

# METABOLIČKI PROFIL BV-2 MIKROGLIJA STANICA U UVJETIMA AKTIVACIJE

---

Papić, Eliša

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:754189>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Eliša Papić

METABOLIČKI PROFIL BV-2 MIKROGLIJA

STANICA U UVJETIMA AKTIVACIJE

Diplomski rad

Rijeka, 2017.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Eliša Papić

METABOLIČKI PROFIL BV-2 MIKROGLIJA

STANICA U UVJETIMA AKTIVACIJE

Diplomski rad

Rijeka, 2017.

Mentor rada: prof. dr. sc. Natalia Kučić, dr. med

Diplomski rad ocijenjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Jasenka Mršić Pelčić, dr. med. (predsjednik povjerenstva)
2. prof. dr. sc. Zlatko Trobonjača, dr. med.
3. prof. dr. sc. Ivana Marić, dr. med.

Rad sadrži 33 stranice, 9 slika i 45 literaturnih navoda.

## Sadržaj

Uvod .....	1
Mikroglija stanice .....	1
Povijest i razvoj istraživanja mikroglija stanica .....	1
Mikroglija u fiziološkim uvjetima SŽS-a .....	2
Mikroglija stanice u patološkim stanjima .....	3
BV-2 mikroglija stanična linija i prikladnost njihove uporabe u in-vitro istraživanjima .....	6
Mikroglija polarizacija i obilježja M1 i M2 fenotipa .....	6
M1 ameboidne mikroglija stanice .....	6
M2 razgranate mikroglija stanice .....	7
Metabolički profil mikroglija stanica i transportni putevi glukoze u SŽS-u .....	9
Fetuin A kao proupalni čimbenik .....	11
Svrha rada .....	12
Materijali i postupci .....	13
Stanična linija .....	13
Svjetlosna mikroskopija .....	13
Imunoflorescencija na staklu .....	13
Rezultati .....	15
Učinak FCS-a na morfologiju BV-2 mikroglija stanica .....	15
Učinci FCS-a na funkciju BV-2 mikroglija stanica .....	17

Rasprava .....	21
Zaključak .....	25
Sažetak .....	26
Summary .....	27
Literatura .....	28
Životopis .....	33

Popis skraćenica i akronima

SŽS - Središnji Živčani Sustav

SGLT – Sodium Dependent Glucose Transporter(glukozni transporter ovisan o natriju)

GLUT- Sodium Independent Glucose Transporter(glukozni transporter neovisan o natriju)

FCS – Fetal Calf Serum(Fetalni goveđi serum)

PM – Primarna mikroglia

PAMP – Pattern-Associated Molecular Patterns

DAMP – Danger-Associated Molecular Patterns

AMPK – adenzin monofosfat aktivirana protein kinaza

ANLS – Astrocitno-Neuronalni Laktatni Shuttle

## Uvod

### *Mikroglia stanice*

Mikroglia stanice predstavnice su prirođenog imunološkog sustava u središnjem živčanom sustavu(SŽS) i kao takve su zastupljene u svim moždanim regijama, leđnoj moždini pa čak i mrežnici. Poimanje mikroglia stanica mijenjalo se s godinama, počevši od usporedbe sa strukturnim ljepljivom u mozgu do ideje da su jednostavni makrofagi nastanjeni u mozgu. Rezultati višegodišnjih istraživanja pokazali su doduše da njihova funkcija seže daleko izvan bazičnih imunih reakcija te da zadire u ključne procese iza funkcioniranja ljudskog mozga, uključujući i metabolizam neurona s ostalim stanicama središnjeg živčanog sustava. Njihove primarne funkcije tako po najnovijim saznanjima uključuju regulaciju homeostaze, čuvanjem integriteta i strukture SŽS-a.<sup>1 2</sup>

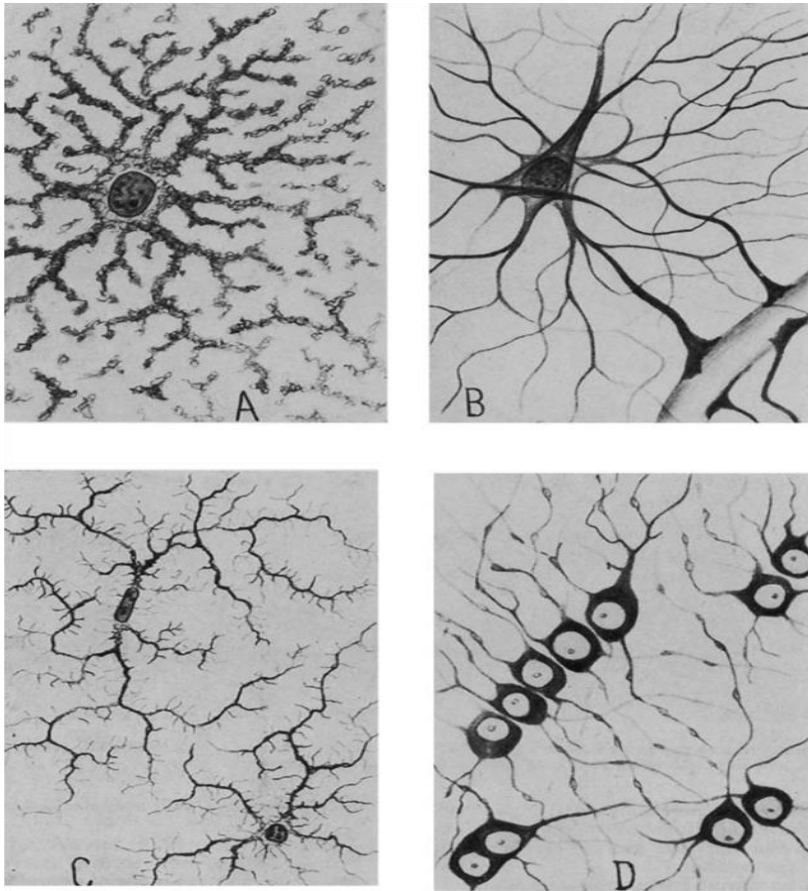
### *Povijest i razvoj istraživanja mikroglia stanica*

Danas se ocem mikroglie smatra Pio del Rio-Hortega, koji je u suradnji sa Santiago Ramon y Cajalom i Wilferd Penfieldom revolucionarizirao neuroznanost. Ramon y Cajal zaslužan je za otkriće neurona, Penfield je definirao važnost i ulogu oligodendroglie, dok je Pio del Rio-Hortega između 1919. i 1921. , nizom pokusa u kojima je koristio bojanje stanica srebrnim karbonatom otkrio i prve mikroglia stanice (Slika 1). U vizionarskom radu objavljenom 1932. godine opisao je glavne morfološke oblike mikroglia stanica, od ameboidnih do razgranatih<sup>3</sup>, koje i danas možemo uočiti u in vitro modelima.

Nakon spomenutih otkrića, istraživanje na mikroglia stanicama ulazi u limbo od 50 godina, poglavito zbog poteškoća izolacije iz SŽS-a. 1986. godine izlazi rad Giuliana D., prvi u nizu koji



istražuje mikroglia stanice izolirane iz mozga sisavaca. S vremenom, interes za mikroglia stanice sve više raste, s imunološke, ali i recentnije, metaboličke strane.



**Slika 1** : 4 tipa glia stanica po Hortegi : A – protoplazmatska neuroglia sive tvari. B – fibrozna neuroglia bijele tvari. C – mikroglia. D – oligodendrociti.

