaka i upisivanjem u tablicu koliko svaki stanični izdanak (dendrit ili akson) ima grana (Slika 5d.).



Slika 4. Analiza slike u ovoj fazi pokazuje kako je program prepoznao pojedine elemente slike te u ovom primjeru sadrži tri komponente. Bijelom bojom su prikazani prepoznati pojedini elementi: nastavci neurona (b), pozadina (c) i tijela neurona (d). Na slici (e) se vidi prikaz nastavaka koji je dodatno „pročišćen“ naredbama koje uklanjaju pozadinski šum, a na slici (f) to isto za jezgre. Na (g) se vide dobiveni brojčani podaci za broj nastavaka, odnosno na (h) za broj jezgara. Crta mjerila – 100 μm .



Slika 5. Slika obrisa dendrita (a), kostur dendrita (b), tablica rezultata duljina ogranaka (c), tablica rezultata broja grananja (d).

U zaključku, algoritam koji smo razvili i koji je u neovisnom mišljenju stručnjaka s FER-a ocijenjen „vrlo inovativnim proizvodom“ i kojeg sada nazivamo „Lusca (illuminating science algorithm)“ se pokazao kao bolja opcija od svih programa koji postoje na tržištu: robusnost razlučivanja signala od pozadine značajno umanjuje lažno pozitivne i negativne piksele, program besprijekorno razlučuje jezgre od dendrita i dendrite od aksona, program analizira neograničen broj fotografija, a rezultate automatski pretvara u Excel tablice u formatu kojeg želimo. Ovim programom smo po prvi puta mogli analizirati velik broj stanica u kulturi te smo time došli do brojki koje omogućuju prepoznavanje suptilnih razlika u broju i u dimenzijama nastavaka koje prije, ručnim ili manje preciznim programima, nismo mogli razaznati.

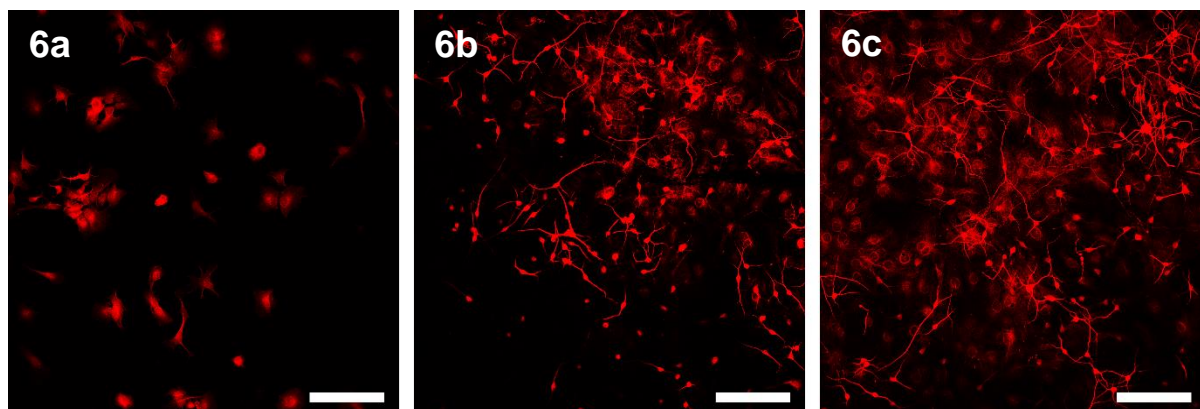
5.2. Ukupna duljina i broj ogranaka dendrita tijekom *in vitro* diferencijacije neurona u fiziološkim uvjetima normoksije se povećavaju

Kulture razvojnih preteča neurona miša, detaljno opisane u Materijalima i metodama, nasadene su kako bi se postepeno diferencirale te su fiksirane i pripremljene za morfološku analizu prvi, peti i sedmi dan diferencijacije. Imunocitokemijskim postupkom označeni su dendriti biljegom MAP2, aksoni biljegom SMI312 te jezgre bojom DAPI. Nakon fotografiranja na konfokalnom mikroskopu se pristupilo analizi razvijenim računalnim algoritmom.

Za potrebe ove analize poslikali smo 48 vidnih polja, s ukupno 3744 stanice, te smo analizirali parametre koji su, kao i dobiveni rezultati za prvi, peti i sedmi dan diferencijacije, zbirno prikazani u Tablici 3. Jasno je vidljivo kako se broj stanica, broj dendrita te njihova duljina i razgranjenost s danima diferencijacije povećava. Prikaz stanica prvog, petog i sedmog dana diferencijacije na kojima se vidi povećanje broja dendrita nalazi se na Slici 6.

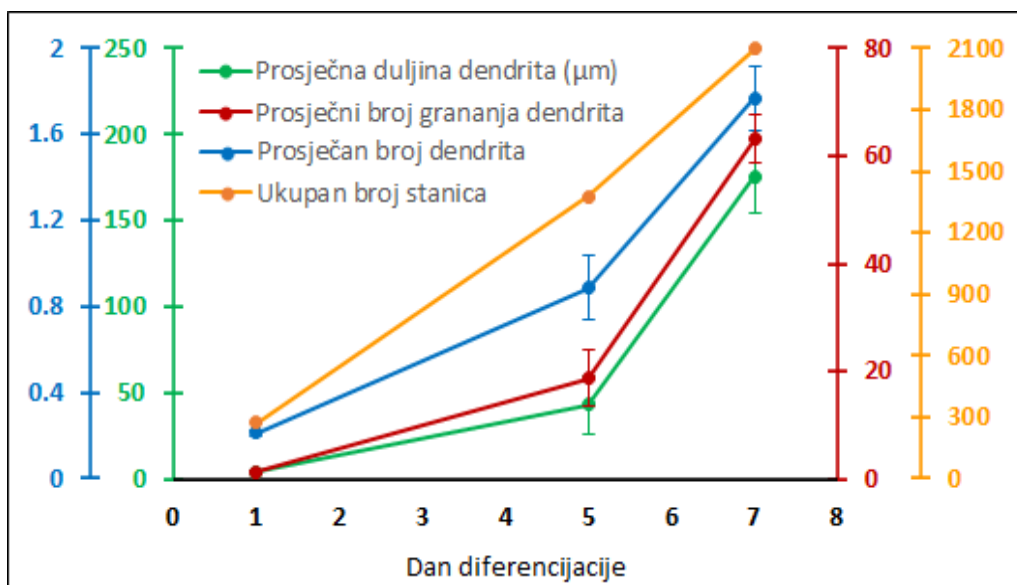
Tablica 3. Kvantitativni prikaz broja jezgara, tijela stanica koje izražavaju MAP2, dendrita, broja grananja dendrita i ukupne duljine svih dendrita po danima diferencijacije neurona koji su rasli u normoksijskim uvjetima

Dan diferencijacije	Ukupni broj stanica (DAPI jezgara)	Ukupni broj tijela stanica koje izražavaju MAP2	Ukupni broj dendrita	Ukupni broj grananja na svim dendritima	Ukupna duljina svih izmjerenih dendrita (μm)
D1	274	201	43	254	816
D5	1376	420	362	7951	17904
D7	2094	355	490	17826	49636



Slika 6. Imunocitokemijski prikaz dendrita označenih MAP2 protutijelom. Vidljivo je kako broj, duljina i razgranjenost dendrita u fiziološkim uvjetima uzgoja raste prvi (a), peti (b) i sedmi dan (c) diferencijacije. Crta mjerila – 100 μm .

