

Određivanje matičnih stanica u mozgu genetički izmijenjenog miša B4Galnt1

Čupić, Mateo

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:551344>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko
laboratorijske dijagnostike**

Mateo Čupić

**ODREĐIVANJE MATIČNIH STANICA U
MOZGU GENETIČKI IZMIJENJENOG
MIŠA *B4Galnt1***

Završni rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko
laboratorijske dijagnostike**

Mateo Čupić

**ODREĐIVANJE MATIČNIH STANICA U
MOZGU GENETIČKI IZMIJENJENOG
MIŠA *B4Galnt1***

Završni rad

Osijek, 2017.

Rad je izrađen u Laboratoriju za neurobiologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentor rada: doc.dr.sc. Barbara Viljetić

Rad ima 31 stranicu, 2 tablice i 10 slika.

ZAHVALA

Autor se ovog završnog rada najiskrenije zahvaljuje mentorici doc.dr.sc. Barbari Viljetić na velikoj pomoći koja je pružena i ogromnom strpljenju kako u laboratoriju tako i kod pisanja rada. Bez njezinih savjeta rad bi bio puno teži za napisati i dovesti do kraja.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Neurogeneza	1
1.2. Matične stanice i mjesta njihova nastanka	1
1.3. Neurološki poremećaji i neurodegenerativna stanja	2
1.4 Gangliozidi	3
1.5. Biljezi adultne neurogeneze i gliogeneze	3
1.5.1. GFAP	3
1.5.2. Iba1	4
1.5.3. Nestin	4
1.5.4. PCNA	5
2. HIPOTEZA	6
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	7
4. MATERIJALI I METODE	8
4.1. MATERIJALI	8
4.1.1. Pokusne životinje	8
4.1.2. Kemikalije	8
4.2. METODE	9
4.2.1. Izolacija DNA i genotipizacija	9
4.2.2. Žrtvovanje, disekcija i krioprotekcija mozga	9
4.2.3. Rezanje mozga na kriostatu	10
4.2.4. Imunohistokemija	10
4.2.5. Analiza preparata	11
5. REZULTATI	12
6. RASPRAVA	21
7. ZAKLJUČAK	24
8. SAŽETAK	25
9. SUMMARY	26
10. LITERATURA	27
11. ŽIVOTOPIS	31

POPIS KRATICA

BSA - albumin iz seruma goveda (engl. *Bovine Serum Albumin*)

DAB - diaminobenzidin

DG - dentatni girus (engl. *dentate gyrus*)

GFAP - fibrilarni kiseli protein glije (engl. *glial fibrillary acid protein*)

HRP - peroksidaza iz hrena (engl. *horseradish peroxidase*)

Iba1 - ionizirana kalcij-vezujuća adaptorska molekula 1 (engl. *ionized calcium-binding adaptor molecule 1*)

Jak3 - Janus kinaza 3; kinaza iz obitelji janus povezana sa signalizacijom citokina (engl. *Janus kinase 3*)

KO - miševi s isključenim genom (engl. *knock-out*)

NeuN - marker jezgara svih neurona neuronske jezgre (engl. *Neuronal Nuclei*)

NF - neurofilament (engl. *Neurofilament*)

NPCs - progenitorske živčane stanice (engl. *neural progenitor cells*)

PBS - fosfatni pufer (engl. *phosphate buffer solution*)

PCNA - jezgrin antigen proliferirajućih stanica (engl. *proliferating cell nuclear antigen*)

PFA - paraformaldehid

SVZ - subventrikularna zona (engl. *subventricular zone*)

WT - divlji tip (engl. *wild type*)

1. UVOD

1.1. Neurogeneza

Proces neurogeneze općenito predstavlja stvaranje i sazrijevanje neurona. Budući da se odvija tijekom cijelog života, jednako je važan za razvoj embrionalnog i perinatalnog središnjeg živčanog sustava, kao i za mozak odraslih sisavaca, uključujući čovjeka. Neurogeneza je u odraslih najsnažniji oblik plastičnosti u mozgu i najvjerojatnije ima ulogu stvaranja pamćenja. Plastičnost mozga zapravo predstavlja njegovu sposobnost reorganiziranja svoje neurološke strukture u svrhu što boljeg funkcioniranja (1), za što je najbolji primjer adulta neurogeneza u centrima za sitost koji prilagođavaju hranjenje trenutnim tjelesnim potrebama.

1.2. Matične stanice i mjesta njihova nastanka

Najvećim dijelom stvaranje novih živčanih stanica odvija se na tri mjesta: u subventrikularnoj zoni (engl. *subventricular zone*, SVZ) prednjeg mozga koja se nalazi neposredno uz moždane komore, u njušnim lukovicama te u takozvanoj subgranularnoj zoni i granularnom sloju stanica nazubljene vijuge (engl. *dentate gyrus*, DG) (1, 2). Manjim se dijelom neurogeneza još odvija u hipotalamusu, amigdali, njušnom tuberkulu hipokampusa, jezgri *substantia nigra* i jezgri vagusa te u moždanoj komori. Nazubljena vijuga hipokampusa sadrži granularne neurone, jedne od nekoliko različitih populacija neurona navedenog područja mozga. Taj tanki sloj pruža jedinstveni mikrookoliš za razvoj živčanih matičnih stanica kod odraslih. Živčane matične stanice svojom diferencijacijom stvaraju dvije vrste zrelih stanica: neurone i glija stanice (3). Takvi novi neuroni prolaze kroz nekoliko uzastopnih razvojnih faza prije nego postanu potpuno integrirani u područje hipokampusa. Koraci uključuju: proliferaciju progenitorskih stanica, prevođenje u određeni neurološki fenotip, morfološko i fiziološko sazrijevanje s razvojem funkcionalnih neuronskih značajki, te sinaptičku integraciju u već postojeće neuronske krugove. Stanice iz subventrikularne zone migriraju u olfaktorne bulbose takozvanim rostralnim migratornim putem, gdje postaju interneuroni (1, 2). Dio novonastalih stanica polagano migrira iz SVZ-a prema striatumu i korteksu gdje postepeno sazrijevaju u zrele živčane stanice (4). S druge strane, stanice se iz hipokampusa uključuju u svoju neposrednu

okolinu u blizini mjesta gdje su i nastale te ne prolaze proces migracije (5). Postojanje neurogeneze u subventrikularnoj zoni i hipokampusu poznato je od devedesetih godina prošlog stoljeća, dok je relativno nedavno otkriveno da se neurogeneza u odraslom mozgu odvija i u hipotalamusu proliferacijom takozvanih tanicita, stanica koje su slične glija stanicama (6). Taniciti su karakterizirani kao odrasle matične stanice (iz kojih u konačnici nastaju interneuroni), a kao takve također izražavaju neke od biljega karakterističnih za nediferencirane stanice živčanog sustava, primjerice nestin, vimentin i druge. To je područje privuklo dodatnu pozornost budući da neurogeneza u hipotalamusu ima ulogu i u regulaciji apetita, odnosno energijske homeostaze organizma.

1.3. Neurološki poremećaji i neurodegenerativna stanja

Problem bilo koje vrste u ovim regijama, primjerice upala niskog stupnja, može dovesti do neurodegeneracije što u konačnici uzrokuje ozbiljne poremećaje kognitivnih procesa i ponašanja. Primjerice, prikazano je da promjene u neurogenezi i/ili smanjenom obujmu hipokampusa mogu dovesti do shizofrenije, teške depresije, ovisnosti i anksioznosti (7). Od neurodegenerativnih bolesti razvoj Parkinsonove, Alzheimerove i Huntigtonove bolesti također je povezan s promjenama u razvoju novih živčanih stanica odraslih (8). U nabrojanim bolestima postupno dolazi do gubitka živčanih stanica. Prvi simptomi nastaju kada je već izgubljen veliki dio stanica, a bolest s vremenom postaje sve teža. Međutim, također je zanimljivo za primijetiti da je u navedenim patološkim stanjima uočeno pojačano stvaranje novih neurona, osobito u početnim fazama bolesti (9). Ta su saznanja izazvala veliki interes jer istraživanja u ovom području mogu biti korisna u razvijanju novih metoda u svrhu zamjene oštećenih neurona i/ili liječenja takvih teških neuroloških bolesti. Također je prisutna i mogućnost stimulacije ili poticanja samooporavka populacijom vlastitih matičnih stanica u oštećenom mozgu. Jedan od načina bila bi aktivacija već prisutnih živčanih stanica u mozgu koje bi migrirale do mjesta ozljede, odnosno tamo gdje je potrebno obnavljanje. No, jedna od prepreka u navedenom liječenju jest mali broj adultnih matičnih stanica te relativna udaljenost od mjesta oštećenja. Jedan od glavnih okidača za ta patološka stanja jest i poremećaj u biosintezi gangliozida.