Izvor : <https://wiki.brown.edu/confluence/display/BN0193S04/del+Rio-Hortega>

### *Mikroglia u fiziološkim uvjetima SŽS-a*

Kao stanice mezenhimalnog podrijetla, mikroglia stanice migriraju već tijekom ranog razvoja SŽS-a, prije nego što se formira krvno-moždana barijera. Imaju važnu ulogu u njegovom ranom razvoju te su jedne od ključnih aktera u proliferaciji, diferencijaciji, rasporedu i umrežavanju neurona, za vrijeme razvoja, ali i kroz cijeli život, pokazujući određene učinke u procesu

starenja.<sup>4</sup> Mikroglia stanice imaju i značajnu ulogu u praćenju sinaptičke aktivnosti, te posjeduju i niz receptora za razne metabolite koji se oslobađaju u kojeg čine i okolni neuronima i ostale glia stanice, time prateći i njihovu aktivnost.<sup>1</sup> Izuzev utjecanja na imunu ravnotežu i registriranje promjena u mikrookolišu SŽS-a, mikroglia s vremenom su se pokazale iznimno važnim sudionicima u sinaptičkom remodeliranju mozga, i to putem fagocitoze nepotrebnih sinapsa, tzv. *strippingom* (od engl. *stripping* = uklanjanje), uz susljedno facilitiranje sinaptogeneze, putem cijelog spektra faktora rasta kao posrednika koje izlučuju. Time je učvršćena uloga mikroglia stanica u neuroplastičnosti mozga.<sup>5</sup> Uklanjanje staničnog debrisa s apoptotičnim stanicama u CNS-u jedna je od glavnih funkcija mikroglia stanica, no valja spomenuti i da posjeduju sposobnost fagocitoze živih neurona, poglavito u stanjima staničnog stresa, što bi moglo ukazivati na njihovu ulogu u nastanku brojnih patofizioloških stanja, ali bitnije, u održavanju homeostaze.<sup>6</sup>

Mikroglia stanice pokazale su se i metabolički jedinstvenim stanicama, te iako su porijeklom blisko vezane uz periferne makrofage, posjeduju specifične karakteristike vidljive samo u SŽS-u. Tako se pokazalo da mikroglia stanice, umjesto proizvodnje ATP-a putem oksidativne fosforilacije, češće pribjegavaju aerobnoj glikolizi, slično Warburg efektu koji je otkriven u nekim tumorskim stanicama. Time istovremeno konzerviraju dovoljne količine energije za sve najbitnije stanične funkcije, a ipak proizvode dovoljne količine ATP-a.<sup>7</sup>

### *Mikroglia stanice u patološkim stanjima*

Mikroglia, kao rezidentne imune stanice SŽS-a posjeduju sposobnost relativno brze preobrazbe morfologije, a time i funkcije, kao odgovor na različite patološke podražaje. Ti poticaji mogu se podijeliti u dvije osnovne grupe: PAMP ( od engl. pathogen-associated molecular patterns) i DAMP (od eng. danger-associated molecular patterns). PAMP obuhvaća

različita egzogena strukturna obilježja (glikoproteini, glikolipidi, lipopeptidi, RNA i DNA bakterija, virusa, gljiva i protozoa) koje zajednički djeluju kao signal za transformaciju mikroglija stanica u fagocitni oblik. DAMP s druge strane, obuhvaća endogeni poticaj te dovodi do transformacije i „sterilne upale“ bez obzira što nije vidljiv egzogeni uzrok. Među otkrivenim DAMP signalima treba navesti i proteine visoke pokretljivosti, HMGB-1 (od engl. high mobility group box proteins 1), različite proteine toplinskog šoka, HSP (od engl. heat shock proteins), fibronektin, lipoprotein, serumski amiloid i amiloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) kao i fetuin A.<sup>8 9</sup> DAMP i PAMP signali najviše djeluju preko receptora za prepoznavanje obrazaca (od engl. pattern recognition receptor, PRR) koji se vezuju uz prirođenu imunost te pokreću cijelu signalnu kaskadu koja za cilj ima aktivaciju i transformaciju mikroglija stanica u proupalni oblik kroz jezgri faktor kappa B (od engl. nuclear factor kappa B, NF $\kappa$ B) i mitogen aktiviranom protein kinazom (od engl. mitogen activated protein kinase, MAPK). Ovaj tip polarizacije stanica spada u M1 fenotip, specijaliziran za održavanje i propagaciju upalnog stanja putem različitih funkcija poput fagocitoze, mobilizacije stanice periferne imunosti i lučenje proupalnih citokina.<sup>10</sup>

S druge strane, kod mehaničkih ozljeda, poput oštećenja leđne moždine i traumatske ozljede mozga, ili bilo kojeg drugog relativno akutnog stanja poput ishemične reperfuzijske ozljede, DAMP inducira prirođeni imunološki sustav te se aktiviraju različiti upalni čimbenici. Ovaj odgovor vezuje se više uz reparaciju rana i nastalih diskontinuiteta te uklanjanja debrisa. No, odgovor se prebacuje na protoupalni gdje se promoviraju funkcije kao odlaganje ekstracelularnog matriksa i angiogenezu. Ovaj prijelaz iz M1 u M2 fenotip omogućuje potpunu obranu od nastale štete uz popravak ugroženih stanica i mikrookoliša. Ukoliko ne dođe uspješno do ovog prijelaza, a M1 stanice ne uspiju sanirati i umiriti upalu, konstantna prisutnost upalnih citokina i reaktivnih kisikovih radikala na kraju će voditi u staničnu smrt i daljnje oštećenje tkiva.<sup>11</sup>

Kronično neuroinflamatorno stanje, perzistirajući je odgovor koji kreće sa inicijalnim upalnim podražajem, ali ubrzo postaje samopropagirajući. Zbog DAMP signala i upalnih faktora koji se oslobađaju od strane mikroglija stanica i astrocita, održava se svojevrsni začarani krug upale živčanog tkiva, koji vodi u sve veću aktivaciju glija stanica i oštećenje tkiva. Smatra se da je ovaj perzistirajući upalni odgovor zapravo posljedica neučinkovitog M2 odgovora. Manjak M2 mikroglija stanica dovodi do loše kontrole upale, ali se također i luči manje neuroprotektivnih faktora poput inzulinu sličnog faktora rasta 1 ( od eng. insulin-like growth factor 1, IGF1) ili neurotrofnog moždanog faktora ( od engl. brain-derived neurotrophic factor, BDNF). Neprikladan M2 odgovor i neravnoteža M1/M2 profila mikroglija stanica često se smatra podlogom različitim neurodegenerativnim bolestima.<sup>11</sup>

Neurodegenerativne bolesti u starijoj dobi poput Alzheimerove bolesti često imaju udio svoj etiologije u pretjeranoj transformaciji mikroglija stanica i održane upale koja potiče samu sebe vodeći do neurotoksičnih učinaka. U starosti, mikroglija stanice pokazuje manje izdanaka nego u mlađoj dobi. U takvim uvjetima mikroglija stanice imaju veći afinitet prema aktiviranom fenotipu, M1 oblika, što se lako može povezati s neurotoksičnošću koja stoji u pozadini mnogih neurodegenerativnih bolesti. <sup>4</sup> Kronična upala u nekim psihijatrijskim bolestima poput bipolarnog poremećaja i shizofrenije prema istraživanjima posljedica je usmjeravanja mikroglija stanice na same neurone, reagirajući na njihovu pretjeranu aktivnost. No, istraživanja je na ovom polju nedovoljno, te su mikroglija stanice i dalje samo hipotetski krivac u cijeloj priči gdje čak i postoje određene indikacije prema kojima je neurotoksičnost kod ovih slučajeva zapravo korisna jer odstranjuje neučinkovite/nefunkcionalne neurone i sinapse.