Kvantitativnom analizom opisanih imunocitokemijskih prikaza po danima diferencijacije primijećena je proporcionalna povezanost vremena diferencijacije s brojem, duljinom i brojem grananja dendrita (Slika 7.)



Slika 7. Prikaz porasta broja stanica, broja i duljine dendrita te njihove razgranjenosti. Uočljivo je kako svi parametri rastu proporcionalno s danima diferencijacije stanica.

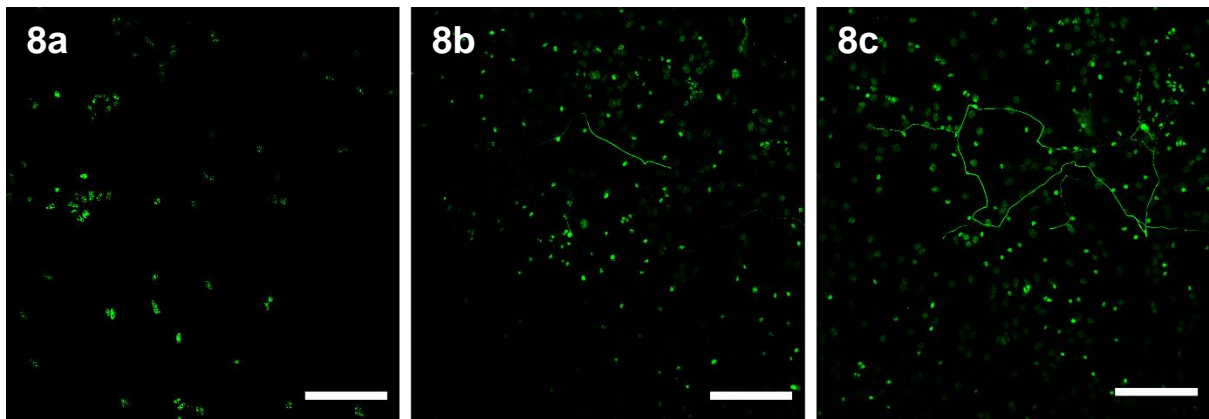
5.3. Ukupna duljina i broj ogranaka aksona tijekom *in vitro* diferencijacije neurona u fiziološkim uvjetima normoksije se povećavaju

Na istim staničnim kulturama koje smo koristili za analizu dendrita mjerili smo i parametre aksona. Aksoni su bili prepoznati pomoću biljega SMI312.

Svi dobiveni rezultati za prvi, peti i sedmi dan diferencijacije u normoksiji su zbirno prikazani u Tablici 4. Jasno je vidljivo kako se broj stanica, broj i duljina aksona te njihovo razgranjenje s danima diferencijacije povećavaju. Prikaz stanica prvog, petog i sedmog dana diferencijacije se vidi na Slici 8.

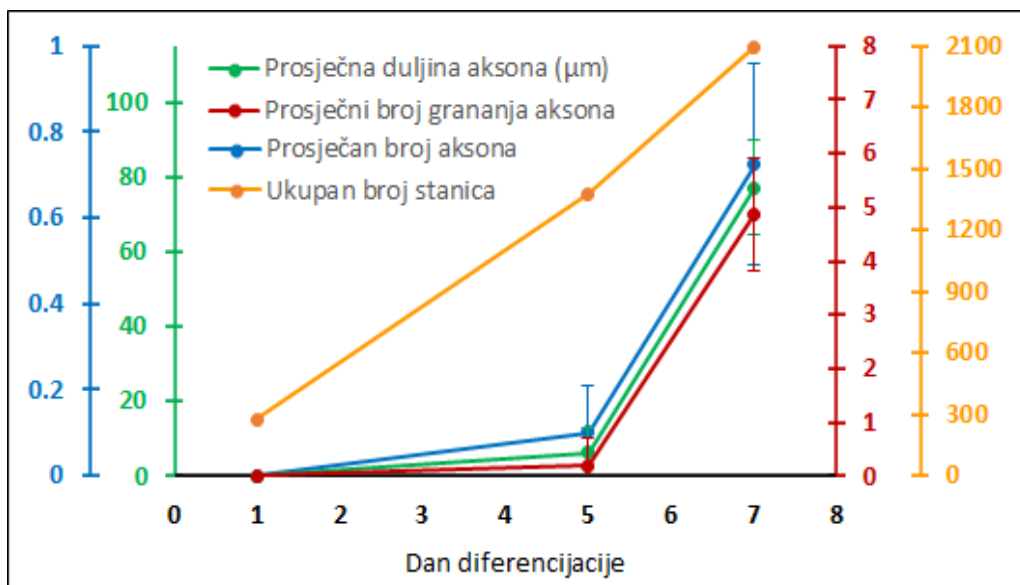
Tablica 4. Kvantitativni prikaz broja jezgara, broja tijela stanica koje izražavaju SMI312, broja aksona, broja grananja aksona i ukupne duljine svih izmjerenih aksona po danima diferencijacije prekursora neurona koji su rasli u normoksijskim uvjetima

Dan diferencijacije	Ukupni broj stanica (DAPI jezgara)	Ukupni broj tijela stanica koje izražavaju SMI312	Ukupni broj aksona	Ukupni broj grananja na svim aksonima	Ukupna duljina svih izmjerenih aksona (µm)
D1	274	251	0	0	0
D5	1376	177	19	58	1605
D7	2094	105	78	489	8018



Slika 8. Imunocitokemijski prikaz aksona označenih SMI32 protutijelom. Prvi dan diferencijacije u fiziološkim uvjetima otkriva kako aksona još nema (a). Uočljiv je porast broja, duljine i razgranjenosti između petog (b) i sedmog dana (c) diferencijacije. Crta mjerila – 100 μm .

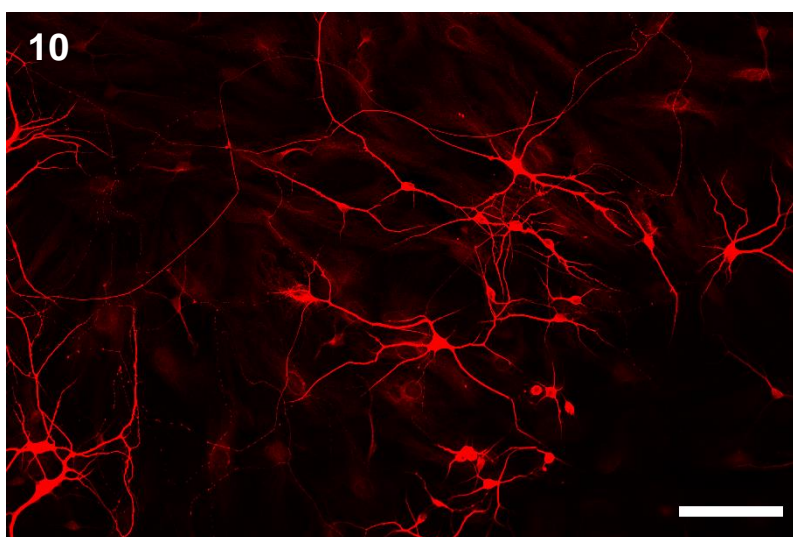
Usporedba broja, duljine i razgranjenosti aksona za sva tri dana diferencijacije razvojnih preteča neurona prikazana je na Slici 9. Primijećena je korelacija dana diferencijacije i broja ograna te dana diferencijacije i duljine aksona. Naime, više je ograna bilo što su stanice u višem stadiju diferencijacije, jednako kao što su aksoni bili dulji kod stanica koje su imale više vremena za diferencijaciju.



Slika 9. Prikaz porasta broja stanica, broja i duljine aksona te njihove razgranjenosti s vremenom diferencijacije.