1.4 Ganglioziidi

Ganglioziidi su glikosfingolipidi građeni od glikana spojenih sa ceramidom koji predstavlja lipidni dio molekule kojim su ganglioziidi usidreni u vanjski sloj stanične membrane. Također sadrže i jednu ili više sijalinskih kiselina koje im daju negativan naboj. Dominiraju površinom živčanih stanica, a struktura im se mijenja za vrijeme razvoja mozga. Predstavljaju 10 - 12 % od ukupnog sadržaja lipida membrane neurona. Biosinteza ganglioziida odvija se u koracima, pomoću enzima glikoziltransferaza. Prisutni su u svim tkivima, ali su najzastupljeniji u mozgu gdje dominiraju četiri osnovna ganglioziida: GM1, GD1a, GD1b i GT1b, koji zajedno čine 97 % ganglioziida u mozgu čovjeka (10). Njihove uloge su različite, ovisno o tipu. Primjerice GM1 (zajedno sa GM3) se pojavljuje tijekom rane mijelinizacije, GD1a je marker sinaptogeneze, dok je GT1b karakterističan za zrele neurone (11). Mogu se koristiti kao biljezi razvojnih faza, budući da ganglioziidi imaju karakterističnu raspodjelu, ovisnu o dobi i regiji mozga (12). Reguliraju stanični rast, proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu na način da sudjeluju u interakciji sa transmembranskim receptorima i provoditeljima signala koji su ključni za staničnu signalizaciju (13). Biosinteza ganglioziida je od vitalnog značaja za normalno funkcioniranje stanica i tkiva, dok nedostatak određenih ganglioziida dovodi do neurodegeneracije putem pojačane aktivacije sustava komplementa i posljedične upale (14). Ona se pak očituje povećanom brojnošću mikroglijalnih stanica i aktiviranim astrocitima, čija je morfologija promijenjena u usporedbi s normalnim stanjem (15).

1.5. Biljezi adultne neurogeneze i gliogeneze

Nekoliko je važnih biljega u stanjima upale, takozvani biljezi glije. Dije se na biljege astroglije i biljege mikroglije. Mikroglija igra važnu ulogu u obrani mozga i oporavku tkiva. Uočeno je da kod ozlijeđenog mozga ili mozga koji je zahvaćen određenom bolešću stanice mikroglije ubrzano prelaze u aktivno stanje, proliferiraju, migriraju i u konačnici postaju sposobne vršiti fagocitozu (16).

1.5.1. GFAP

Jedan od tih biljega je fibrilarni kiseli protein glije (engl. *glial fibrillary acid protein*, GFAP), biljeg astrocita i centralne upale. U slučaju oporavka tkiva, primjerice kod moždanog

udara, doći će do reaktivne glioze (kao odgovor na ozljedu živčanog tkiva) te je uočena proliferacija endogenih živčanih matičnih stanica raspoređenih po cijeloj površini od subventrikularne zone pa sve do ruba ozljede (17). To će za posljedicu imati pojačanu ekspresiju glijalnog fibrilarnog proteina, budući da reaktivna gliozu uzrokuje hipertrofiju tijela i nastavka astrocita (18). U navedenim područjima se također može naći velik broj nestin pozitivnih stanica, o čemu je opširnije napisano u točki 1.5.3. Odnosno, u patološkim stanjima izražaj GFAP-a je znatno povećan za razliku od zdravog tkiva, gdje ga astrociti izražavaju minimalno. Astrociti pri tome nadomještaju izgubljene stanice i tvore glijalni ožiljak čija je svrha štititi okolno tkivo od upale (19).

1.5.2. Iba1

Drugi biljeg jest biljeg mikroglije i centralne upale, tzv. Iba1 (engl. *ionized calcium-binding adaptor molecule 1*), adaptorska molekula 1 koja veže ionizirani kalcij. Iako se malo zna o funkcijama proteina Iba-1, otkriveno je da ima ulogu u reorganizaciji citoskeleta i izmjeni konfiguracije stanične membrane; procesa koji se odvijaju u fagocitozi (20). Također, pokazano je da ekspresija Iba1 može biti povezana sa aktivacijom mikroglije kod ishemije mozga, te na taj način može biti koristan kod određivanja patofiziološke uloge aktivirane mikroglije u ishemičnoj ozljedi mozga (21). Nadalje, povećan izražaj Iba1 je prisutan pri aktivaciji mikroglije i kod nekolicine drugih bolesti mozga, primjerice multiple skleroze (22).

1.5.3. Nestin

Nestin je karakterističan biljeg nediferenciranih stanica središnjeg živčanog sustava, tj. biljeg matičnih stanica. Nestin pripada porodici proteina intermedijarnih filamenata klase V, a eksprimiran je u normalnim i ozlijeđenim stanicama u nekolicini tkiva i organa (23). Ekspresija nestina pojavljuje se isključivo u progenitorskim živčanim stanicama (engl. *neural progenitor cells*, NPC) (24). Izražaj mu se povećava zajedno s drugim citoskeletnim proteinima pri patološkim promjenama u tkivu (25). Nadalje, prethodno spomenuta reaktivna gliozu također uzrokuje i jak porast izražaja nestina, pri čemu će stanice pozitivne na nestin morfološki nalikovati dijelom na nezrele neurone, a dijelom na prekursore glija stanica. Pronađeno je i da se živčane stanice koje izražavaju nestin pojavljuju i u štakora i u ljudi (26). U štakora su otkrivene

četiri klase (I-IV), gdje je prikazano da se najmanje jedna od njih, klasa III stanica, pojavljuje i u ljudskom mozgu. Čvrsti su dokazi i da su upravo te stanice neuroni koji izražavaju nestin. Moguće je da ekspresija nestina u tim stanicama ima neuroprotektivnu ulogu jer nestin ima značajnu ulogu u stabilizaciji mikrotubula, koja je poremećena primjerice u slučaju ozljede neurona (26). Fiziološka *in vivo* uloga nestina je zapravo nepoznata. Međutim, dokazi iz *in vitro* analiza sugeriraju da nestin igra ulogu u održavanju stanica na životu i proliferaciji (27). Stanice koje izražavaju nestin se često nađu u područjima regeneracije gdje mogu funkcionirati kao rezervoar matičnih/progenitorskih stanica sposobnih za proliferaciju i diferencijaciju. Pretpostavlja se i da nestin doprinosi održavanju i samoobnavljanju ne samo embrionalnih živčanih matičnih stanica nego i odraslih, te drugih matičnih stanica u kojima je on izražen (28).

1.5.4. PCNA

Još jedan važan biljeg jest PCNA, jezgrin antigen proliferirajućih stanica (engl. *proliferating cell nuclear antigen*). To je jezgrin protein čija je pojava povezana s proliferacijom stanice, a njegov biljeg nam služi za procjenu udjela stanica u S-fazi staničnog ciklusa. PCNA formira homotrimernu prstenastu strukturu koja okružuje DNA. Ulazi u interakcije s brojnim molekulama te zbog toga ima važnu ulogu u brojnim procesima vezanim za metabolizam DNA, uključujući replikaciju DNA, popravak DNA, regulaciju staničnog ciklusa te remodeliranje kromatina (29).

2. HIPOTEZA

Nedostatak u sintezi kompleksnih gangliozda u genetički izmijenjenim miševima *B4Galnt1*, dovest će do neurodegenerativnih poremećaja što će posljedično povećati broj biljega upale u mozgu kao i biljega matičnih stanica, a posebno u regijama subventrikularne zone i subgranularne zone hipokampusa.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA :

- Korištenjem specifičnih protutijela (GFAP, Iba1 i PCNA) odrediti distribuciju i broj matičnih stanica i glija stanica u specifičnim regijama mozga miševa divljeg tipa (engl. *wild type*, WT) i miševa s isključenim genom *B4Galnt1* (engl. *knock-out*, KO) s nedostatkom u sintezi kompleksnih gangliozida.
- Utvrditi povezanost između kompleksnih gangliozida i matičnih stanica, odnosno odrediti mijenja li se distribucija i omjer stanica tijekom odrasle neurogeneze u genetički modificiranom mišu.

4. MATERIJALI I METODE

Rad je napravljen u sklopu dvaju projekata: "Distribucija pojedinih fenotipova interneurona u genetički izmijenjenom mišu B4Galnt1 s nedostatkom u sintezi kompleksnih gangliozida" (VIF2015-MEFOS-16) te "Patofiziološke posljedice promjena sastava lipidnih splavi" (IP-09-2014-2324). Navedene su životinje nabavljene u sklopu projekta "Patofiziološke posljedice promjena sastava lipidnih splavi" (IP-09-2014-2324) za koje je dobiveno dopuštenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek.

4.1. MATERIJALI

4.1.1. Pokusne životinje

U istraživanju je korišteno moždano tkivo odraslih miševa, a uključena su 2 tipa miševa: divlji tip (engl. *wild type*, WT) i genetički izmijenjeni tip *B4Galnt1* (KO, eng. *knock-out*) miševi s nedostatkom u sintezi kompleksnih gangliozida. U svrhu rada korištena su 3 divlja tipa i 3 genetički izmijenjena miša, starosti 3 mjeseca.