### *BV-2 mikroglija stanična linija i prikladnost njihove uporabe u in-vitro istraživanjima*

BV-2 mikroglija je imortalizirana mišja stanična linija koja se pokazala opravdanom zamjenom za primarnu mikrogliju (PM) in-vivo. Iako je ushodna regulacija gena karakterističnih za primarnu mikrogliju kod BV-2 stanica bila manje izražena, pokazale su jednaku reakciju na faktore poput LPS-a, uz to posjeduju normalnu regulaciju NO proizvodnje i funkcionalni odgovor na IFN- $\gamma$ , što su bitni parametri za prikladnu interakciju s T-stanicama i neuronima. BV-2 stanice također uspješno stimuliraju druge glija stanice putem poticanja translokacije NF- $\kappa$ B sa susljednim lučenjem IL-6 u astrocitima. Prednost je njihov kratak period kultivacije i činjenica da su imortalizirane, što omogućuje učinkovitija istraživanja ograničenja i ranog odumiranja stanica. Jedna od mana mogao bi biti manjak SŽS faktora u kulturi, no uzevši sve u obzir BV-2 mikroglija stanična linija izvrsna je zamjena za primarnu mikrogliju.<sup>12</sup>

### *Mikroglija polarizacija i obilježja M1 i M2 fenotipa*

Unutar normalnih uvjeta, mikroglija stanice drže se neuralno-specičnog fenotipa te su okrenute prema konstantnom nadzoru moždanog parenhima. Ovo je omogućeno različitim astrocitnim, neuronskim, ali i perifernim faktorima koji se luče u okolinu, u nenarušenim, fiziološkim uvjetima. No, kako je već i Hortega primijetio, funkcija mikroglija stanica usko je vezana uz njihovu morfološku prezentaciju, a ona dalje o uvjetima, faktorima i medijatorima kojima su mikroglija stanice izložene. Tako su utvrđena dva osnovna fenotipa, M1 i M2, kao i prijelazni, M1/M2 miješani oblik, svaki sa svojom funkcijom i oblikom, za koje se prije može reći da se komplementiraju nego isključuju.<sup>10</sup>

### *M1 ameboidne mikroglija stanice*

Slično kao i makrofagi od kojih potječu, mikroglija stanice mogu na određene faktore, ukoliko dođe do prikladne stimulacije, reagirati prezimanjem aktiviranog proupalnog, ameboidnog

oblika. Ova forma mikroglija stanica izražava cijeli niz imunih receptora, poput toll-like receptora (TLR) i nukleotid-vežućih oligomerizacijskih domena (od engl. nucleotide-binding oligomerization domain, NOD) putem kojih prepoznaju štetne čimbenike. Neki od čimbenika koji izazivaju polarizaciju mikroglija uključuju upalne citokine poput interferona gama (IFN- $\gamma$ ) i čimbenika tumorske nekroze (od engl. tumour necrosis factor-  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ). Nakon polarizacije, M1 stanice luče svoje upalne citokine (TNF- $\alpha$ , interleukini 1 $\beta$  i 12), sudjeluju u prezentaciji antigena te izražavaju visoke razine inducibilne sintetaze dušikovog monoksida (od engl. inducible nitric oxide synthase, iNOS) za proizvodnju NO.<sup>10 13</sup>

NO proizveden od strane M1-mikroglija stanica služi kao efektorska molekula s mikrobicidnom aktivnošću i kapacitetom za inhibiciju proliferacije stanica.<sup>14</sup> Ovo je posebno vidljivo u upalnim stanjima, gdje osim NO raste i laktat, te glikolitička aktivnost, jedan od glavnih metaboličkih obrazaca M1-mikroglije. Valja napomenuti da IL-4, inače karakterističan za M2-mikroglija stimulaciju pokazuje učinak u smislu smanjene potrošnje glukoze i proizvodnje laktata.<sup>10 15</sup>

### *M2 razgranate mikroglija stanice*

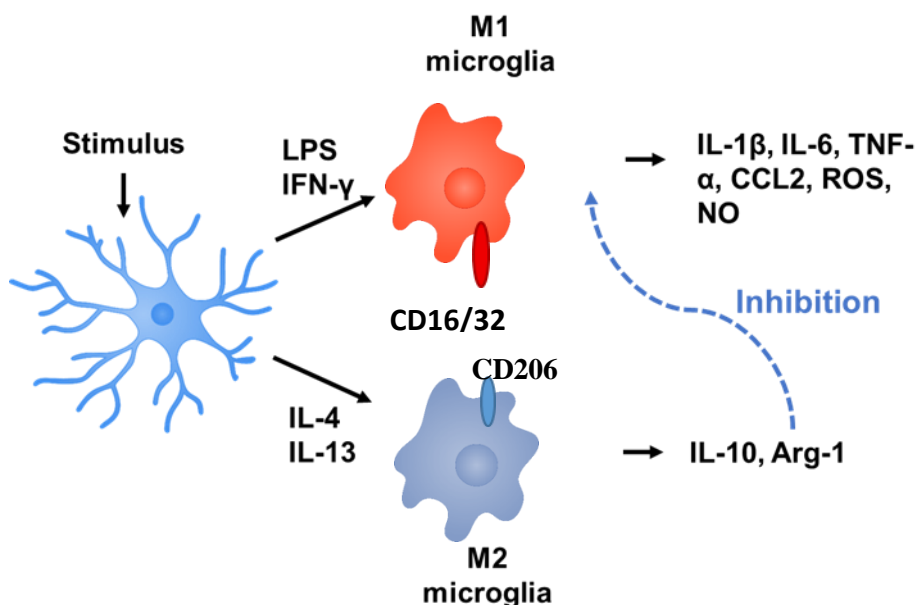
Definiranje M2 mikroglija profila, otpočinje definiranjem M2 perifernih makrofaga te se kao takva oslanja na paletu receptora koje izražava nakon izlaganja određenim čimbenicima, na lučenje citokinskog profila spregnutog s njihovom odgovarajućom funkcijom koja se vezuje uz popravak i zaštitu stanica od upale. Po izlaganju čimbenicima poput IL-4 i IL-13 aktiviraju se razni nizvodni procesi koji vode do ovog protuupalnog učinka, vidljivog u pojačanoj ekspresiji Arg1, inhibiciji NF- $\kappa$ B te lučenju tzv. receptora čistača za fagocitozu (od eng. *scavenger*). Ovaj tip aktivacije klasificiran je kao M2a.<sup>16</sup>

Prilikom izlaganja IL-10, glukokortikoidima i TGF- $\beta$ , dolazi do slijedećeg oblika aktivacije poznatijeg kao M2c. Ovaj oblik se prije definirao kao inaktivirana forma, što bi bilo točno samo

u smislu djelovanja protiv upale. M2c makrofazi uključeni su u remodeliranje tkiva i depoziciju matriksa nakon smirivanja upale.<sup>17 18</sup>

Treći tip aktivirane M2 forme M2b, više podsjeća na M1 profil stanica, u smislu odsustva M2 specifičnih markera poput arginaze 1 (Arg- 1), eozinofilnog kemotaktičnog citokina (YM1). S druge strane M2b makrofagi izražavaju tipičan citokinski profil nakon izlaganja IL-10 i IL-12, kao i M2c makrofagi. M1-M2 (abc) nomenklatura preuzeta je iz klasifikacije perifernih makrofaga te integrirana u istraživanja mikroglia stanica. Problemi nastaju kada se uzme u obzir da mikroglia stanice nisu periferni makrofagi koji su migrirali u mozak, već su rezidentne mezenhimalne stanice koje naseljavaju mozak već u ranom razvoju. Izražaj markera kao i funkcija se također ne podudaraju u potpunosti s perifernim makrofagima. Mikroglia u SŽS-u koristi se aerobnom glikolizom kao preferiranim izvorom supstrata za ATP za razliku od perifernih makrofaga koji se u fiziološkim uvjetima, kao i većina stanica, koriste oksidativnom fosforilacijom.<sup>7 17</sup>

Prvi M2 oblik makrofaga klasificiran je zahvaljujući manoznom receptoru (CD206) koji je izražen u ovom staničnom obliku. S vremenom, sve je više markera otkriveno koji bi spadali u „M2 specifične“ markere. Jedan od tih je Arg1, čija je funkcija pretvorba arginina u poliamine, proline i ornitine.