5.4. Izlaganje neurona tijekom *in vitro* diferencijacije hipoksiji dovodi do porasta broja i razgranjenosti dendrita u većini analiziranih točaka

Kako bi analizirali utjecaj hipoksije na živčane stanice u diferencijaciji, stanice su prvi, peti i sedmi dan diferencijacije bile izložene hipoksiji, koncentraciji kisika od 1%, tijekom 6 sati. Nakon 4 sati reoksigenacije su fiksirane te imunocitokemijski označene. Kvantitativna analiza duljine i broja grananja dendrita je napravljena koristeći isti program kao i za analizu stanica koje su uzgajane u fiziološkim uvjetima. Primjer jednog imunocitokemijskog prikaza korištenog za analizu je na Slici 10. Rezultati kvantifikacije ukupnog broja jezgara, broja tijela neurona koja izražavaju MAP2, broja dendrita, broja grananja dendrita i ukupne duljine svih izmjerenih dendrita po danima diferencijacije prekursora neurona izloženih hipoksijskoj ozljedi su zbirno prikazani u Tablici 5.



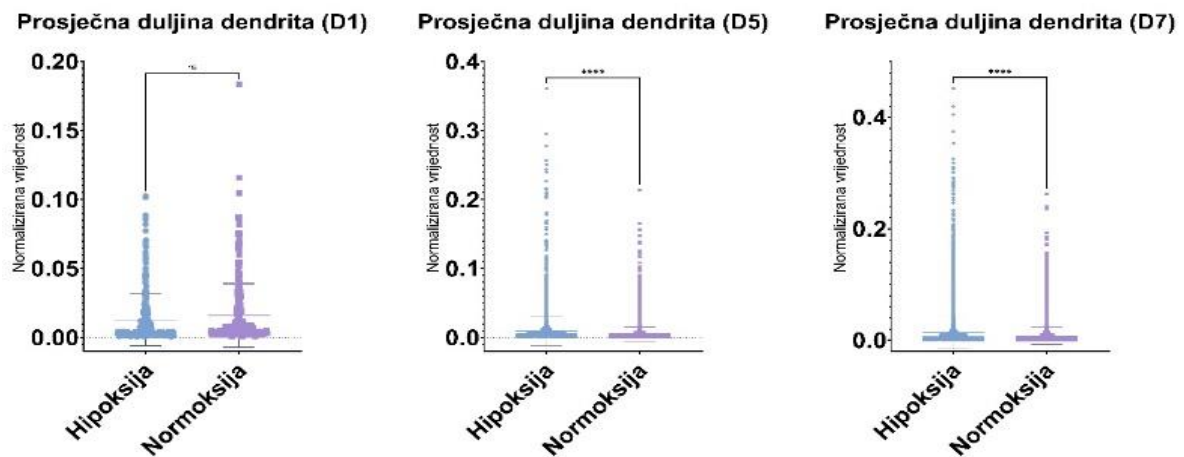
Slika 10. Imunocitokemijski prikaz dendrita neurona starih sedam dana nakon hipoksijske ozljede. Crta mjerila – 100 μm .

Tablica 5. Kvantitativni prikaz broja jezgara, broja tijela neurona koji izražavaju MAP2, broja dendrita, broja grananja dendrita i ukupne duljine svih izmjerenih dendrita po danima diferencijacije prekursora neurona izloženih hipoksijskoj ozljedi.

Dan diferencijacije	Ukupni broj stanica (DAPI jezgara)	Ukupni broj tijela neurona koji izražavaju MAP2	Ukupni broj dendrita	Ukupni broj grananja na svim dendritima	Ukupna duljina svih izmjerenih dendrita (μm)
D1	468	313	63	335	1344
D5	431	214	167	4722	9844
D7	1010	229	319	9605	31376

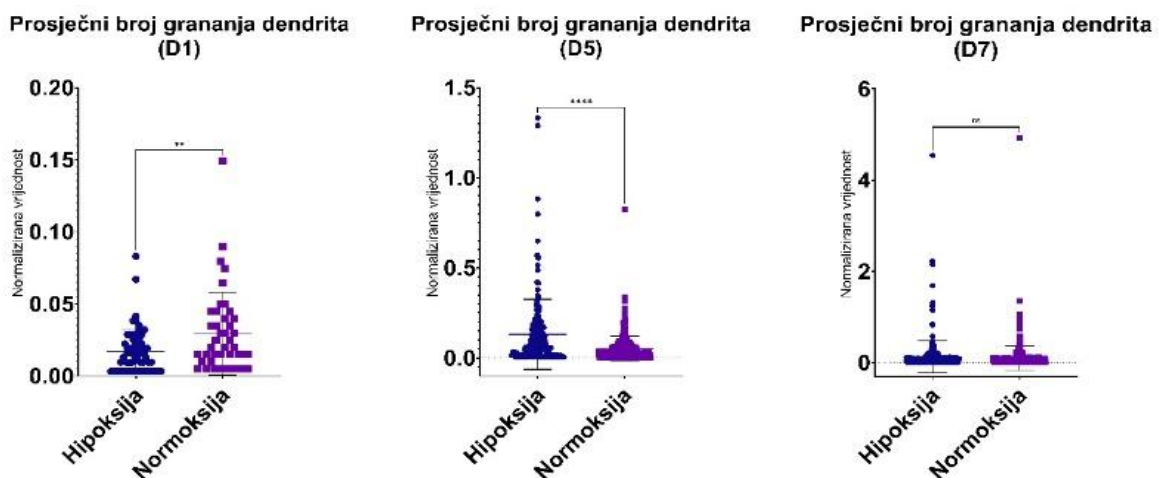
Dobiveni podaci su uspoređeni između živčanih matičnih stanica diferenciranih do prvog, petog i sedmog dana u normoksiji i stanica koji su na prvi, peti i sedmi dan diferencijacije bile izložene šest sati hipoksiji. Rezultati usporedbe i statističke analize prikazani su na Slikama 11. i 12.

Usporedba stanica koje su bile izložene hipoksiji i njihovih normoksijskih kontrola nam je otkrila kako prvog dana diferencijacije nema statistički značajne razlike u duljini dendrita. Ipak, velika razlika se nalazi 5. i 7. dana diferencijacije, kada hipoksija dovodi do toga da se dendriti produljuju u odnosu na kontrolnu skupinu (za oba dana $p < 0.001$).



Slika 11. Grafički prikaz usporedbe prosječne duljine dendrita normaliziranih po broju tijela neurona koji izražavaju MAP2 između stanica izloženih hipoksiji i normoksiji u 1. (D1), 5. (D5) i 7. (D7) danu diferencijacije. Vidljivo je kako hipoksija značajno povećava duljinu dendrita u zrelijim pretečama neurona (D5 i D7).

Nakon što smo usporedili ukupnu duljinu dendrita između fizioloških i hipoksijskih uvjeta, analizirali smo utjecaj hipoksije na broj sekundarnih organaka dendrita. Kada smo usporedili broj svih grananja dendrita između stanica izloženih hipoksiji i njihovih normoksijskih kontrola, našli smo kako na prvom danu diferencijacije postoji mala statistički vidljiva razlika ($p < 0.001$), i to na način da je broj grana dendrita nešto veći u normoksijskim uvjetima. Potpuno suprotno, peti dan diferencijacije se nalazi kako je broj razgranjenja dendrita mnogo veći u stanica koje su bile izložene hipoksiji ($p < 0.001$). Sedmog dana diferencijacije se ne nalazi da izlaganje stanica hipoksiji utječe na broj razgranjenja. Grafički prikaz rezultata statističke analize prikazani su na Slici 12.