4.1.2. Kemikalije

- NaOH (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- AE pufer (Qiagen, Hilden, D-40724)
- SYBR Safe (Invitrogen, Van Allen Way, Carlsbad CA, USA)
- izofluran (Forane, Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL, SAD)
- PBS: NaCl, KCl, Na₂HPO₄ x 7H₂O, KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- paraformaldehid (PFA) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- saharoza (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- izopentan (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- medij za kriostatsko rezanje (Tissue Freezing Medium; Leica, Nussloch, Germany)
- 30 % vodikov peroksid (H₂O₂) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- goveđi serum (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- kozji serum (Gibco, Invitrogen Auckland, NZ)
- primarna protutijela:
 1. anti-Iba1 (Wako Chemicals, Neuss, Germany)

2. anti-GFAP (Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
 3. anti-PCNA (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Tx, USA)
- sekundarna protutijela:
 1. biotinilirano kozje anti-zečje IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, SAD)
 2. biotinilirano kozje anti-mišje IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA)
 - tercijarni kompleks “Vectastain ABC Kit Elite” koji sadrži kompleks avidina i biotiniliranog HRP-a (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
 - diaminobenzidin (DAB) (Peroxidase Substrate System, Vector Lab, Burlingame, CA, USA)
 - Vectamount pokrivalo (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)

4.2. METODE

4.2.1. Izolacija DNA i genotipizacija

Kao uzorak za genotipizaciju korišten je komadić repa miševa iz kojih je napravljena izolacija DNA. Korištena je metoda s NaOH (visoke koncentracije 50 mmol/dm³). Sljedeći korak je inkubacija 30 minuta na 95°C, a zatim centrifugiranje 5 minuta na 4000 okretaja. Nakon uklanjanja NaOH, na izoliranu DNA dodan je AE pufer. Genotipovi su određeni PCR metodom korištenjem specifičnih oligonukleotidnih početnica. Korištene oligonukleotidne početnice su 3' Neo (null AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC), 5' Neo (null CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC) te WT sense (TGC CTC AGC CAA CAG CTT CC) i WT antisense (CGC CCT ATC GAA ACA CAC AGG). Elektroforezom na agaroznom gelu, u koji je dodana SYBR Safe boja, razdvojili smo dijelove DNA te ih vizualizirali UV svjetlom.

4.2.2. Žrtvovanje, disekcija i krioprotekcija mozga

Životinje su anestezirane izofluranom sve dok im se disanje nije smirilo, odnosno dok nije postalo sporo te dok nisu izgubile refleks na bol. Nakon toga je napravljena transkardijalna perfuzija.

Postupak perfuzije:

- iglu se uvelo u lijevu klijetku srca
- škarama se napravio rez na desnoj pretklijetki te se iglom za perfuziju ubrizgao 1 × PBS sve do potpune zamjene krvi, a promjenu se najbolje može uočiti po promjeni boje jetre
- nakon potpunog ispiranja krvi, kroz istu iglu ubrizgava se 4 %-tni paraformaldehida (PFA) za fiksaciju; pokazatelj uspješnosti fiksacije, odnosno cjelokupne perfuzije je potpuna ukočenost tijela miša.

Sljedeći korak jest disekcija cijelog mozga koji se zatim fiksira u 4 %-tnom PFA 24 sata na 4 °C. Nakon završene fiksacije, mozak je prebačen u 10 % i 20 %-tnu otopinu saharoze, koja veže i izvlači vodu kako se ne bi stvarali kristali koji uništavaju tkivo. Takav izolirani mozak je smrznut u pothlađenom izopentanu i pohranjen na -80 °C do analize.

4.2.3. Rezanje mozga na kriostatu

Mozgovi su rezani na kriostatu (Cryostat CM3050S, Leica, Nussloch, Germany) u koronarnom smjeru pri temperaturama CT -18°C i OT -16°C, a debljina rezova je 35 µm. Prije rezanja mozgovi su uklopljeni u medij za kriostatsko rezanje. Kod rezanja na kriostatu, važne su dvije razine mozga od kojih jedna obuhvaća subventrikularnu zonu, a druga područje hipokampusa, odnosno subgranularnu zonu nazubljene vijuge. Rezovi su prikupljeni u otopinu 1 x PBS-a u polistirenskim pločicama s jažicama te čuvani na 4 °C.

4.2.4. Imunohistokemija

Imunohistokemijska analiza napravljena je metodom slobodno plutajućih rezova (engl. *free-floating*). Kod analize korištena su visokospecifična primarna protutijela IgG klase u svrhu detekcije biljega GFAP, Iba1 i PCNA. Postupak je započeo tretiranjem rezova s otopinom 1 %-tnog H₂O₂ u 1 x PBS-u. Time uklanjamo aktivnost endogenih peroksidaza u moždanom tkivu. Nespecifično vezanje protutijela zaustavljamo takozvanom bloking otopinom koja se sastoji od 1 % goveđeg serumskog albumina (BSA), te 5 % kozjeg seruma u 1 x PBS-u. Rezovi su inkubirani u otopini za blokiranje 45 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim je uslijedila inkubacija rezova primarnim protutijelima preko noći na 4 °C uz stalno miješanje. Protutijela su pripremljena u sljedećim razrjeđenjima: PCNA 1 : 500; Iba1 1 : 500 i GFAP 1 : 4000. Sljedeći dan rezove ispiramo 3 puta po 10 minuta u 1 x PBS-u kako bi se uklonila nevezana protutijela. Zatim je

uslijedila inkubacija rezova sa sekundarnim protutijelima 2 h na sobnoj temperaturi uz stalno miješanje. Kao sekundarna protutijela korištena su biotinilirana kozja anti-zečja IgG (za GFAP i Iba1) i biotinilirana kozja anti-mišja IgG protutijela (za PCNA) pripremljena u omjeru 1 : 500 u blokingu. Rezovi su tada isprani ponovno 3 puta po 10 minuta u 1 x PBS-u. Nakon ispiranja rezovi su inkubirani 1 h na sobnoj temperaturi uz stalno miješanje u tercijarnom kompleksu koji se sastoji od avidina i biotina, konjugiran sa HRP-om te pripremljen prema uputama proizvođača. Nakon još jednog seta ispiranja slijedi vizualizacija korištenjem diaminobenzidina (DAB), koji predstavlja supstrat za peroksidazu. Ukoliko je došlo do vezanja primarnog protutijela, doći će do precipitacije smeđeg do sivog supstrata koji predstavlja pozitivnu reakciju. Reakcija je zaustavljena vraćanjem rezova u 1 x PBS nakon čega se preparati stavljaju na predmetna stakalca te se rezovi pokrivaju Vectamount pokrivalom. Rezovi su potom mikroskopirani svjetlosnim mikroskopom (Carl Zeiss, Axioskop 2 MOT, Jena, Germany) te slikani kamerom (Olympus DP70, Optical Olympus, Japan) spojenom na mikroskop. Mikroskopsko povećanje bilo je 50 x i 400 x na slikovnom području od 200 x 200 µm.

4.2.5. Analiza preparata

Za analizu podataka i izražavanje rezultata, slike su analizirane u računalnom programu ImageJ (Fiji 101) prema opisanom protokolu (30). Statistika je napravljena u računalnom programu Statistica 12 (Quest Software Inc., Aliso Viejo, CA, SAD). Razlike između distribucija dviju nezavisnih varijabli utvrđene su Mann-Whitney-U testom, razina značajnosti je 0,05.

5. REZULTATI

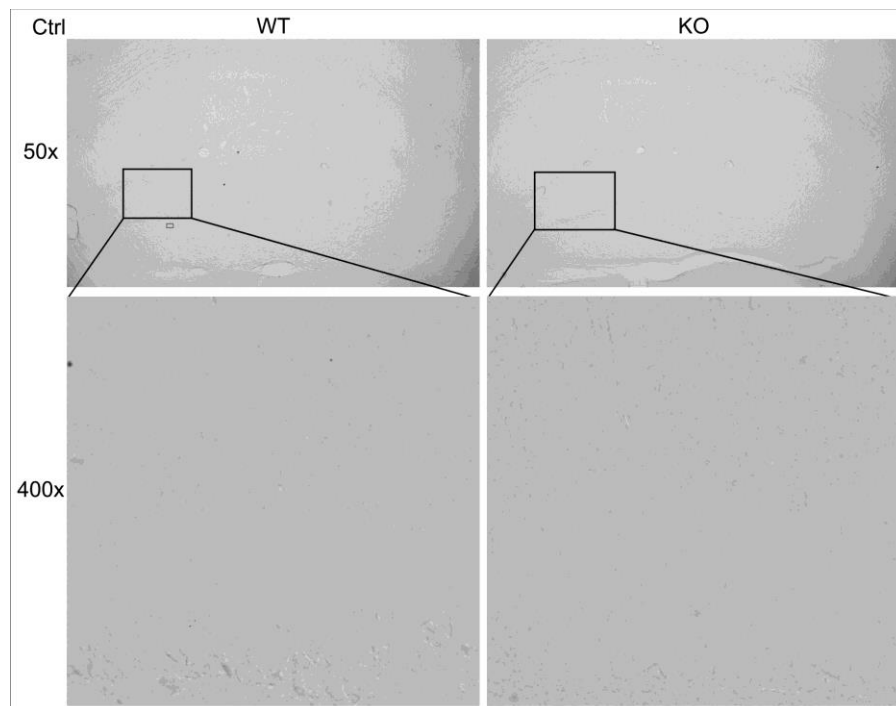
Imunohistokemijski su obrađene i analizirane subventrikularna zona (SVZ) i subgranularna zona nazubljene vijuge (DG) u mozgu genetički izmijenjenog miša *B4Galnt1* i kontrolnog miša divljeg tipa. Korištena su tri protutijela: anti-GFAP, anti-Iba1 te anti-PCNA; odnosno marker astrocita, mikroglije te marker proliferacije stanica. Slike 5.1. i 5.2. prikazuju negativne kontrole koje potvrđuju da nije bilo nespecifičnih vezanja protutijela. Slike 5.3, 5.4, 5.6, 5.7 te 5.9 i 5.10. prikazuju rezultate pojedinih regija pri različitim povećanjima. Kod sva tri biljega brojane su pozitivno obojene stanice, međutim, u regiji DG kod analize PCNA te u regiji SVZ-a analizom GFAP biljega, stanice nisu bile jasno vidljive ili je došlo do preklapanja istih, te je određivana količina piksela koja odgovara pozitivnom bojanju. Konačni su podaci prikazani tablicama 5.1. i 5.2. Statistički značajni rezultati prikazani su i grafički na Slikama 5.5. i 5.8.