**Slika 2. M1 i M2 mikroglia polarizacija pod različitim stimulusima** LPS i IFN- $\gamma$  potiču prelazak u M1 stanje, s pojačanom ekspresijom CD16/32 markera i lučenjem različitih proupalnih čimbenika (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CCL2, ROS, NO). S druge strane, IL-4 i IL-13 precipitiraju prelazak u M2-stanje, s ekspresijom CD206 markera i pojačanim lučenjem IL-10 i Arg-1 koji inhibiraju lučenje proupalnih čimbenika.

### *Metabolički profil mikroglia stanica i transportni putevi glukoze u SŽS-u*

Glukoza je glavni metabolit koji je esencijalan za preživljenje stanica mozga i živčanog sustava. Stanice SŽS-a glukožu pribavljaju pomoću 2 tipa glukoznih transportera : natrij-glukoza vezani transporter (od engl. sodium-glucose linked transporter SGLT) koji transportira glukožu protiv svog koncentracijskog gradijenta i glukoznog transportera (od engl. glucose transporter, GLUT) koji transportira glukožu facilitiranom difuzijom držeći se njenog koncentracijskog gradijenta.<sup>19 20</sup>

Različite vrste GLUT transportera vezane su uz različite regije i stanice mozga, pa je tako GLUT 1 najčešće prisutan kod moždane mikrocirkulacije i vezan je za transport glukoze kroz krvno-moždanu barijeru. Glukoza dospjela do astrocita preko GLUT1 metabolizira se u laktate koji potom neuronima služe kao energetska izvor. Pokazano je da različiti citokini, primjerice IL-1 $\beta$ ,



koji luče M1 mikroglia stanice, povećavaju ekspresiju GLUT1 transportera na astrocitima. GLUT2 transporter prisutan je u hipotalamičkim neuronima te služi kao glukozni senzor za regulaciju unosa hrane. Uz navedeno, GLUT2 služi i kao regulator sinaptičke i neurotransmitske aktivnosti. GLUT3 je najzastupljeniji glukozni transporter u mozgu, s transportnim kapacitetom koji je čak pet puta veći od GLUT1. Prisutan je u neuropilu, ponajprije u aksonima i dentritima. GLUT5 transporter je jedini heksozni transporter izražen na mikroglia stanicama, te umjesto glukoze prenosi fruktozu.<sup>19</sup>

Sve je više dokaza koji vezuju funkciju mikroglia stanica uz metaboličko reprogramiranje prirođenog imunog odgovora. U normalnim uvjetima kisika, stanice dolaze do energije putem dva različita mehanizma. U prvom se glukoza razgrađuje do piruvata putem glikolize, ulazi u Krebsov ciklus u mitohondrijima gdje dolazi do stvaranja ATP-a procesom oksidativne fosforilacije.<sup>21</sup> U slučaju hipoksičnih uvjeta, piruvat se anaerobnom glikolizom konvertira u laktat. Ovaj metabolički prijelaz facilitiraju fosfoinozitol 3 kinaza/protein kinaza B signali (od engl. phosphatidylinositol-3-kinases/protein kinase B, PI3K/Akt), a inhibiraju AMP-aktivirana PK(AMPK) i interleukin-10.<sup>22 23</sup> Isti ovi signali vezani su uz polarizacijska stanja makrofaga na periferiji. AMPK potiče prijelaz u M2 protuupalni tip makrofaga te potiče lučenje IL-10, koji inhibira potom lučenje različitih upalnih citokina karakterističnih za upalna stanja i upalni, M1, fenotip.<sup>24</sup>

Najnoviji dokazi govore u prilog Warburgovom efektu kao alternativnom mehanizmu metaboliziranja glukoze. U tom slučaju dolazi do prijelaza s oksidativne fosforilacije na aerobnu glikolizu. Pretpostavlja se da je riječ o obliku evolucijskog odgovora u korist proliferacije stanica, koji bi preko makrofaga, ali i mikroglia, mogao ići u korist prirođenog imunog sustava.<sup>7</sup>

Uz sve priloženo razvidno je da metabolizam mikroglija, koji u ovom pogledu ne odudara od metabolizma makrofaga, podosta ovisi o fenotipu i polarizacijskom obliku koji poprime.

### *Fetuin A kao proupalni čimbenik*

Fetuin-A serumski je glikoprotein sintetiziran i lučen iz jetre, te u manjoj mjeri iz bubrega, placente i jezika. Član je cistatinske obitelji proteina, iako mu nedostaje inhibitorni kapacitet cistein proteaze. Ključna fiziološka funkcija koja mu se pripisuje, zahvaljujući pokusima na fetuin-A knock-out miševima, je inhibicija ektopične kalcifikacije. U jednoj studiji pokazano je da je fetuin-A medijator aktivacije PI 3-kinaze/Akt puta.<sup>27</sup>

Fetuin-A je u nekim istraživanjima pokazao antiinflamatorni učinak u kontekstu cerebralne ishemije te je pronađena i njegova veza s Alzheimerovom bolešću, gdje su koncentracije plazmatskog fetuina imale obrnuto proporcionalnu vezu s TNF- $\alpha$ .<sup>28</sup> S druge strane, u pokusima s fetuin-A knockout miševima aficiranim eksperimentalnim autoimunim encefalitisom (EAE) pokazan je proupalni učinak, te su simptomi encefalitisa bili blaži kod knockout miševa nego kod kontrolne skupine gdje se očuvao fetuin-A. Pretpostavlja se da je to djelomično zbog inhibicije TGF  $\beta$  koji inače ima imunosupresivnu ulogu, no direktna veza u pokusu nije nađena. Kod knockout miševa, iako je bila prisutna dramatična redukcija EAE simptoma, zabilježeno je povećano lučenje proupalnih gena za IL-1  $\beta$  i IL-12. Fetuin je u ovom slučaju djelovao na razini organizma te nije nađena direktna korelacija s neuroinflamacijom, ali vidimo da ima ulogu u prirodnom imunološkom odgovoru.<sup>29</sup> Zamijećena je i pojačana ekspresija fetuin-a kod makrofaga stimuliranih LPS-om.<sup>8</sup>

Fetuin se pokazao kao proupalni čimbenik vezan uz primarni imuni odgovor, putem supresije imunosupresivnih monocita u slezeni, pojačane ekspresije na CD11b+ and CD11c+ te ne postoji sumnja u njegovu povezanost s imunim sustavom.<sup>29</sup>

## Svrha rada

Već uspostavljenim istraživanjima pokazano je da funkcija mikroglija stanica, kao i njihov metabolički profil izravno ovise o stanju aktivacije stanica (M1/M2).<sup>10</sup> To je značajno uzmemo li u obzir da mikroglija stanice sudjeluju u različitim neurodegenerativnim, upalnim ali i reparacijskim procesima u središnjem živčanom sustavu.<sup>2</sup> Kao glavne reaktivne stanice SŽS-a, direktno su vezane uz ono što se odvija u njihovom mikrookolišu, uključujući niz faktora koji mogu poticati transformaciju njihovog metaboličkog i fenotipskog profila.<sup>10</sup>

U protokolu kultivacije mikroglija stanica, već se neko vrijeme koristi fetalni goveđi serum (Fetal Calf Serum, FCS) u različitim koncentracijama, najčešće 10%.<sup>31</sup> Zamijetili smo da BV-2 stanice u kulturi naginju ka ameboidnoj morfologiji, te smo se pitali koja bi tvar prisutna u mediju mogla djelovati kao poticaj za M1 polarizaciju stanica. Pomnijim istraživanjem sastava medija došli smo do jednog od ključnih sastojaka koji bi mogao biti odgovoran za taj učinak - fetuin.<sup>32</sup>

Cilj rada bio je otkriti ukoliko fetuin u FCS-u utječe na stanje polarizacije i posljedične promjene fenotipskih i metaboličkih obilježja BV-2 stanica in-vitro. Kultivacijom stanica s različitim koncentracijama FCS-a (10% FCS; prebacivanje iz 10% FCS-a u medij bez FCS-a; kultivacija u mediju bez FCS-a) pratili smo promjene morfologije i funkcionalne promjene putem markera specifičnih za M1 i M2 fenotip mikroglija stanica.