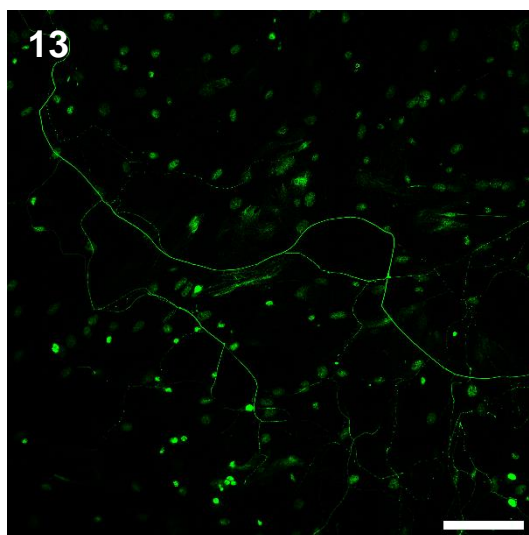


Slika 12. Grafički prikaz usporedbe prosječnog broja grananja dendrita normaliziranih po broju tijela neurona koji izražavaju MAP2 između stanica izloženih hipoksiji i normoksiji u prvom (D1), petom (D5) i sedmom (D7) danu

diferencijacije. Vidljivo je kako 5. dana diferencijacije hipoksija djeluje tako da značajno povećava broj ogranaka dendrita.

5.5. Izlaganje neurona tijekom *in vitro* diferencijacije hipoksiji ne utječe na porast broja i razgranjenosti aksona

Kako bi analizirali utjecaj hipoksijskog oštećenja na živčane stanice u diferencijaciji, stanice su prvi, peti i sedmi dan diferencijacije bile izložene hipoksiji, koncentraciji kisika od 1%, tijekom 6 sati. Nakon 4 sata reoksigenacije su fiksirane te imunocitokemijski označene. Kvantitativna analiza duljine i broja grananja aksona je napravljena koristeći isti program kao za analizu stanica koje su uzgajane u fiziološkim uvjetima. Rezultati kvantifikacije ukupnog broja jezgara, broja tijela neurona koja izražavaju SMI312, broja aksona, broja grananja aksona i ukupne duljine svih izmjerenih aksona po danima diferencijacije prekursora neurona izloženih hipoksijskoj ozljedi su zbirno prikazani u Tablici 8. Primjer jednog imunocitokemijskog prikaza korištenog za analizu je na Slici 13.



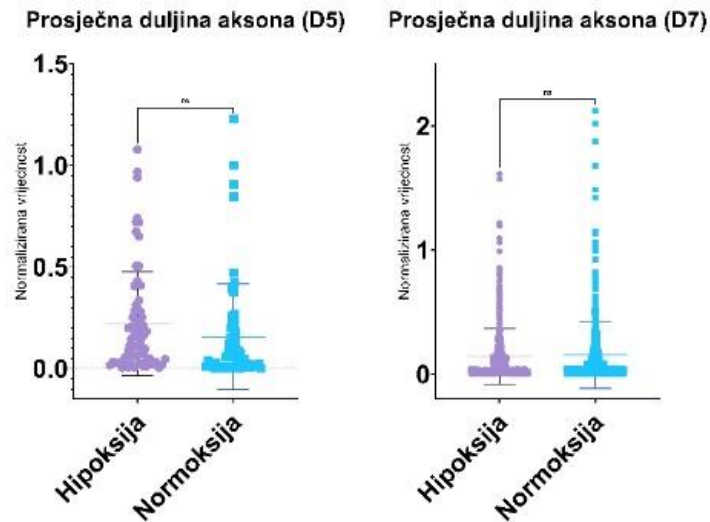
Slika 13. Imunocitokemijski prikaz aksona neurona starih sedam dana nakon izlaganja hipoksiji. Crta mjerila – 100 μm .

Tablica 8. Kvantitativni prikaz broja jezgara, broja tijela neurona pozitivnih na SMI312, broja aksona, broja grananja aksona i ukupne duljine svih izmjerenih aksona po danima diferencijacije prekursora neurona izloženih hipoksijskoj ozljedi

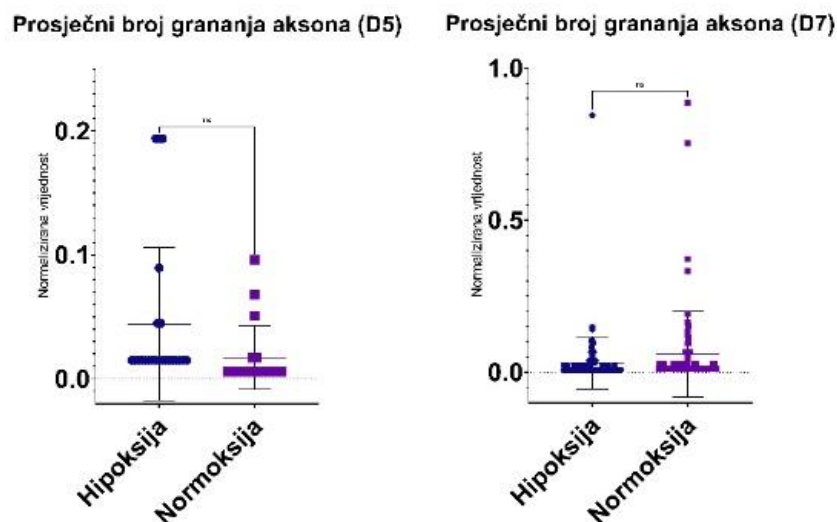
Dan diferencijacije	Ukupni broj stanica (DAPI jezgara)	Ukupni broj tijela neurona pozitivnih na SMI312	Ukupni broj aksona	Ukupni broj grananja na svim aksonima	Ukupna duljina svih izmjerenih aksona (μm)
D1	468	385	0	0	0
D5	431	67	23	70	1005
D7	1010	135	106	442	8492

Prvog dana diferencijacije stanica izloženih normoksiji i hipoksijskoj ozljedi nije bilo aksona, odnosno SMI312 pozitivnih nastavaka. Stoga su dobiveni podaci statistički uspoređeni između živčanih matičnih stanica diferenciranih do petog i sedmog dana u normoksiji i stanica koji su na peti i sedmi dan diferencijacije bile izložene šest sati hipoksiji.

Usporedbom duljine i razgranjenosti aksona peti i sedmi dan diferencijacije nisu nađene statističke značajne razlike (Slika 14. i 15.).



Slika 14. Grafički prikaz usporedbe prosječne duljine aksona normaliziranih po broju tijela neurona pozitivnih na SMI312 između stanica izloženih hipoksiji i normoksiji u petom (D5) i sedmom (D7) danu diferencijacije. Nisu nađene statistički značajne razlike.



Slika 15. Grafički prikaz usporedbe prosječnog broja grananja aksona normaliziranih po broju tijela pozitivnih na SMI312 između stanica izloženih hipoksiji i normoksiji u petom (D5) i sedmom (D7) danu diferencijacije. Nisu nađene statistički značajne razlike.

6. RASPRAVA

Iako se razumijevanje građe, funkcije, a time i bolesti živčanog sustava svakodnevno povećava, neuroznanost i neurologija značajno zaostaju za većinom drugih područja medicine. Razloge tome možemo primarno tražiti u iznimno kompleksnoj strukturi živčanog tkiva koje se sastoji od velikog broja stanica koje se povezuju staničnim nastavcima. Upravo je pružanje nastavaka kojima stanice međusobno koordiniraju svoje aktivnosti jedno od temeljnih elemenata živčanog sustava.