Tablica 5.1. Srednje vrijednosti broja stanica u pojedinim regijama u oba tipa miša. (DG-dentatni girus, SVZ-subventrikularna zona, KO-knockout, WT-wild type).

Analizirano područje (Biljeg)	Miš	Srednja vrijednost broja stanica
DG (Iba1)	KO	8,25
	WT	10,75
SVZ (Iba1)	KO	22,5
	WT	19,5
DG (GFAP)	KO	11,25
	WT	14,75
SVZ (PCNA)	KO	20
	WT	38,25

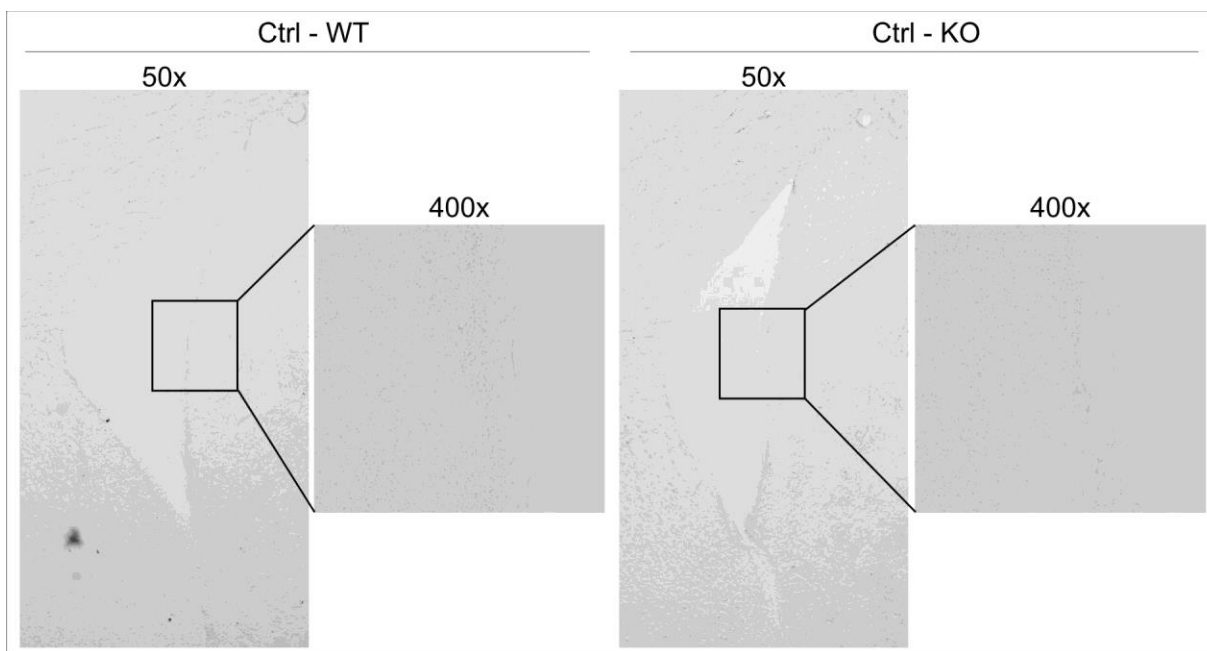
Tablica 5.2. Srednje vrijednosti količine piksela koje odgovaraju količini pozitivnog obojenja protutijelima PCNA i GFAP u pojedinim regijama u oba tipa miša. (DG-dentatni girus, SVZ-subventrikularna zona, KO-knockout, WT-wild type).

Analizirano područje (Biljeg)	Miš	Srednja vrijednost količine piksela
DG (PCNA)	KO	2867,067
	WT	1416,028
SVZ (GFAP)	KO	4469061
	WT	3384275



Slika 5.1. Imunohistokemijski prikaz negativne kontrole u dentatnom girusu hipokampusa.

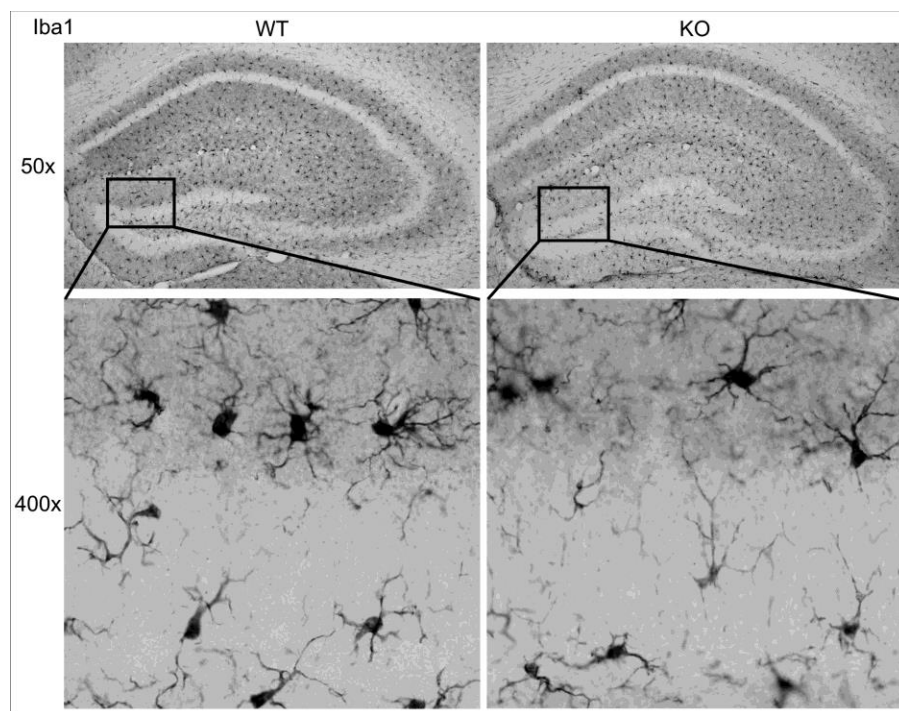
Lijevo je prikaz miša divljeg tipa (WT), desno genetički izmijenjenog (KO) miša. Povećanje je 50x i 400x.



Slika 5.2. Imunohistokemijski prikaz negativne kontrole u subventrikularnoj zoni. Lijevo je prikaz miša divljeg tipa (WT), desno genetički izmijenjenog (KO) miša. Povećanje je 50x i 400x.

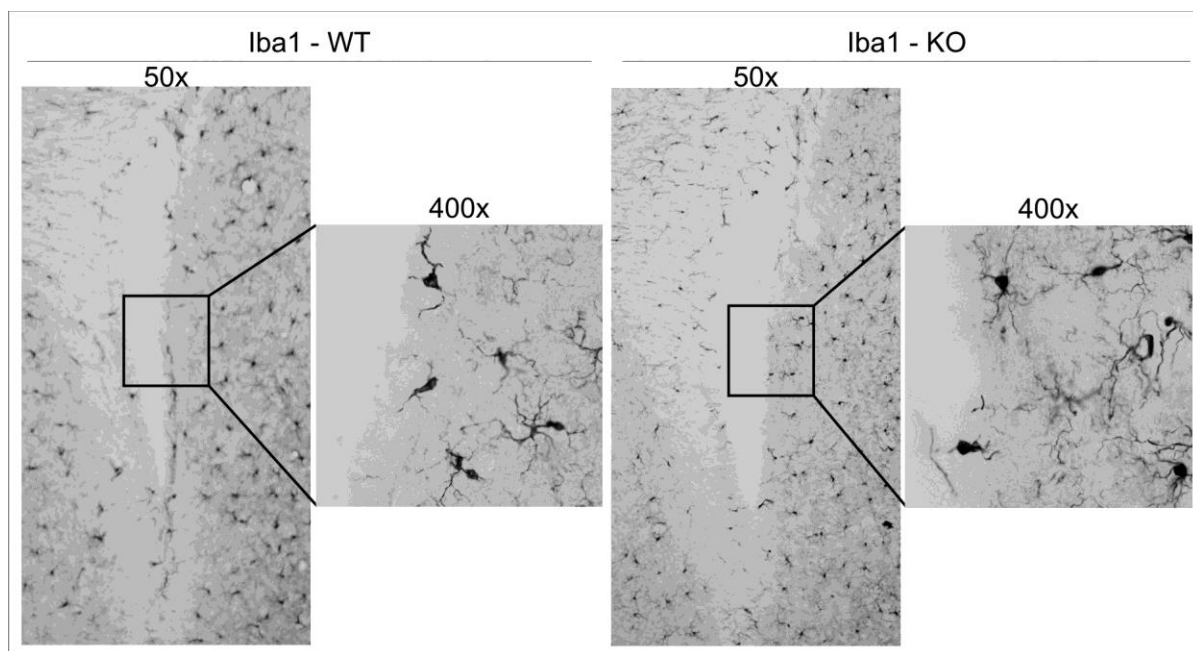
5.1. Iba1

Analizom rezultata ekspresije Iba1 biljega u subgranularnoj zoni dentatnog girusa (Slika 5.1), uočena je minimalna razlika u izražaju stanica (Tablica 5.1.) mikroglije između divljeg tipa miša i genetički izmijenjenog *B4Galnt1* miša, međutim ta razlika nije dosegla statističku značajnost ($p=0,2$). Vrijednost medijana iznosila je 9,50; minimuma 6,00 te maximuma 14,00.