## Materijali i postupci

### *Stanična linija*

BV-2 stanična linija ustupljena nam je ljubaznošću dr.sc. Jasne Križ iz Montreala (Laval University, Quebec, Kanada). Stanice su uzgajane u inkubatoru u uvjetima temperature od 37°C i udjela 5% CO<sub>2</sub> te kultivirane u standardnom Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) mediju uz dodatak 5-10% fetalnog goveđeg seruma (FCS, engl. Fetal Calf Serum), 1% penicilin/streptomicina i 1% L-glutamina.

### *Svjetlosna mikroskopija*

Promjene morfologije staničnih kultura praćene su svjetlosnim mikroskopom Olympus CKX41, a dobivene slike analizirane su programom Image Studio Lite.

### *Imunoflorescencija na staklu*

Na ploče za uzgoj stanica sa 12 jažica prije naseljavanja stanica stavljena su sterilna pokrovna stakalca. Stanice su uzgajane na 37°C i uz 5% CO<sub>2</sub>. Uslijedila je 24 –satna inkubacija nakon čega je uklonjen DMEM medij za uzgoj stanica. Stakalce sa stanicama isprano je tri puta PBS-om i dodan je 4%-tni paraformaldehid (PFA) za fiksaciju stanica (15 minuta). Uslijedilo je ispiranje stanica PBS-om (tri puta), koje se ponavlja nakon svakog koraka. Stanice su zatim tretirane s 0,5%-tnim detergentom Triton-x u svrhu permeabilizacije stanične membrane (7 minuta). Nakon permeabilizacije uslijedilo je blokiranje pomoću 5%-tnog FCS seruma (30 minuta, 4°C) te je po završetku inkubacije dodano 150 µL otopine odgovarajućeg primarnog protutijela. Primarno protutijelo je inkubirano 1 sat na sobnoj temperaturi. Korištena su sljedeća primarna protutijela: Croma 101 (anti-mišje monoklonalno mišje protutijelo, Zavod za fiziologiju i proteomiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci), anti-iNOS (anti-mišje kuniće

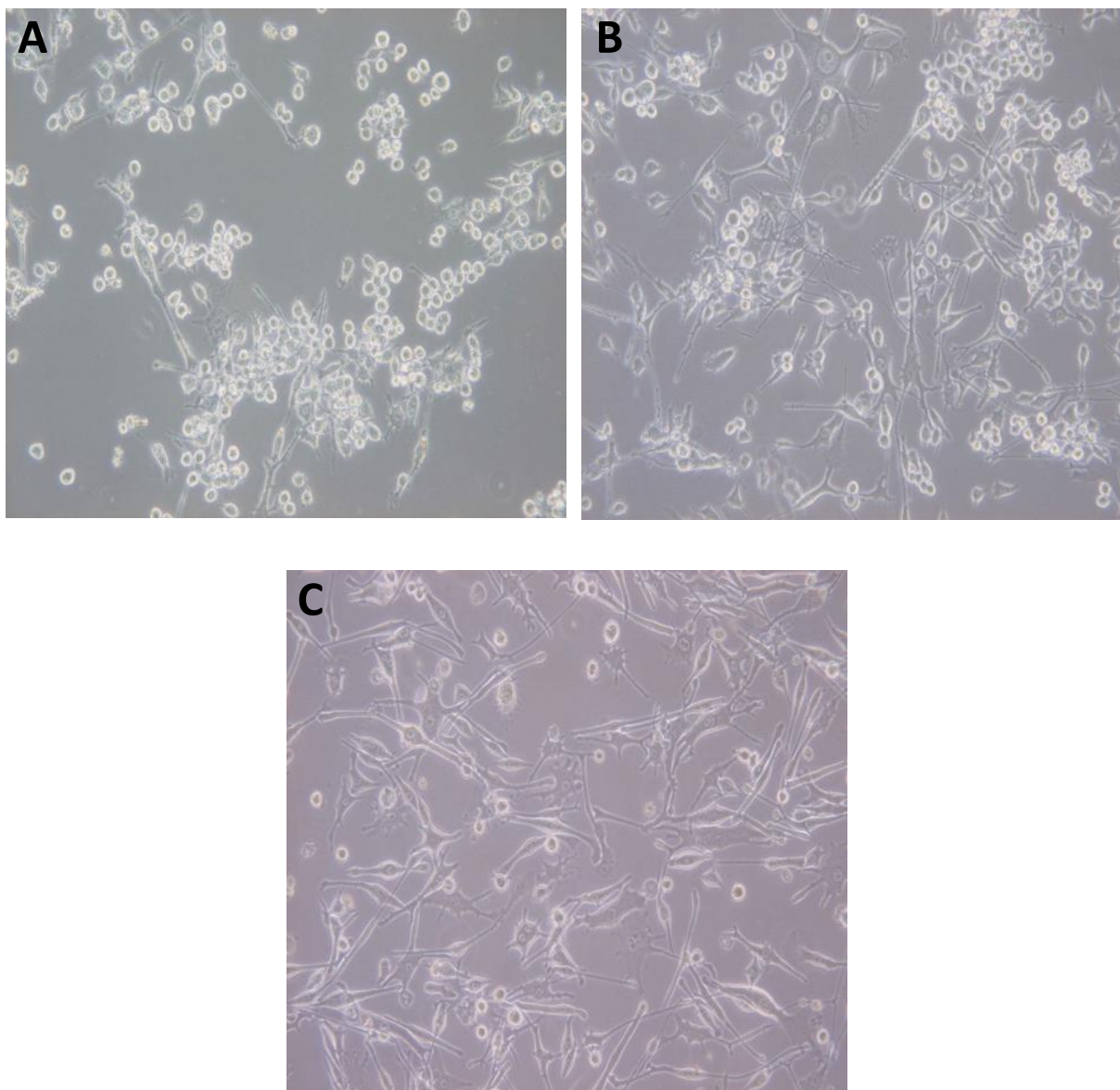
protutijelo, Abcam) , anti-C1q ( anti-mišje monoklonalno protutijelo), anti-Arg1(antimišje poliklonalno kuničje protutijelo, Santa Cruz), anti CD16-32 (antimišje štakorčje konjugirano protutijelo, BD Bionics), antiCD206 (anti-mišje štakorje protutijelo, BioRad) . Nadalje, dodano je 150  $\mu$ L otopine odgovarajućeg sekundarnog protutijela konjugiranog s fluorescentnom bojom koje je inkubirano 45 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Korištena su sljedeća sekundarna protutijela: anti-mišje IgG1-Alexa 555 (kozje protutijelo, Invitrogen), anti-štakorje IgG-Alexa 488 (kozje protutijelo, Abcam) i anti-kuničje IgG-Alexa 488 (kozje protutijelo, Life Technologies). Navedena protutijela korištena su i kao negativna kontrola. Nakon inkubacije sekundarnih protutijela, stakalce s uzorkom uklopljeno je na predmetno staklo pomoću uklopnog sredstva (otopina moviola) i pohranjeno u mapi do analize rezultata. Signal je očitavan pomoću Olympus BX51 fluorescentnog mikroskopa i slike su analizirane Olympus Cell-F programom.