Budući da je hipoksijsko oštećenje jedno od najčešćih uzroka teških, a često i doživotnih patoloških stanja, postavili smo pitanje kako hipoksija utječe na duljinu i razgranjenost nastavaka živčanih stanica. Budući da ne možemo donijeti značajne zaključke promatrajući pojedine stanice ili mali broj stanica, prvo smo morali ispuniti preduvjet postojanja dovoljno dobrog *in vitro* modela te dovoljno dobre metode koja će nam omogućiti kvantifikaciju velikog broja staničnih nastavaka.

Kultura živčanih matičnih stanica miša je već desetljećima osnovno oruđe u analizi staničnih zbivanja na neuronima u razvoju. Model se u našem laboratoriju koristi već preko dvadeset godina i predstavlja pouzdanu ulaznu točku analiza živčanih stanica u razvoju. Brojne publikacije potvrđuju pouzdanu vezu između kultura mišjih i ljudskih neurona (Nat i Dechant, 2011; Ogura i ostali, 2021), a otkrića na mišjim kulturama se nerijetko uspješno prevode i u kliničke pokuse (Marsh i Blurton-Jones, 2017).

Kada smo počeli birati program koji bi nam omogućio analizu velikog broja stanica i kvantifikaciju željenih parametara, suočili smo se s neočekivanim problemom: niti jedan od programa često korištenih i spominjanih u literaturi za slične zadatke nije mogao obaviti ono što nam je bilo potrebno. Za potrebe ovog istraživanja testirali smo nekoliko pristupa u obradi imunocitokemijskog prikaza: program za obradu slika CellProlifer, program Imaris, program MATLAB, AxonTracer (jedan od *plugin*-a za ImageJ) te NeuronJ (*plugin* za ImageJ). CellProfiler je besplatan program prilagođen analizi stanica što ga čini lako dostupnim i široko upotrebljavanim. Ipak, iako ovaj program nudi brojne opcije, nema razrađene načine kako razdvojiti tijela neurona pozitivna na biljege MAP2 i SMI312 od staničnih nastavaka i pozadine prikaza. Nadalje, za analizu slika za potrebe laboratorija kupljen je i instaliran na superračunalo osnovni paket programa Imaris čija je cijena bila oko 100 000 kuna što ga čini slabo dostupnim u široj populaciji. Program primarno koristimo u analizi kolokalizacija 3D signala i za to je besprijekoran. Međutim, kada smo krenuli istraživati opcije programa Imaris za analizu staničnih nastavaka, doznali smo kako bi program bilo potrebno nadograditi još jednim od paketa koji koštaju dodatnih stotinjak tisuća kuna. Program MATLAB je također jedan od programa koji se treba kupiti kako bi se mogao službeno koristiti. Za analizu nastavaka nas je najviše zanimao algoritam 3DMorph pisan u programskom jeziku MATLAB-a (York i ostali, 2018). 3DMorph pruža automatsku analizu morfologije mikroglije pa smo se nadali kako će nam jednako dobro analizirati i neurone. Međutim, program na neprihvatljiv način obuhvaća tijela stanica u izračunu duljine nastavaka, čime stanice koje imaju velika izdužena tijela budu lažno prepoznate kao one koje imaju dulje nastavke od drugih stanica. Takav način kvantifikacije je možda dobar za mikrogliju, ali je za neurone posve neprihvatljiv. Idući pokušaj je bila instalacija dodatka (*plugin*) za program ImageJ, AxonTracer (Patel i ostali, 2018). Program i *plugin* mogu se instalirati relativno jednostavno, međutim AxonTracer nije mogao dovoljno dobro diferencirati stanice od pozadine pa smo se posvetili istraživanju drugog *plugin*a ImageJ-a, NeuronJ (Pemberton i ostali, 2018). Nedostatak NeuronJ-a se pokazao u tome što bi se svi nastavci trebali kvantificirati ručno, što bi oduzelo previše vremena zbog velike količine nastavaka na pojedinačnim imunocitokemijskim prikazima kao i velikog broja

samih fotografija koje je trebalo obraditi za dobivanje statistički značajne veličine uzorka stanica. Zbog svega navedenog, razvili smo novi vlastiti algoritam za kvantitativnu analizu neurona koji uspješno radi sljedeće: precizno razdvaja tijela neurona, aksone i dendrite od pozadine te na neograničenom broju stanica prebrojava i pruža sljedeće podatke: brojnost stanica, brojnost staničnih nastavaka, duljinu staničnih nastavaka te količinu grananja pojedinih staničnih nastavaka. Algoritam je demonstriran istraživačima s FER-a, koji su stručnjaci u analizi slike i oni su ga proglasili „vrlo inovativnim“.

Prva testiranja programa proveli smo na stanicama diferenciranim u normoksiji. Analizom rezultata mjerenja dobivenih koristeći naš program dobili smo očekivani proporcionalni porast duljine i broja ogranaka staničnih nastavaka (dendrita i aksona) s vremenom koje stanice provedu u diferencijaciji. Također su se te brojke vrlo dobro slagale s onima dobivenima ručno. Time smo dokazali kako naš program može izvršiti preciznu i pouzdanu automatsku kvantifikaciju duljine i razgranjenosti staničnih nastavaka.

Nakon što smo razvili program koji provjereno radi to što želimo, dobili smo mogućnost odgovoriti na pitanje kako hipoksija utječe na neurone u razvoju. Usporedba prekursora neurona izloženih šestosatnoj hipoksiji na prvi, peti i sedmi dan diferencijacije je pokazala kako su dendriti mnogo osjetljiviji na promjene kisika od aksona. Iako nismo našli podatke o nekom drugom istraživanju koje je koristilo stanične kulture neurona, ovaj nalaz je donekle očekivan. Naime, promjena duljine i razgranjenosti dendrita se mijenja u raznim stanjima te se primjerice povezuje s učenjem i pamćenjem (Woolf, 1998). Drugi primjer je utjecaj psihotropnih sredstava, za koje je pokazano da primarno djeluju na duljinu dendrita (DePoy i Gourley, 2015). Titus i autori su istraživali utjecaj hipoksije i promjene tlaka na štakore te na grananje dendrita u hipokampusu (Titus i ostali, 2007). Pokazali su da dulje izlaganje hipoksiji smanjuje grananje dendrita. Ipak, između ovog i našeg istraživanja postoji velika razlika: oni su koristili kamera lucida tehnologiju, nakon koje su ručno izradene crteže skenirali i ručno obrađivali. Ovakvim pristupom su za svaku životinju mogli analizirati samo jednu vremensku točku, a morali su utrošiti mjesec kako bi obradili stotinjak stanica. Našim pristupom možemo analizirati desetke tisuća stanica u neograničenom broju vremenskih točaka. Rezultat sličan našem, na novorođenim štakorima su opisali Raman i suradnici: opisuju kako se u kroničnoj hipoksiji produljuju neki elementi dendrita u hipokampusu (Raman i ostali, 2008).