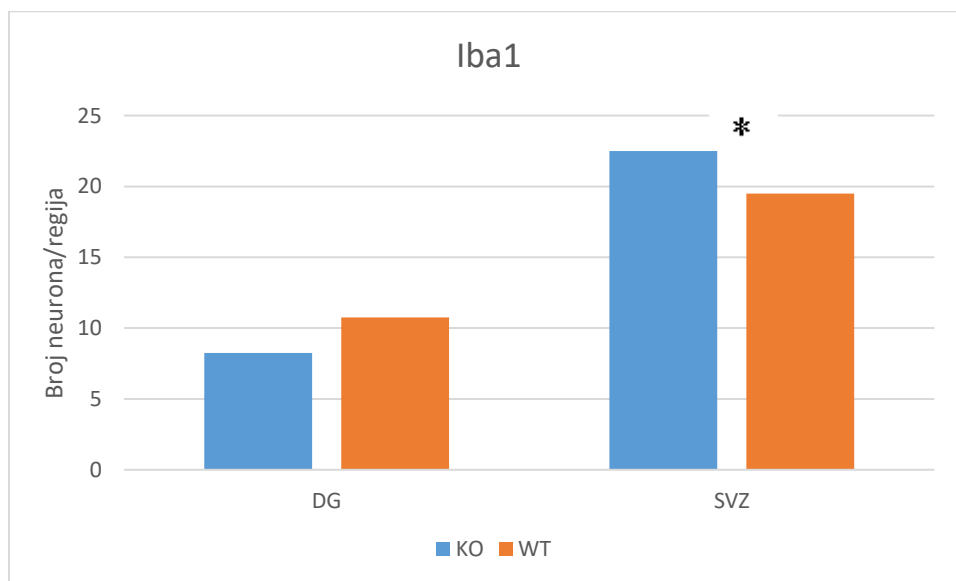


Slika 5.3. Imunohistokemijski prikaz DG-a (engl. *dentate gyrus*) u kojem se vidi izražaj markera Iba1. Lijevo je prikaz miša divljeg tipa (WT), desno genetički izmijenjenog (KO) miša. Povećanje je 50x i 400x.

Vrijednosti Iba1 biljega u subventrikularnoj zoni (Slika 5.4) su značajne, kako brojčano, tako statistički. Uočeno je povećanje broja stanica u KO mišu u odnosu na WT (Tablica 5.1, Slika 5.5), a Mann-Whitney U Testom je također dokazana i statistički značajna razlika između dva navedena miša ($p=0,028571$). Vrijednost medijana iznosila je 21,50; minimuma 17,00 te maximuma 23,00.



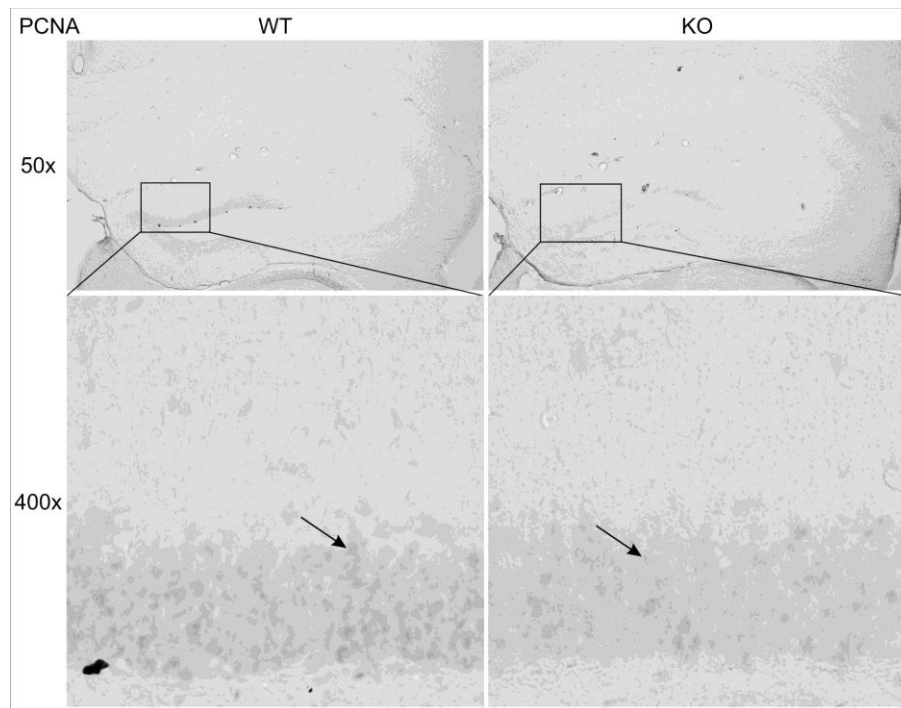
Slika 5.4. Imunohistokemijski prikaz SVZ-a (subventrikularne zone) u kojem se vidi izražaj markera Iba1. Lijevo je prikaz miša divljeg tipa (WT), desno genetički izmijenjenog (KO) miša. Povećanje je 50x i 400x.



Slika 5.5. Kvantitativni prikaz svih neurona, odnosno izražaja biljega u regijama dentatnog girusa (DG) i subventrikularne zone, uspoređujući kontrolni divlji tip (WT) i genetički izmijenjeni *B4Galnt1* (KO). Na slici je uz odabranu regiju stavljena zvijezdica (*) ukoliko postoji statistički značajna razlika.

5.2. PCNA

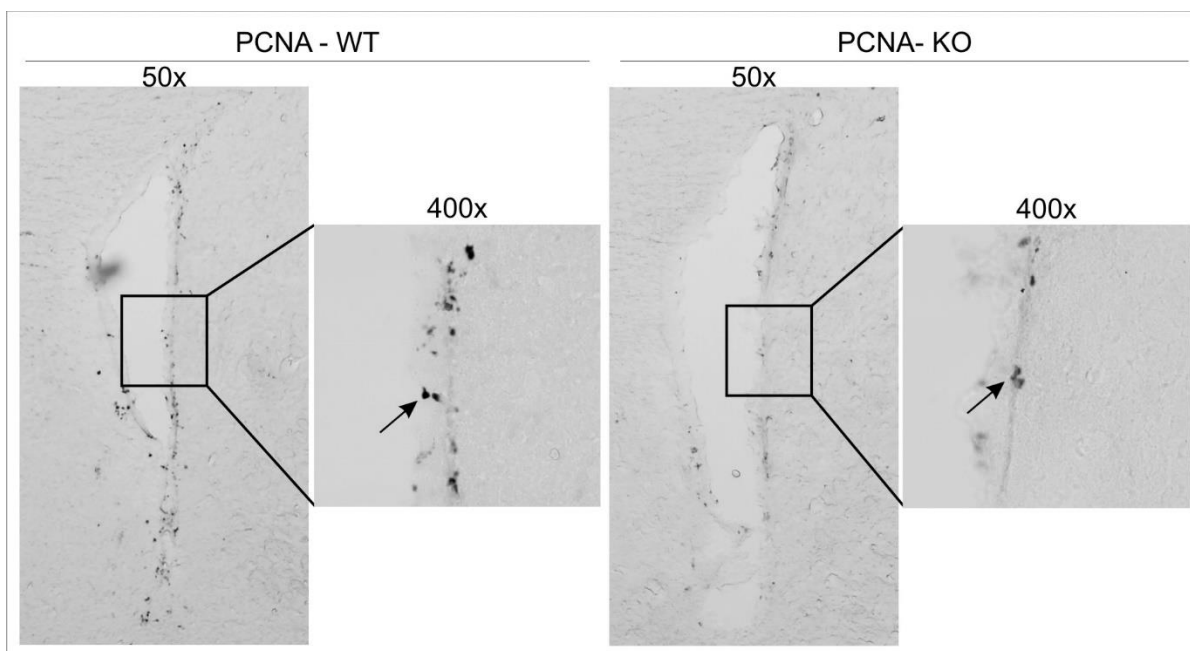
Analiza rezultata subgranularne zone dentatnog girusa PCNA biljega između kontrolnog divljeg tipa i genetički izmijenjenog miša (Slika 5.6) pokazala je da nema statistički značajne razlike ($p=0,342857$). Uočeno je, međutim, da su više vrijednosti bile u KO mišu, u odnosu na WT (Tablica 5.2.). Vrijednost medijana iznosila je 2362,57; minimuma 0,00 te maximuma 5117,99.