## Rezultati

### *Učinak FCS-a na morfologiju BV-2 mikroglia stanica*

Oslonivši se na naše prijašnje zapažanje da su BV-2 stanice u kulturi poprimale dominantno ameboidni oblik, inače pripisivan aktiviranom M1-polarizacijskom stanju, što bi ukazivalo na prisutnost čimbenika aktivacije M1-fenotipa, a pod pretpostavkom da u FCS-u, serumu stranog organizma, postoji sastojak koji aktivira mikroglia stanice, kultivirali smo stanice s različitim udjelom FCS-a (Slika 3.) kroz period od 96 sati kako bismo utvrdili postoji li uistinu razlika u njihovoj morfologiji.

Prva kultura bila je uzgajana kroz 96 sati s 10% FCS-om, druga je nakon 72 sata prebačena u medij bez FCS-a, dok je treća kultivirana 96 sati bez FCS-a. Na priloženim slikama vidi se da se morfologija razlikuje što je u ovom slučaju ovisilo o korištenoj koncentraciji FCS-a prisutnoj u mediju. Kultura uzgajana kroz 96 sati s 10% FCS-om pokazuje ameboidnu morfološku formu, karakterističnu za aktivirano stanje (Slika 3A). Kod kulture gdje je medij promijenjen nakon 72 sata iz 10% FCS-a u onaj bez FCS-a može se primijetiti početak grananja i bipolarni morfološki oblik (Slika 3B). Kultura uzgajana bez FCS-a nakon 96 sati pokazuje razgranatu morfološku formu, tzv. ramified oblik stanica (Slika 3C).



**Slika 3. Morfološki profil BV-2 stanica uzgajanih s različitim koncentracijama FCS-a.** BV-2 stanice uzgajane su u tri različite kulture. Morfologija je praćena pomoću svjetlosnog mikroskopa nakon 96 h kultivacije. Slike pokazuju stanice uzgajane s 10% FCS (A), stanice s promijenjenim medijem iz 10% FCS-a u medij bez FCS-a (B) te stanice uzgajane u mediju bez FCS-a kroz 96 sati (C). Uočava se da je osim medija i vrijeme faktor u postizanju razgranate forme, budući da je kultura kraće uzgajana bez FCS-a (24h) dovela do prijelaznog, bipolarnog morfološkog oblika.

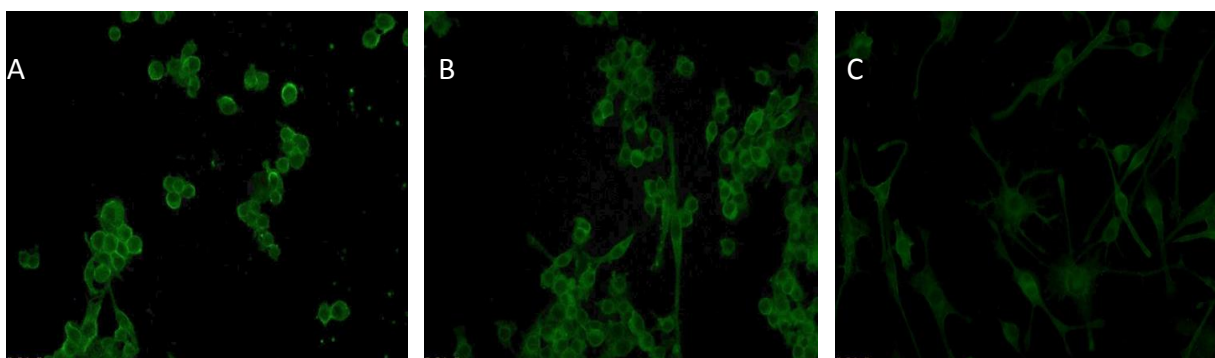
### *Učinci FCS-a na funkciju BV-2 mikroglia stanica*

Po potvrdi razlike morfološke prezentacije BV-2 stanica, valjalo je provjeriti prati li je i razlika u funkciji. Koristeći već utvrđene markere za M1 i M2 fenotip mikroglia stanica, proveli smo imunofluorescenciju na staklu in-situ. Kao markeri M1 fenotipa korišteni su CD16/32, iNOS, i C1q (komponenta komplementa C1).

**CD16 i CD32** su IgG Fc receptori niskog afiniteta, te su izraženi na B limfocitima, monocitima/makrofagima, NK stanicama, granulocitima itd. Medijatori su adaptivnog imunog odgovora te služe kao markeri aktiviranog, upalnog stanja.<sup>33</sup>

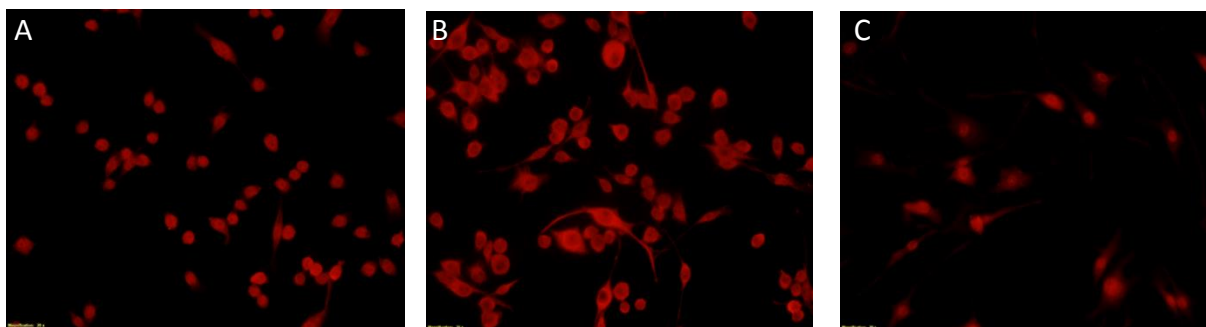
**iNOS** (inducibilna NO sintetaza) marker je upale SŽS-a te se kao takav vezuje često uz patogenezu neurodegenerativnih bolesti poput multiple skleroze, HIV-om potaknute demencija i traume. Njegova pojačana ekspresija javlja se u M1 fenotipu mikroglia stanica, te se koristi kao pouzdani marker tog oblika.<sup>34</sup>

**C1q** komponenta komplementa također pokazuje pojačanu ekspresiju u različitim stanjima, između ostalog i na temelju dokazanog učinka na astrocite i mikroglia stanice koje aktivira.<sup>35</sup>

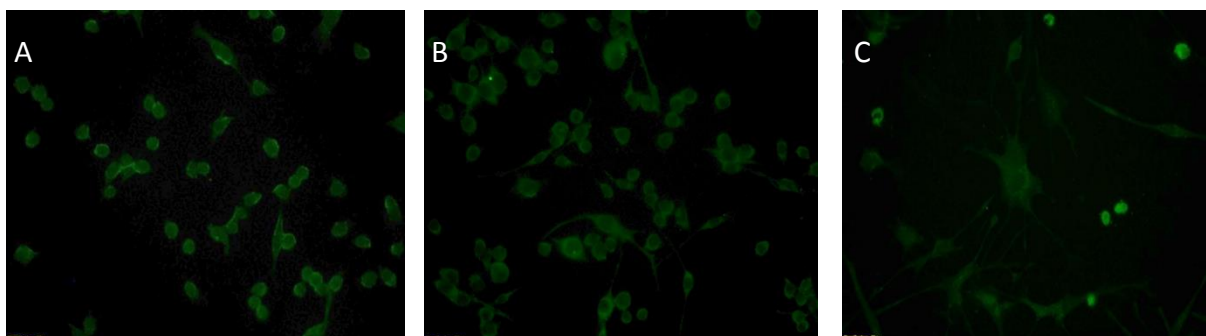


**Slika 4. Izražaj CD 16/32.** Izraženi površinski signal CD16/32 (zelena florescencija) nakon 96 sati u kulturi uzgajanoj s 10% FCS-om (A), koji slabi u kulturi nakon 24-satnog uzgoja u mediju bez FCS-a (B) te značajno izostaje u kulturi uzgajanoj u mediju bez FCS-a kroz 96 sati (C)





**Slika 5. Izražaj iNOS kod različitim koncentracija FCS-a.** Kultura uzgajana u 10% FCS-om kroz 96 sati (A) pokazuje značajno izraženiji signal od kulture uzgajane bez FCS-a kroz 96 sati (C). Kultura koja je prvih 72 h uzgajana s 10% FCS-om pa prebačena u medij s bez FCS-a nakon 24 h pokazuje i dalje izražen signal, no vidljiva je promjena morfologije, prijelazni bipolarni oblici, i početak grananja (ramified M2 fenotip)



**Slika 6. Izražaj C1q markera kod različitim koncentracija FCS-a.** Izuzev par artefakata, nalazimo odsustvo signala u kulturi uzgajanoj u mediju s bez FCS-a kroz 96 sati (C). Kultura koja je od početka uzgajana u 10% FCS-u (A) te ona koja je uzgajana bez FCS-a kroz 24 sata (B) pokazuju slab, ali pozitivan signal.