Studije na životinjama imaju ograničenje što ne mogu pratiti iste neurone u različitim vremenskim točkama. Mi smo, u istoj kulturi bili sposobni pokazati kako različiti stadiji neurona pokazuju različitu osjetljivost na hipoksiju. Rani prekursori (prvi dan diferencijacije) nisu pokazali razliku u odnosu na kontrole, ali su zato zreliji prekursori mnogo jače reagirali na hipoksiju (peti i sedmi dan diferencijacije). Ovo odgovara našim opažanjima kako osjetljivost na hipoksijsko oštećenje raste sa stupnjem diferencijacije neurona, a slaže se i s kliničkim opažanjima gdje se zna da perinatalno hipoksijsko oštećenje ostavlja trajnije posljedice kod starije prerano rođene djece. Ovo opažanje bi se možda moglo povezati i s aktivnošću telomerase. Naime, prilikom pojave oksidativnog stresa proteini telomerazne reverzne transkriptaze premještaju se iz jezgre u mitohondrije te tako štite stanicu, ali i pokreću razna druga zbivanja (Wu i ostali, 2020). Budući da se preteče neurona diferenciraju iz matičnih stanica u kojima je enzim telomeraza aktivan, razvidno je pretpostaviti kako se nezreliji stadiji ponašaju drugačije od onih starijih, u kojima telomerazna reverzna transkriptaza više nije aktivna.

Istovremeno, naše istraživanje je pokazalo kako hipoksija od 6 sati ne utječe na duljinu aksona. Razloge toga treba tražiti u tome što aksoni nisu toliko uključeni u reorganizaciju i plastičnost živčanog sustava kao dendriti te zbog

toga što su izmjerene duljine aksona bile vrlo velike. Stoga je moguće da 6 sati hipoksije i 4 sata reoksigenacije nije dovoljno vrijeme izloženosti stanica da uočimo razlike koje bi bile statistički značajne.

Do sada je istraženo mnogo molekularnih čimbenika koji utječu na duljinu nastavaka. Također je poznato mnogo molekularnih odgovora koji se aktiviraju prilikom izlaganja stanica hipoksiji. Istraživanja koja se bave rastom nastavaka izloženih hipoksiji su još uvijek malobrojna, stoga je teško tvrditi zašto su dendriti izloženi hipoksiji tijekom 6 sati i nakon 4 sata reoksigenacije dulji od njihovih kontrola. Ipak, pažljivim čitanjem literature smo došli do mogućih objašnjenja. Kao prvo, intermitentna hipoksija smanjuje oksidativni metabolizam mitohondrija, čime se smanjuje i broj ATP molekula. Smanjenje ATP-a djeluje na stanične transportere, između ostalog i na Ca^{2+} transportere u staničnoj membrani. Citosolno povećanje razine Ca^{2+} vezanjem za kalmodulin aktivira ksantin oksidazu koja prethodi aktivaciji NADPH oksidaze (NOX) (Nanduri i ostali, 2015). Ksantin oksidaza i NOX enzimi povećavaju proizvodnju slobodnih kisikovih radikala. Slobodni radikali kisika stabiliziraju α podjedinicu HIF-1, ali također imaju i velik utjecaj na živčane matične stanice. Istraživanja rađena na primarnim kortikalnim neuronima pokazuju da upravo reaktivni kisikovi radikali sudjeluju u diferencijaciji živčanih matičnih stanica, ali i u produljenju nastavaka živčanih stanica (Olguín-Albuerna i Morán, 2018; Terzi i Suter, 2020). HIF-1 aktivira važne signalne puteve i transkripciju sljedećih molekula koji dalje sudjeluju u rastu staničnih nastavaka: NF κ B, VEGF, Wnt/ β -catenin (Bonini i ostali, 2011; Fernando i ostali, 2014; Genetos i ostali, 2010). Još jedan molekularni put koji je posredovan aktivacijom HIF-1 je onaj koji djeluje na receptor retinoične kiseline β . Tako aktiviran HIF-1 sudjeluje u migraciji mitohondrija prema rastućem kraju nastavka. Povećanjem broja mitohondrija na rastućem kraju nastavka neurona povećava se i sinteza molekula čije su veze bogate energijom što dovodi do bržeg rasta nastavaka (Trigo i ostali, 2019). Istraživanjem stanja smanjene koncentracije kisika u literaturi naišli smo i na podatak kako se prilikom hipoksije u mozgu štakora povećava razina pro-apoptotičkih i anti-apoptotičkih proteina Bax, Bcl-2 i Bcl-x1 (Ferrer i ostali, 1997). Zanimljivo je da ti proteini pozitivno utječu na produljivanje staničnih nastavaka (Lentz i ostali, 1999; Park i ostali, 2015).

U zaključku, program koji smo razvili omogućuje precizno prebrojavanje i mjerenje tijela, dendrita i aksona živčanih stanica u razvoju, a posebno je važno što omogućuje automatsku analizu neograničenog broja stanica. Ovom metodom smo analizirali vrlo velik broj stanica ($n=3744$) te smo tako bili u stanju uočiti i suptilne razlike koje bi ostale nezamijećene u analizi mnogo manjeg broja stanica koje bi mogli obraditi ručno. Generalno, hipoksija jače djeluje na starije razvojne preteče neurona i to na način da produljuje njihove dendrite. Također, uočili smo značajno povećanje razgranjenosti dendrita u točno određenom vremenskom prozoru. Razvijeni postupci, kultura stanica i vlastiti razvijeni program će nam omogućiti nastavak niza istraživanja u kojima ćemo moći, po potrebi i u realnom vremenu, zamijetiti i kvantificirati suptilne promjene u staničnoj morfologiji.

7. ZAKLJUČCI

1. Kompjuterski program koji smo sami razvili („Lusca“) omogućuje preciznu, brzu i automatiziranu analizu broja tijela neurona te broja, duljine i razgranjenosti njihovih nastavaka. Usporedba s drugim programima pokazuje kako je precizniji od drugih sličnih programa te je jedini koji omogućuje jednostavnu analizu neograničenog broja vidnih polja u istom postupku.

2. Analiza broja i razgranjenosti dendrita razvojnih preteča neurona miša uzgajanih 7 dana u fiziološkim uvjetima je pokazala očekivanu povezanost vremena diferencijacije s brojem stanica te duljinom i brojem grananja dendrita.

3. Analiza broja i razgranjenosti aksona razvojnih preteča neurona miša uzgajanih 7 dana u uvjetima normoksije je pokazala očekivani proporcionalan odnos između vremena koje stanice provedu u diferencijaciji i broja stanica, duljine aksona te razgranjenosti aksona.

4. Izlaganje razvojnih preteča neurona miša šestosatnoj hipoksiji nakon koje je slijedila četverosatna reoksigenacija je u usporedbi s kontrolama uzgajanim u fiziološkim uvjetima imalo za posljedicu promjenu u duljini i razgranjenosti dendrita. Hipoksija djeluje na starije razvojne stadije neurona (peti i sedmi dan diferencijacije) tako što im povećava duljinu i broj ogranaka dendrita. Kod mlađih razvojnih preteča (prvi dan diferencijacije) hipoksija nije imala učinak na broj i razgranjenost dendrita.

5. Izlaganje razvojnih preteča neurona miša šestosatnoj hipoksiji nakon koje je slijedila četverosatna reoksigenacija u usporedbi s kontrolama uzgajanim u fiziološkim uvjetima nije utjecalo na duljinu i razgranjenost aksona.

8. ZAHVALA

Želim se zahvaliti profesoru Dinku Mitrečiću na velikom strpljenju i povjerenju tijekom izrade ovog rada, dragocjenim savjetima i razgovorima o uzbudljivim znanstvenim temama koje smo obuhvatili ovim istraživanjem, dostupnosti i otvorenosti za raspravljanje o pitanjima na koja sam nailazila te nesebičnoj podršci i vjeri u mene u teškim trenucima. Uvodeći me u predivan svijet znanosti uspio je na mene prenijeti svoj iskreni zanos, predanost i ljubav za istraživanje.