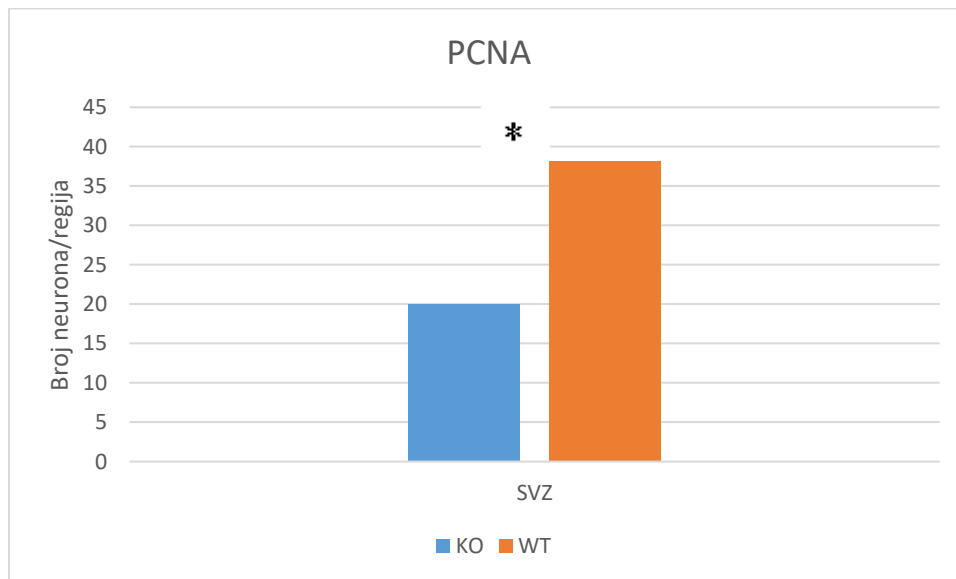
Slika 5.6. Imunohistokemijski prikaz DG-a (engl. *dentate gyrus*) u kojem se vidi izražaj markera PCNA. Lijevo je prikaz miša divljeg tipa (WT), desno genetički izmijenjenog (KO) miša.

Povećanje je 50x i 400x.

Analiza subventrikularne zone pokazala je značajno manji izražaj PCNA markera (Slika 5.7) u genetički izmijenjenom mišu u odnosu na kontrolnog tipa (grafički prikazano na Slici 5.8; Tablica 5.1). Također je dokazano da postoji statistički značajna razlika ($p=0,028571$) između dva tipa miša. Vrijednost medijana iznosila je 29,00; minimuma 14,00 te maximuma 43,00.



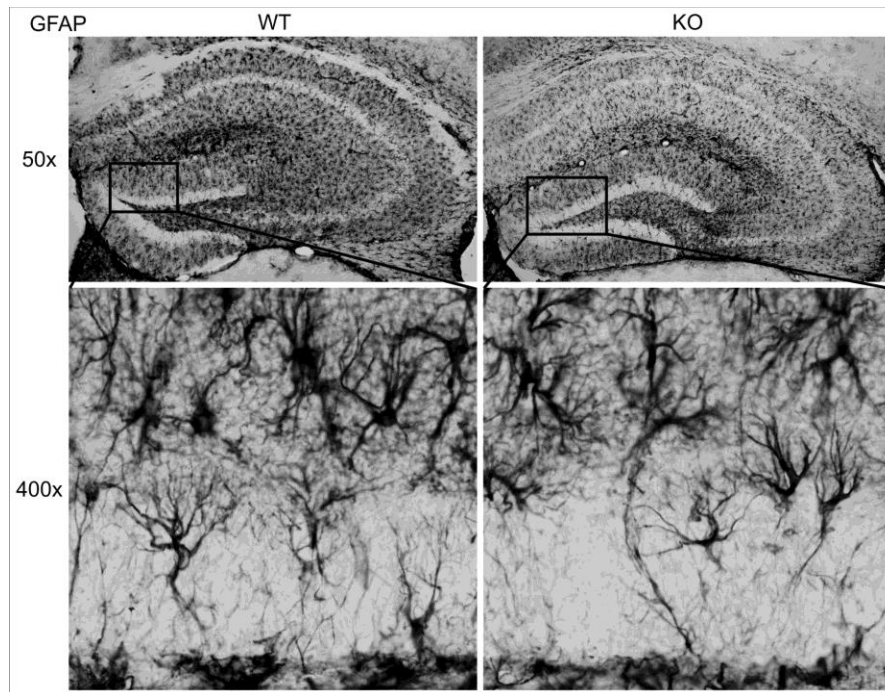
Slika 5.7. Imunohistokemijski prikaz SVZ-a (subventrikularne zone) u kojem se vidi izražaj markera PCNA. Lijevo je prikaz miša divljeg tipa (WT), desno genetički izmijenjenog (KO) miša. Povećanje je 50x i 400x.



Slika 5.8. Kvantitativni prikaz svih neurona, odnosno izražaja biljega u regijama dentatnog girusa (DG) i subventrikularne zone, uspoređujući kontrolni divlji tip (WT) i genetički izmijenjeni *B4Galnt1* (KO). Na slici je uz odabranu regiju stavljena zvijezdica (*) ukoliko postoji statistički značajna razlika.

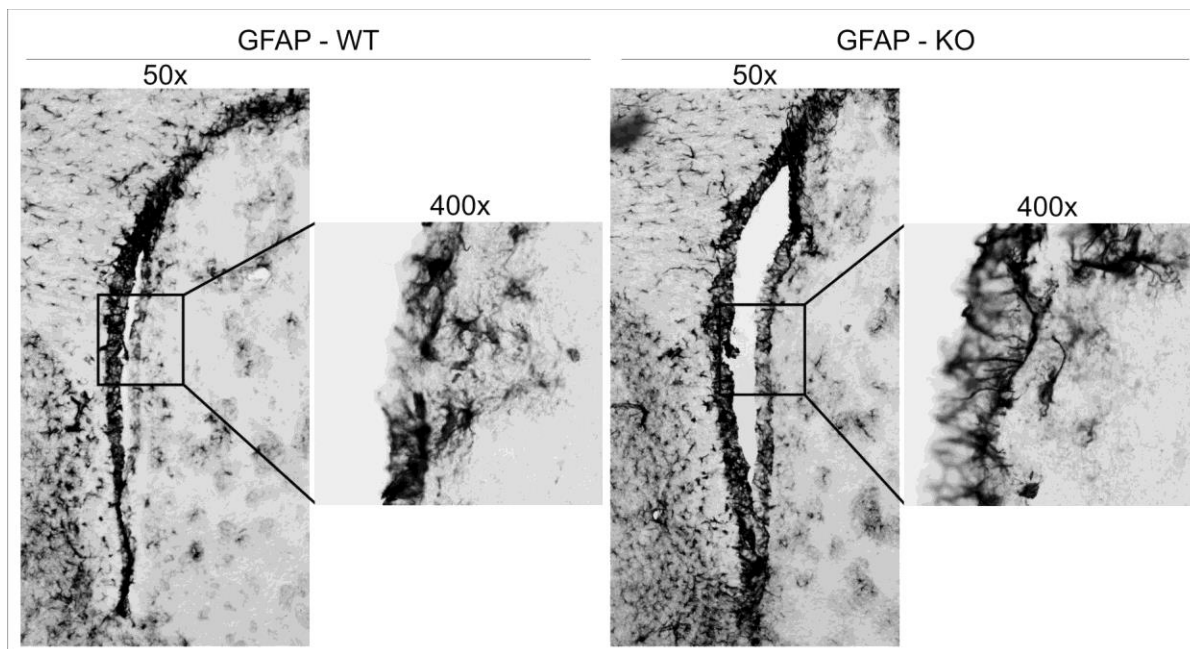
5.3. GFAP

GFAP biljeg u dentatnom girusu ima veći izražaj u miša divljeg tipa (WT) u odnosu na genetički izmijenjenog *B4Galnt1* miša (Tablica 5.1.). Razlika ne doseže statističku značajnost, no valja naglasiti da rezultati imaju tendenciju statističkoj značajnosti ($p=0,057143$). Vrijednost medijana iznosila je 12,50; minimuma 9,00 te maximuma 17,00.



Slika 5.9. Imunohistokemijski prikaz DG-a (engl. *dentate gyrus*) u kojem se vidi izražaj markera GFAP. Lijevo je prikaz miša divljeg tipa (WT), desno genetički izmijenjenog (KO) miša. Povećanje je 50x i 400x.

Izražaj GFAP markera u subventrikularnoj zoni miša je veći u odnosu na kontrolni divlji tip. Rezultati su prikazani pomoću Fiji računalnog programa automatizacijom rezultata, na isti način kao i PCNA u dentatnom girusu (5.2.1.) te izraženi u Slici 5.10. i srednjim vrijednostima u tablici 5.2. Razlika nije dosegla statističku značajnost ($p=0,485714$). Vrijednost medijana iznosila je 3783619; minimuma 2823224 te maximuma 6788975.



Slika 5.10. Imunohistokemijski prikaz SVZ-a (subventrikularne zone) u kojem se vidi izražaj markera GFAP. Lijevo je prikaz miša divljeg tipa (WT), desno genetički izmijenjenog (KO) miša. Povećanje je 50x i 400x.