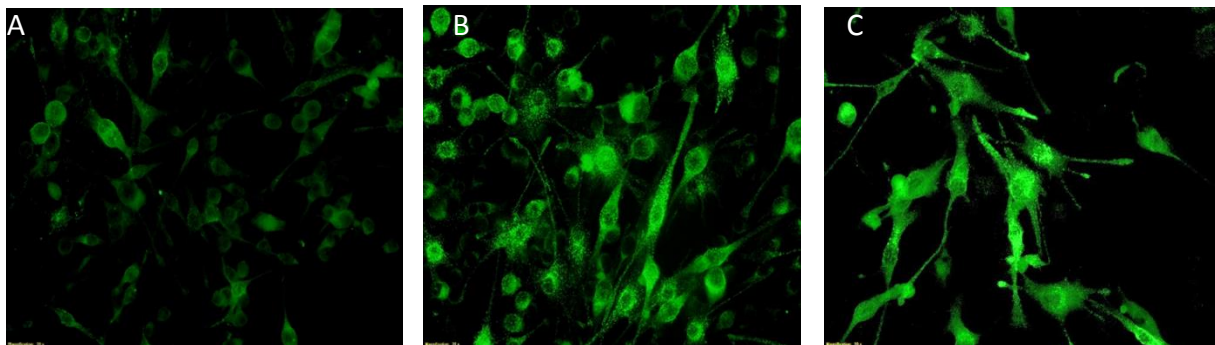
Kao markeri M2, ramified fenotipa BV-2 stanica, korišteni su CD206 i Arg1.

CD206, poznatiji kao manozni receptor, je transmembranski protein, inače najviše izražen na makrofazima, denticnim stanicama i endotelnim stanicama. U mozgu je najizraženiji na mikroglija stanicama i astrocitima. Karakterističan je za M2 oblik mikroglija stanica.<sup>36</sup>

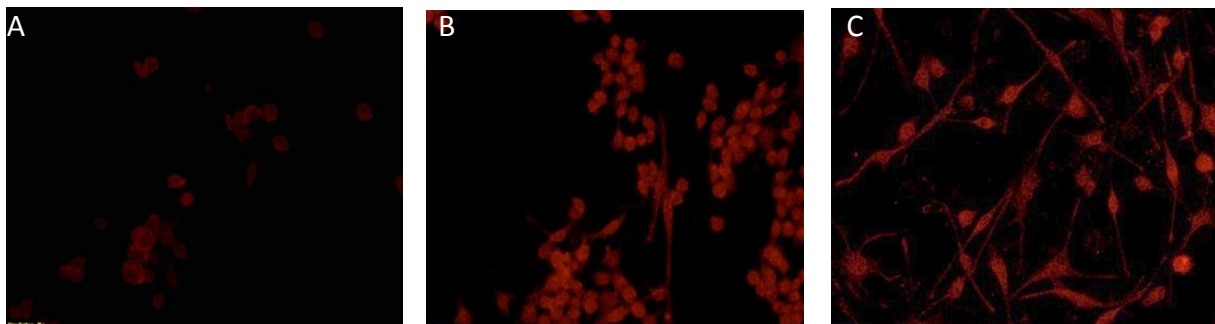
Arg1, poznatiji i kao enzim arginaza 1, marker je M2 stanja čija je funkcija pretvorba arginina u poliamine, prolin i ornitine, koji potom imaju ulogu u cijeljenju ozljeda i depoziciji matriksa.

Zanimljivo je spomenuti da Arg1 kao i iNOS koristi arginin, te postiže kompletno suprotan

učinak inhibirajući proizvodnju dušičnog oksida, za razliku od iNOS-a koji je potiče. Tako ova dva markera predstavljaju određenu ravnotežu u detekciji između M1 i M2 oblika.<sup>11</sup>



**Slika 7. Izražaj CD206 markera u kulturi.** Kultura BV-2 mikroglia stanica uzgajana s 10% FCS-om kroz 96 sati (A) pokazuje najslabiji signal, u kulturi uzgajanoj u mediju bez FCS-a kroz 24 sata (B) vidimo početak granjanja, jači signal i bipolarne stanice, dok je kod kulture uzgajane bez FCS-a kroz 96 sati (C) najjači signal, s jasno definiranim razgranatim, stanicama M2 fenotipa



**Slika 8. Izražaj Arg1 u pokusu.** Duži boravak stanica u mediju bez FCS-a uvjetuje jaču ekspresiju Arg1. Kod kulture s 10% FCS-om (A) signal je nakon 96 h negativan, dok kod kulture koja je nakon 72 sata prebačena u medij bez FCS-a (B), 24 sata kasnije se vidi izražen signal i, kao i kod CD206, početak granjanja. U kulturi koja je kroz 96 sati uzgajana u mediju bez FCS-a (C), vidljive su razgranate stanice i najjači signal.

Na temelju rezultata imunofluorescencije možemo zamijetiti da su markeri M1 stanja više izraženi kod kultura koje su kroz neko vrijeme uzgajane u mediju s 10% FCS-om. CD16/32 (Slika 4.), iNOS (Slika 5.) i C1q komponenta komplementa (Slika 6.) najizraženiji su kod kultura koje su uzgajane kroz 96 sati u 10% FCS-u (A), te su djelomično izraženi i kod kultura koje su kroz

72 sata kultivirane u 10% FCS-u nakon čega su prebačene u medij bez FCS-a te promatrane nakon 24 sata (B). Kulture koje su kroz 96 sati uzgajana bez FCS-a (C) pokazuju značajno smanjen signal M1 markera, što bi popratimo li i morfologiju tih stanica, koja poprima razgranatu formu, ukazivalo više na M2 profil.

Markeri M2 polarizacijskog fenotipa, CD206 (Slika 7) i Arg-1 (Slika 8), slabo su vidljivi u kulturi uzgajanoj u 10% FCS-u (A), poprimaju pojačani signal nakon 24 sata bez FCS-a (B), te su najizraženiji u kulturi koja je uzgajana u mediju bez FCS-a kroz 96 sati (C).

Možemo zaključiti da je izražaj ovih markera uvjetovan vremenom u kojem su kultivirane bez FCS-a, te osvrnemo li se na kulturu koja je bila uzgajana s 10% FCS-om gdje je on uklonjen nakon 72 sata (B), vidimo svojevrsni prijelazni oblik mikroglia stanica, s početnim grananjem i bipolarnim formacijama koji eksprimira i M1 i M2 markere (M1/M2 miješani tip).