9. POPIS LITERATURE

- Bartoszewska, S., Kochan, K., Piotrowski, A., Kamysz, W., Ochocka, R. J., Collawn, J. F., i Bartoszewski, R. (2015). The hypoxia-inducible miR-429 regulates hypoxia-inducible factor-1 α expression in human endothelial cells through a negative feedback loop. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 29(4), 1467–1479.
- Bonini, S. A., Ferrari-Toninelli, G., Uberti, D., Montinaro, M., Buizza, L., Lanni, C., Grilli, M., i Memo, M. (2011). Nuclear factor κ B-dependent neurite remodeling is mediated by Notch pathway. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(32), 11697–11705.
- Bonkowski, J. L., i Son, J.-H. (2018). Hypoxia and connectivity in the developing vertebrate nervous system. *Disease Models & Mechanisms*, 11(12).
- Cameron, H. A., i Glover, L. R. (2015). Adult neurogenesis: beyond learning and memory. *Annual Review of Psychology*, 66, 53–81.
- Chidambaram, S. B., Rathipriya, A. G., Bolla, S. R., Bhat, A., Ray, B., Mahalakshmi, A. M., Manivasagam, T., Thenmozhi, A. J., Essa, M. M., Guillemin, G. J., Chandra, R., i Sakharkar, M. K. (2019). Dendritic spines: Revisiting the physiological role. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 92, 161–193.
- Davoust, C., Plas, B., Bédier, A., Demain, B., Salabert, A.-S., Sol, J. C., Vieu, C., Vaysse, L., i Loubinoux, I. (2017). Regenerative potential of primary adult human neural stem cells on micropatterned bio-implants boosts motor recovery. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), 253.
- DePoy, L. M., i Gourley, S. L. (2015). Synaptic Cytoskeletal Plasticity in the Prefrontal Cortex Following Psychostimulant Exposure. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 16(9), 919–940.
- Deuber, C., i Terhaar, M. (2011). Hyperoxia in very preterm infants: a systematic review of the literature. *The Journal of Perinatal & Neonatal Nursing*, 25(3), 268–274.
- Engle, E. C. (2010). Human genetic disorders of axon guidance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(3), a001784.
- Fernando, C. V., Kele, J., Bye, C. R., Niclis, J. C., Alsanie, W., Blakely, B. D., Stenman, J., Turner, B. J., i Parish, C. L. (2014). Diverse roles for Wnt7a in ventral midbrain neurogenesis and dopaminergic axon morphogenesis. *Stem Cells and Development*, 23(17), 1991–2003.
- Ferrer, I., Pozas, E., López, E., i Ballabriga, J. (1997). Bcl-2, Bax and Bcl-x expression following hypoxia-ischemia in the infant rat brain. *Acta Neuropathologica*, 94(6), 583–589.
- Genetos, D. C., Cheung, W. K., Decaris, M. L., i Leach, J. K. (2010). Oxygen tension modulates neurite outgrowth in PC12 cells through a mechanism involving HIF and VEGF. *Journal of Molecular Neuroscience : MN*, 40(3), 360–366.
- Gilmore, J. H. (2010). Understanding what causes schizophrenia: a developmental perspective. U *The American journal of psychiatry* (Sv. 167, Izdanje 1, str. 8–10).
- Grochowski, C., Radzikowska, E., i Maciejewski, R. (2018). Neural stem cell therapy-Brief review. *Clinical*

Neurology and Neurosurgery, 173, 8–14.

Guyton, A. C., i Hall, J. E. (2017). *Medicinska fiziologija* (13. izd.). Zagreb: Medicinska naklada. (str. 564).

Hribljan, V., Salamon, I., Đemaili, A., Alić, I., i Mitrečić, D. (2018). Transplantation of neural stem cells in the mouse model of ischemic brain stroke and expression of genes involved in programmed cell death. *Croatian Medical Journal*, 59(5), 203–212.

Junquiera, L. C., i Carniero, J. (2005). *Osnove histologije* (10. am. iz). Zagreb: Školska knjiga. (str. 161-189).

Ke, Q., i Costa, M. (2006). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Molecular Pharmacology*, 70(5), 1469–1480.

Koh, M. Y., i Powis, G. (2012). Passing the baton: the HIF switch. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(9), 364–372.

Lentz, S. I., Knudson, C. M., Korsmeyer, S. J., i Snider, W. D. (1999). Neurotrophins support the development of diverse sensory axon morphologies. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(3), 1038–1048.

Majmundar, A. J., Wong, W. J., i Simon, M. C. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular Cell*, 40(2), 294–309.

Marsh, S. E., i Blurton-Jones, M. (2017). Neural stem cell therapy for neurodegenerative disorders: The role of neurotrophic support. *Neurochemistry International*, 106, 94–100.

Martin, R. J., Wang, K., Köroğlu, O., Di Fiore, J., i Kc, P. (2011). Intermittent hypoxic episodes in preterm infants: do they matter? *Neonatology*, 100(3), 303–310.

Nanduri, J., Vaddi, D. R., Khan, S. A., Wang, N., Makarenko, V., Semenza, G. L., i Prabhakar, N. R. (2015). HIF-1 α activation by intermittent hypoxia requires NADPH oxidase stimulation by xanthine oxidase. *PLoS One*, 10(3), e0119762.

Nat, R., i Dechant, G. (2011). Milestones of directed differentiation of mouse and human embryonic stem cells into telencephalic neurons based on neural development in vivo. *Stem Cells and Development*, 20(6), 947–958.

Ogura, C., Hirano, K., Mizumoto, S., Yamada, S., i Nishihara, S. (2021). Dermatan sulphate promotes neuronal differentiation in mouse and human stem cells. *Journal of Biochemistry*, 169(1), 55–64.

Olgúin-Albuerno, M., i Morán, J. (2018). Redox Signaling Mechanisms in Nervous System Development. *Antioxidants & Redox Signaling*, 28(18), 1603–1625.

Omotade, O. F., Pollitt, S. L., i Zheng, J. Q. (2017). Actin-based growth cone motility and guidance. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 84, 4–10.

Pang, A.-L., Xiong, L.-L., Xia, Q.-J., Liu, F., Wang, Y.-C., Liu, F., Zhang, P., Meng, B.-L., Tan, S., i Wang, T.-H. (2017). Neural Stem Cell Transplantation Is Associated with Inhibition of Apoptosis, Bcl-xL Upregulation, and Recovery of Neurological Function in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *Cell Transplantation*, 26(7), 1262–1275.

Park, H.-A., Licznerski, P., Alavian, K. N., Shanabrough, M., i Jonas, E. A. (2015). Bcl-xL is necessary for neurite outgrowth in hippocampal neurons. *Antioxidants & Redox Signaling*, 22(2), 93–108.