6. RASPRAVA

U ovom je radu po prvi puta analizirana distribucija Iba1, GFAP i PCNA biljega u mozgu genetički izmijenjenog miša *B4Galnt1* (KO) u usporedbi s kontrolnim mišem divljeg tipa (WT). Navedena genetička promjena odnosi se na sposobnost sinteze ganglioizida koji su od velikog značaja za funkcioniranje stanica budući da dominiraju površinom živčanih stanica, a nedostatak u njihovoj biosintezi može dovesti do različitih neuroloških poremećaja i neurodegenerativnih stanja (14). Brojnim je istraživanjima potvrđena pretpostavka da se neurogeneza ne događa samo u embrionalnom razvoju nego i u odrasloj dobi (1, 2, 5, 31), a ovdje je to prikazano u slučaju upalnog stanja kao odgovora na neurološki poremećaj koji je izazvan prethodno spomenutom genetičkom izmjenom. S obzirom na to da su dvije regije mozga dominantne za proces neurogeneze, u ovom je radu fokus bio upravo na tim područjima. To su: subventrikularna zona (SVZ) prednjeg mozga te u subgranularnoj zoni i granularnom sloju stanica nazubljene vijuge hipokampusa smještenom u temporalnom režnju mozga. Analizirajući ekspresiju biljega kod gore navedena dva miša, uočava se razlika u ekspresiji Iba1 i PCNA u području SVZ, što bi pokazivalo veću upalu i manju proliferaciju. Dolazi do povećanja broja Iba1 pozitivnih stanica u *B4Galnt1* mišu, međutim u istom je mišu uočeno smanjenje vrijednosti PCNA biljega u usporedbi s WT mišem. Navedeni biljezi i statistički su pokazivali značajnu razliku. Povećanje Iba1 markera potkrepljuje tvrdnju da se pri upalnim procesima povećava broj biljega mikroglije i centralne upale (22). S druge strane, snižene vrijednosti PCNA biljega kod KO miša upućuju na moguće postojanje smanjenog broja matičnih stanica u SVZ-u što bi moglo imati za posljedicu slabiju regeneraciju. Posljednji biljeg koji smo analizirali u subventrikularnoj zoni bio je GFAP. Također je pokazao očekivano povećanje u genetički izmijenjenim miševima, ali to nije bilo statistički značajno. Vrijednosti tog biljega astrocita i centralne upale isto potvrđuju hipotezu da će doći do povećanog izražaja pri, primjerice, oporavku tkiva (17, 18). Navedeni procesi ukazuju na proliferaciju endogenih živčanih matičnih stanica raspoređenih po cijeloj površini subventrikularne zone. Proučavajući, s druge strane, dentatni girus (DG) primijećeno je da nije došlo do povećanja biljega centralne upale Iba1 i GFAP u miša koji ima genetičke preinake. Uočene su minimalno veće vrijednosti pozitivnih stanica u WT miša. Za razliku od ta dva biljega, PCNA biljeg, koji služi za procjenu udjela stanica u S-fazi staničnog ciklusa, potvrdio je pretpostavku da će doći do povećanja PCNA pozitivnih stanica u genetički promijenjenom mišu

u usporedbi s kontrolnim divljim tipom u hipokampusu. Iz navedenog bi se dalo zaključiti kako je došlo do povećane proliferacije stanica u hipokampusu KO miša.

Zanimljiva saznanja dobivena su i iz istraživanja pacijenata s mutacijom gena za sintezu gangliozida te proučavanjem KO miševa istih gena. Primjerice, manjak gena u sintezi GM3 gangliozida (*St3Gal5*) te drugi, nama važniji, s manjkom gena u sintezi GM2/GD2 gangliozida (*B4Galnt1*) (32, 33). Pacijenti s mutacijom gena za GM3 sintezu imali su teške infantilne epileptičke konvulzije ili razne druge neurološke poremećaje. Međutim, KO miševi istog gena nisu pokazali spomenute abnormalnosti (34). S druge strane, pacijenti s manjkom gena u sintezi GM2/GD2 gangliozida imali su vrlo slične neurološke poremećaje (35). Također, isti pacijenti pokazivali su određene defekte muških gonada, a zanimljivo je da je isto primijećeno i u *B4Galnt1* KO mišu (32, 33).

Sposobnost diferencijacije stanica koje eksprimiraju GFAP uočena je u istraživanjima koja su pokazala da i intravenozno ubrizgavane ljudske progenitorske živčane stanice (NPC) imaju veću stopu integracije stanica u nekim životinjskim modelima (36). Primjerice, mišji modeli koji su imali ishemiju mozga dobili su intravenozno stanične linije koje su potom ušle u područje ishemije te se diferencirale u neurone i astrocite. Navedene su stanice izražavale neuronske i glija markere, konkretno NeuN i NF (neurofilamenti koji se nalaze u neuronima) zajedno s GFAP pozitivnim stanicama, sva tri u području dentatnog girusa hipokampusa. Za navedeno je istraživanje dokazano da se GFAP 2 - 3 tjedna nakon transplantacije stanica progresivno eksprimira, što ukazuje na postupno sazrijevanje stanica (36).

Nadalje, izražaj biljega mikroglije Iba1, prikazan je u više studija u različitim uvjetima. Proučavan je odnos Pax6, transkripcijskog faktora prisutnog za vrijeme embrionalnog razvoja, i Iba1 te je njihova kolokalizacija dokazana u hipokampusu u mladom mozgu, što je dodatna potvrda uloge mikroglije ne samo pri oštećenju već i za vrijeme razvoja mozga (37). Druga studija, koja se bavila razvojem kralježnične moždine i ozljedom moždine, pokazala je da velik broj nestin pozitivnih stanica prelazi u mikroglija stanice, odnosno izražava Iba1 biljeg. Tijekom razvoja kralježnične moždine endogene progenitorske stanice koje izražavaju nestin migriraju na potrebna područja te se diferenciraju u neurone i druge glija stanice (38). Nadalje, pokazali su da se mikroglija aktivira ozljedom, a takve transformirane stanice mogu lučiti neurotoksične tvari koje pojačavaju imunosne reakcije i potiču fagocitnu aktivnost. Konkretno, navedena studija promatrala je utjecaj Janus kinaze 3 (Jak3), koja među ostalim ima ulogu u prijenosu signala.

Tirozin kinaza Jak3 je od velike važnosti u regulaciji diferencijacije mikroglia. Utvrđeno je da utišavanje Jak3 signalizacije uzrokuje pojačanu neurogenezu, a sama ekspresija Iba1 pokazivala je fluktuacije u ovisnosti je li Jak3 bio inhibiran ili nije (38).

Postoji i niz drugih studija koje povezuju prehranu i izražaj biljega u hipokampusu. Takva istraživanja dokazala su utjecaj prehrane bogate mastima koja oštećuje hipokampus, a samim time i narušavaju sposobnost snalaženja u prostoru i rješavanja nekih kompleksnih zadataka. Miševi su hranjeni i ugljikohidratima, a prehrana bogata tim tvarima uzrokuje oštećenje mozga, kako u nekim drugim područjima mozga tako i u hipokampusu. Pri takvom oštećenju uočio se izražaj mikroglia stanica, odnosno došlo je do povećanja brojnosti Iba1 i GFAP biljega, a oni pak dalje potiču upalu (29).

Ograničenje ove studije je starost životinja, odnosno za ovo istraživanje korištene su samo mlade životinje 3 mjeseca starosti. Kako je već kod mladih životinja uočena razlika u izražaju biljega upale i proliferacije, svakako je potrebno istraživanje ponoviti na starijim životinjama, posebice onima 12 mjeseci starosti gdje je za pretpostaviti da će razlika biti puno izraženija.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako promjene u sastavu lipida stanične membrane dovode do povećanja biljega upale te do smanjenja proliferacije stanica u mozgu što može dovesti do razvoja neurodegenerativnih poremećaja.

7. ZAKLJUČAK

- Temeljem dobivenih podataka moguće je zaključiti da postoji povezanost između genetički modificiranog miša koji ima nedostatak u sintezi gangliozida s pojavnošću povećanog broja biljega upale i biljega proliferacije stanica.
- Vidljiva je statistički značajna razlika kod Iba1 i PCNA biljega u regiji subventrikularne zone između KO i WT miša. Kod izražaja Iba1 biljega, *B4Galnt1* miš ima veće vrijednosti u usporedbi s vrijednostima WT miša. Suprotno spomenutim podacima, PCNA biljeg je pokazao veći izražaj u WT mišu u odnosu na KO.
- Statistički značajna razlika nije uočena u dentatnom girusu kod PCNA te kod Iba1 biljega. U KO mišu primijećen je veći izražaj PCNA biljega u usporedbi s WT mišem, za razliku od Iba1, gdje je prebrojano nešto više stanica u WT mišu. Statistički značajna razlika nije uočena ni u subventrikularnoj zoni proučavajući izražaj GFAP biljega. Tu su vrijednosti u genetički izmijenjenom *B4Galnt1* mišu bile veće uspoređujući ih s WT mišem.

8. SAŽETAK

Uvod: Neurogeneza, odnosno stvaranje novih živčanih stanica, osim u embrionalnom razvoju, odvija se i u odraslom mozgu i to uglavnom u područjima: u subventrikularnoj zoni (SVZ) i subgranularnoj zoni dentatnog girusa (DG) hipokampusa te u njušnoj lukovici. U tom procesu ulogu imaju i kompleksni gangliozidi koji su prisutni u svim tkivima, ali su najzastupljeniji u mozgu, a njihov nedostatak dovodi do neurodegeneracije i neuroloških poremećaja.

Ciljevi: Odrediti povezanost nedostatka kompleksnih gangliozida i biljega upale i proliferacije stanica.