- Patel, A., Li, Z., Canete, P., Strobl, H., Dulin, J., Kadoya, K., Gibbs, D., i Poplawski, G. H. D. (2018). AxonTracer: a novel ImageJ plugin for automated quantification of axon regeneration in spinal cord tissue. *BMC Neuroscience*, 19(1), 8.
- Pemberton, K., Mersman, B., i Xu, F. (2018). Using ImageJ to Assess Neurite Outgrowth in Mammalian Cell Cultures: Research Data Quantification Exercises in Undergraduate Neuroscience Lab. *Journal of Undergraduate Neuroscience Education : JUNE : A Publication of FUN, Faculty for Undergraduate Neuroscience*, 16(2), A186–A194.
- Petz, B., Kolesarić, V., i Ivanec, D. (2012). *Petzova statistika*. Jastrebarsko, Naklada Slap. (str. 15-189).
- Raman, L., Hamilton, K. L., Gewirtz, J. C., i Rao, R. (2008). Effects of chronic hypoxia in developing rats on dendritic morphology of the CA1 subarea of the hippocampus and on fear-potentiated startle. *Brain Research*, 1190, 167–174.
- Reich, B., Hoerber, D., Bendix, I., i Felderhoff-Mueser, U. (2016). Hyperoxia and the Immature Brain. *Developmental Neuroscience*, 38(5), 311–330.
- Sadler, T. W. (2008). *Langmanova medicinska embriologija* (10. izd.). Zagreb: Školska knjiga. (str. 287-295).
- Terzi, A., i Suter, D. M. (2020). The role of NADPH oxidases in neuronal development. *Free Radical Biology & Medicine*, 154, 33–47.
- Titus, A. D. J., Shankaranarayana Rao, B. S., Harsha, H. N., Ramkumar, K., Srikumar, B. N., Singh, S. B., Chattarji, S., i Raju, T. R. (2007). Hypobaric hypoxia-induced dendritic atrophy of hippocampal neurons is associated with cognitive impairment in adult rats. *Neuroscience*, 145(1), 265–278.
- Trigo, D., Goncalves, M. B., i Corcoran, J. P. T. (2019). The regulation of mitochondrial dynamics in neurite outgrowth by retinoic acid receptor β signaling. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(6), 7225–7235.
- Woolf, N. J. (1998). A structural basis for memory storage in mammals. *Progress in Neurobiology*, 55(1), 59–77.
- Wu, L., Fidan, K., Um, J.-Y., i Ahn, K. S. (2020). Telomerase: Key regulator of inflammation and cancer. *Pharmacological Research*, 155, 104726.
- Yan, J., Goerne, T., Zelmer, A., Guzman, R., Kapfhammer, J. P., Wellmann, S., i Zhu, X. (2019). The RNA-Binding Protein RBM3 Promotes Neural Stem Cell (NSC) Proliferation Under Hypoxia. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 288.
- York, E. M., LeDue, J. M., Bernier, L.-P., i MacVicar, B. A. (2018). 3DMorph Automatic Analysis of Microglial Morphology in Three Dimensions from Ex Vivo and In Vivo Imaging. *ENeuro*, 5(6).
- Zhang, K., Zhu, L., i Fan, M. (2011). Oxygen, a Key Factor Regulating Cell Behavior during Neurogenesis and Cerebral Diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 4, 5.

10. SAŽETAK

Iva Šimunić

Izlaganje neurona miša tijekom diferencijacije hipoksiji povećava duljinu i razgranjenost dendrita u razvojno zrelijim stanicama

Osnovno obilježje živčanih stanica je velik broj nastavaka kojima se one međusobno povezuju te tako omogućuju obavljanje svih uloga živčanog sustava. Budući da je broj nastavaka i njihovo razgranjenje dinamički parametar, mijenja se u brojnim bolestima, ali i tijekom razvoja živčanog sustava. Prvi cilj ovog rada je bio razvoj računalnog algoritma za razlikovanje aksona, dendrita i tijela neurona koji mjeri duljine i razgranjenost staničnih nastavaka. Budući da su najčešće bolesti živčanog sustava uzrokovane hipoksijom, nakon uspješno razvijenog programa smo istražili kako manjak kisika djeluje na razvojne preteče neurona u različitim stadijima diferencijacije. Stanice miša su na prvi, peti i sedmi dan diferencijacije bile izložene 1% kisika tijekom šest sati te su zatim dendriti označeni biljekom MAP2, a aksoni SMI312. Usporedba stanica izloženih hipoksiji i njihovih kontrola je otkrila kako su, za razliku od mlađih prekursora (prvi dan diferencijacije), stariji prekursori (dani 5 i 7) osjetljiviji na hipoksiju te kako reagiraju produljenjem dendrita i izrastanjem većeg broja dendritičkih ogranaka. Istovremeno, hipoksija nije utjecala na mjerene parametre aksona. Ovaj rad je iznjedrilo vrijedan računalni program koji omogućuje preciznu analizu parametara staničnih nastavaka. Kvantificiranjem suptilnih morfoloških promjena tijekom diferencijacije neurona smo unaprijedili razumijevanje utjecaja hipoksije na živčano tkivo.

Ključne riječi: diferencijacija razvojnih preteča neurona, hipoksija, stanični nastavci, strojno učenje

11. SUMMARY

Iva Šimunić

Exposure of mouse neurons during differentiation to hypoxia increases the length and branching of dendrites in more mature cells

The basic feature of neurons is a large number of interconnected projections which enable the nervous system to perform all its tasks. Number of extensions and their branching is a dynamic parameter which changes during progress of diseases and development. The first goal was to develop a computer algorithm for distinguishing axons, dendrites, and neuronal bodies, which as well measures the lengths and branching of cell extensions. Since the most common diseases of the nervous system are caused by hypoxia, we investigated how hypoxia (1% oxygen for 6 hours) affects mouse neuronal precursors at different stages of differentiation (days one, five and seven) and how it influences dendrites, labelled by MAP2, and axons, labelled by SMI312. Comparison of cells exposed to hypoxia and their controls revealed that, unlike younger precursors (day 1), older precursors (days 5 and 7) were more susceptible to hypoxia. They responded by growing longer dendrites with more dendritic branches. At the same time, hypoxia did not affect measured parameters of axons. This paper has yielded valuable computer program that allows accurate analysis of cell extensions. By quantification of subtle morphological changes during neuronal differentiation we improved understanding of the effects of hypoxia on the nervous tissue.

Key words: neural precursor differentiation, hypoxia, cellular projections, machine learning

12. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 25. siječnja 1999. godine u Zagrebu. Svoje obrazovanje započinjem u Osnovnoj školi Dragutina Domjanića u Zagrebu 2005. godine. Osvojila sam treće mjesto na Inovi, izložbi inovacija učenika zagrebačkih osnovnih, srednjih škola i studenata s međunarodnim sudjelovanjem, 2012. godine. Iduće godine osvajam treće mjesto na državnom natjecanju u znanju iz biologije i sudjelujem na državnom školskom natjecanju u šahu. Dobila sam Posebno priznanje Hrvatskog planinarskog saveza za obilazak više od 100 planinarskih vrhova. 2013. godine sam upisala V. gimnaziju u Zagrebu. Maturirala sam 2017. s prosjekom ocjena 5,0 te upisujem Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Do sada sam bila demonstrator na Katedri za histologiju i embriologiju i Katedri za patofiziologiju. 2019. godine pohađala sam StEPP edukaciju za niže godine studija. U rujnu 2020. godine sam sudjelovala u „Methods in dental and orofacial tissue research“, ljetnoj školi organiziranoj od strane Stomatološkog i Medicinskog fakulteta. U 2020. sam dobila zahvalu Kliničke bolnice Sveti Duh „za pomoć i nesebični angažman u doprinosu borbi protiv širenja pandemije COVID-19“. Sudjelovala sam na međunarodnom kongresu 16th Bridges in Life Sciences Annual Video Conference, u travnju 2021., sa usmenim izlaganjem sažetka „Elongation and branching of the processes of differentiating cells of the nervous system is affected by hypoxia“ kao prvi autor. Na istom kongresu sudjelujem i kao koautor sažetka „Hypoxic injury induces increase in levels of Parkin and its recruitment to outer mitochondria membrane of differentiating cells of the nervous system“. U travnju 2021. sudjelujem s još jednim usmenim izlaganjem kao prvi autor sažetka „Hypoxia affects elongation of neuronal processes: different effects in early and late neuronal precursors“ na međunarodnom kongresu 9th European MD-PhD Conference.