Materijali i metode: U istraživanje su uključena dva tipa miša - genetički modificirani *B4Galnt1* (KO) s nedostatkom u sintezi kompleksnih gangliozida i kontrolni miš divljeg tipa (WT). Imunohistokemijskom analizom pomoću protutijela Iba1, GFAP i PCNA detektirani su navedeni biljezi.

Rezultati: Rezultati su analizirani računalnim programom Fiji te su statistički obrađeni. Dobiveni su rezultati pokazali statistički značajnu razliku kod sva tri biljega. U SVZ-u je uočeno da je Iba1 više izražen kod KO-a u odnosu na WT, dok su vrijednosti PCNA biljega bile veće u WT-u uspoređujući ga s KO mišem. S druge strane, u DG-u je pokazana veća ekspresija GFAP pozitivnih stanica u WT mišu nego u KO.

Zaključak: Veće vrijednosti biljega Iba1 potvrđuju hipotezu o povećanom broju mikroglija stanica pri upalnom procesu, dok manje vrijednosti PCNA u KO mišu upućuju na moguće postojanje smanjenog ukupnog broja matičnih stanica u SVZ-u. Slično, manji broj GFAP pozitivnih stanica u hipokampusu KO miša moglo bi se povezati s njihovom slabijom mogućnošću diferencijacije za vrijeme upale.

Ključne riječi: gangliozidi; genetički izmijenjeni miševi; hipokampus; subventrikularna zona

9. SUMMARY

Detection of stem cells in the brain of genetically modified mouse *B4Galnt1*

Introduction: Neurogenesis, or the creation of new neuron cells, occurs not only in embryonic development, but also in the adult brain, mainly in two regions: the subventricular zone (SVZ) and the subgranular zone of the dentate gyrus (DG) of the hippocampus and also in olfactory bulb. Complex gangliosides are also involved in this process and they are present in all tissues, but are the most prominent in the brain, and their deficiency leads to neurodegeneration and neurological disorders.

Goals: This study investigates the correlation between lack of complex gangliosides, inflammation and cell proliferation.

Materials and methods: Two types of mice have been included in the study - genetically modified *B4Galnt1* (KO) with a lack of complex ganglioside synthesis and a control wild type mouse (WT). Immunohistochemical analysis by means of antibodies Iba1, GFAP and PCNA detects the aforementioned markers.

Results: The results were analysed by a computer program Fiji and statistically processed. The results obtained indicated statistically significant difference in all three markers. In SVZ it was found that Iba1 was more expressed in KO compared to WT, while PCNA markers were higher in WT compared with KO mice. On the other hand, DG showed greater expression of GFAP positive cells in WT mouse than in KO.

Conclusion: Higher values for Iba1 marker confirms the hypothesis of the increased number of microglia cells in the inflammatory process, while the lower PCNA values in KO mouse indicate the possible existence of a reduced total stem cell count in the SVZ. Similarly, a smaller number of GFAP positive cells in the KO mouse's hippocampus may be related to their lower differentiation ability during inflammation.

Key words: gangliosides; genetically modified mice; hippocampus; subventricular zone

10. LITERATURA

1. Curtis M. A., Kam M., Nannmark U. et al. (2007) Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* 315, 1243–1249.
2. Doetsch F, Hen R. Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian brain. *Curr Opin Neurobiol* 2005; 15: 121-128.
3. Chia PH, Li P, Shen K. Cellular and molecular mechanisms underlying presynapse formation. *J Cell Biol* 2013;203(1):11–22.
4. Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 2002;8(9):963–70.
5. Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 2005; 28:223-250.
6. Kokoeva M V., Yin H, Flier JS. Neurogenesis in the Hypothalamus of Adult Mice: Potential Role in Energy Balance. *Science* (80-) 2005 Oct 28;310(5748):679–83.
7. Miller, B.R., and Hen, R. (2015). The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety. *Curr. Opin. Neurobiol.* 30, 51–58.
8. Winner B., and Winkler J. (2015). Adult neurogenesis in neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a021287.
9. Danzer S. C. (2012) Depression, stress, epilepsy and adult neurogenesis. *Exp. Neurol.* 233, 22–32.
10. Avrova NF (1985) Evolutionary approach to the analysis of structure and function of gangliosides. *Neurochem. Res* 10:1547-1554.
11. Rösner H (2003) Developmental expression and possible roles of gangliosides in brain development. *Prog Mol Subcell Biol* 32:49–73.
12. Mlinac, K. & Bognar, S. K. Role of gangliosides in brain aging and neurodegeneration. *Transl. Neurosci.* 1, 300–307 (2010).
13. Zhang, X. & Kiechle, F. L. Review: Glycosphingolipids in health and disease. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 34, 3–13 (2004).

14. Ohmi, Y. et al. Gangliosides play pivotal roles in the regulation of complement systems and in the maintenance of integrity in nerve tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 22405–22410 (2009).
15. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2010 Jan;119(1):7–35.
16. Raivich G., Bohatschek M., Kloss C. U. A., Werner A., Jones L. L. and Kreutzberg G. W. (1999) Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 30, 77–105.
17. Tonchev AB, Yamashima T, Sawamoto K, Okano H. Enhanced proliferation of progenitor cells in the subventricular zone and limited neuronal production in the striatum and neocortex of adult macaque monkeys after global cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 2005;81(6):776–88.
18. Wilhelmsson U, Bushong EA, Price DL, Smarr BL, Phung V, Terada M, et al. Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *PNAS* 2006;103(46):17513–8.
19. Pekny M, Wilhelmsson U, Pekna M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci Lett*. 2014 Apr;565:30–8.
20. Osawa K, Imai Y, Sasaki Y, and Kohsaka S. “Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to filamin and enhances its actin-bundling activity,” *J. Neurochem.*, 88, 844–856 (2004).
21. Daisuke Ito, Kortaro Tanaka, Shigeaki Suzuki, Tomohisa Dembo, Yasuo Fukuuchi (2001) Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain.
22. Ito D., Tanaka K., Suzuki S., Dembo T. and Fukuuchi Y. (2001) Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke* 32, 1208–1215.
23. Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, et al. (2004) Nestin expression - a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci* 61:2510–2522.

24. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RDG (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament. *Cell* 60: 585–595.
25. Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison SW. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem.* 2004 Jun;89(5):1092–100.
26. Hendrickson Michael L, Rao Abigail J, Demerdash Omar NA, Kalil Ronald E. (2011) Expression of Nestin by Neural Cells in the Adult Rat and Human Brain.
27. Wei LC, Shi M, Cao R et al. Nestin small interfering RNA (siRNA) reduces cell growth in cultured astrocytoma cells. *Brain Res* 2008; 1196:103–112.
28. Park D, Xiang AP, Mao FF, Zhang L, Di CG, Liu XM, i sur. (2010) Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells.
29. Moldovan GL, Choe KN, Forging Ahead through Darkness: PCNA, Still the Principal Conductor at the Replication Fork. *Mol Cell.* 2017 Feb 2;65(3):380-392.
30. Ivić V. Poveznica upale niskog stupnja i razvoja rezistencije na leptin i inzulin u mozgu odraslih pretilih Sprague-Dawley štakora liječenih metforminom i liraglutidom. Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku 2017.
31. Spalding KL, Bergmann O, Alkass K., Bernard S, Salehpour M, Huttner, HB, i sur. (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 153, 1219–1227.
32. Harlalka GV, Lehman A, Chioza B, Baple EL, Maroofian R, Cross H i sur., Mutations in B4GALNT1 (GM2 synthase) underlie a new disorder of ganglioside biosynthesis, *Brain* 136 (2013) 3618-3624.
33. Wakil SM, Monies DM, Ramzan K, Hagos S, Bastaki L, Meyer BF i sur., Novel B4GALNT1 mutations in a complicated form of hereditary spastic paraplegia, *Clin. Genet. (Letter)* 86 (2014) 500-501.
34. Koichi Furukawa, Yuhsuke Ohmi, Shuting Ji, Pu Zhang, Robiul H. Bhuiyan, Yuki Ohkawa, i sur. Glycolipids: Essential regulator of neuro-inflammation, metabolism and gliomagenesis, *BBA - General Subjects* (2017).
35. Simpson MA, Cross H, Proukakis C, Priestman DA, Neville DCA, Reinkensmeier G, i sur., Infantile-onset symptomatic epilepsy syndrome caused by a homozygous loss-of-function mutation of GM3 synthase, *Nat. Genet.* 36 (2004) 1225-1229.

36. Chu K, Kim M, Park KI, Jeong SW, Park HK, Jung KH, et al. Human neural stem cells improve sensorimotor deficits in the adult rat brain with experimental focal ischemia. *Brain Res.* 2004 Aug 6;1016(2):145-53.
37. Maurya, Shashank Kumar, Mishra, Rajnikant, Pax6 interacts with Iba1 and shows age-associated alterations in brain of aging mice. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 2017.
38. Sumit Baruaa, Jee-In Chunga, A Young Kima,b,c, Soo-Yeon Lee, Soo Hwan Lee and Eun Joo Baika (2017) Jak kinase 3 signaling in microgliogenesis from the spinal nestin+ progenitors in both development and response to injury.

11. ŽIVOTOPIS

Mateo Čupić rođen je 11. ožujka 1995. godine u Vinkovcima. Završio je OŠ Ivana Mažuranića, a potom i Prirodoslovno-matematičku gimnaziju u Vinkovcima. Godine 2014 godine upisuje Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike, Medicinskog fakulteta u Osijeku. Trenutno je student treće godine.