## Rasprava

M1/M2 polarizacija mikroglija stanica proces je izrazito fluidne dinamike koji je u našem istraživanju ovisio o vremenu u kojem su mikroglija stanice izložene određenim faktorima i stimulusima iz njihove makro i mikrookoline. M1 metabolički profil popraćen je sa paletom lučenih upalnih citokina, te ima ulogu u akutnoj fazi upalnih stanja, otklanjanjem detritusa i pojačanom antigenom prezentacijom.<sup>37</sup> Ovo stanje nije perzistirajuće jer se mikroglija stanice na kraju prebacuju u M2 profil potaknute promjenama u mikrookolišu okrećući se više prema reparaciji i odlaganju ekstracelularnog matriksa, otklanjanju staničnog detritusa i angiogenezi.<sup>11</sup> Možemo sličnu promjenu popratiti u trenutku kada su stanice prebačene nakon 72 sata iz 10% FCS medija u medij bez FCS-a (kultura B) gdje se počinju javljati markeri M2-fenotipa kao i odgovarajuće morfološke promjene u smislu grananja. Pogrešno bi bilo reći da različita stanja aktiviraju različite metaboličke profile mikroglija, poput M1 u infekcijama, ili M2 u mirovanju, već su ova dva tipa, kao i prijelazni oblici (M1/M2 na slici B u pokusu) konstantno prisutni u različitim regijama, te je predominacija pojedinog tipa ono što prebacuje ravnotežu reakcije između proupalnog i protuupalnog odgovora.<sup>10</sup> Poremećaji ove ravnoteže, koji se često očituju u smislu neučinkovite, perzistirajuće upale, vode SŽS u različita neurodegenerativna oboljenja<sup>35</sup> i psihijatrijske bolesti<sup>1</sup> te je lako pretpostaviti da su u pozadini i mnogih drugih bolesti i patofizioloških mehanizama u mozgu, gledamo li njihove funkcije, koje su svakim danom sve opširnije definirane.

Ako se osvrnemo na ranije navedene metaboličke obrasce koji se razlikuju kod M1 i M2 stanja vidimo da faktori koji se luče kod M1 fenotipa, poput TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-12 imaju ulogu u poticanju metaboliziranja glukoze. IL-1 $\beta$  povećava ekspresiju GLUT1 transportera, čime se povećava doprema glukoze prema astrocitima, kao i posljedično laktata koji neuroni koriste

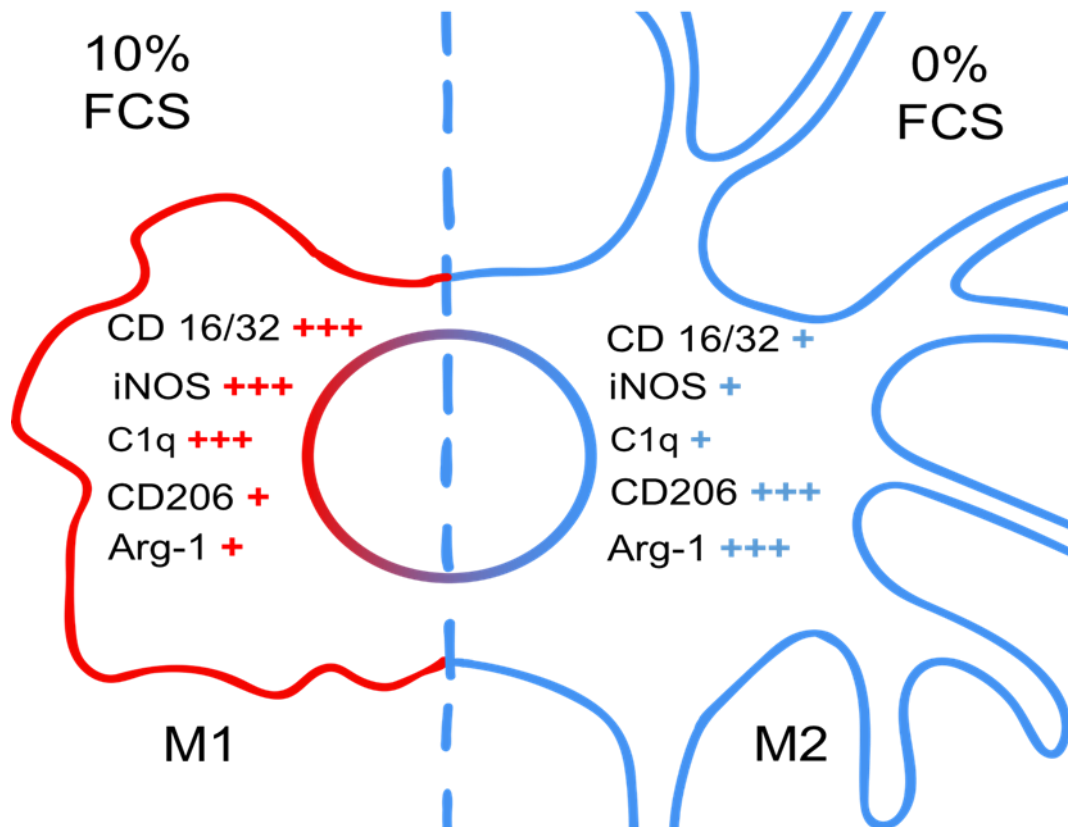
za sintezu ATP-a.<sup>19</sup> Utvrđeno je da je laktat izoliran u likvoru većinom proizveden u mozgu i da se ne podudara s razinama u serumu te može poslužiti kao vrijedan marker metaboličkih disfunkcija u središnjem živčanom sustavu.<sup>38</sup> Pretpostavlja se da ovdje veliku ulogu igra astrocitni-neuronalni laktatni shuttle (ANLS), gdje se preko monokarboksilatnih transportera (MCT) laktat iz astrocita prenosi u neurone.<sup>39</sup> S druge strane, M2 fenotip i njegovi markeri imaju funkciju u inhibiciji IL-1 $\beta$ . Adenozin monofosfat aktivirana protein kinaza (AMPK) potiče prijelaz u M2 fenotip te pojačano lučenje IL-10 koji inhibira lučenje IL-1 $\beta$  i ostalih upalnih citokina M1 fenotipa.<sup>23 24</sup> Time se smanjuje ekspresija GLUT1 transportera, kao i prijenos glukoze u astrocite, i posljedično razine laktata u mozgu. Postoje istraživanja koje vezuju razine laktata u mozgu s neurodegenerativnom progresijom. U izolatima cerebrospinalnog likvora kod pacijenata s multiplom sklerozom pronađene su više razine laktata nego u kontrolnoj skupini. Pretpostavlja se da problem leži u mitohondrijalnoj disfunkciji zbog blokade oksidativne fosforilacije. Perzistirajuća upala i neurodegeneracija dva su procesa koji se isprepliću u ovom slučaju, a ne bi čudilo da mikroglija stanice sudjeluju u ovom metaboličkom *shiftu*, budući da same ponekad podliježu Warburg efektu, gdje se preferira aerobnu glikolizu.<sup>7</sup>

38

Zanimljive su implikacije o sudjelovanju mikroglija stanica u metabolizmu laktata i u hipotetskom astrocitnom-neurološkom shuttleu (ANS) koji se sve više nudi kao poželjniji energetski put za neurone u stanjima pojačane energetske potrebe.<sup>39</sup> U jednom istraživanju provedenom na djeci oboljeloj od tuberkuloznog meningitisa u Južnoj Africi, povišene razine laktata, što je česti popratni čimbenik infektivnih stanja, povezala se s višom ekspresijom M1 mikroglija stanica. Izmjerene razine laktata objašnjene su povećanim energetskim potrebama neurona, gdje i mikroglija stanice na kraju uskaču uz astrocite i formiraju kompleksan cirkularni sustav razmjene laktata usmjeren poglavito prema preživljenju neurona.<sup>30</sup>

Fetuin, koji se u našem pokusu pokazao kao značajan aktivator M1-fenotipa, na razini organizma impliciran je u različite metaboličke poremećaje kod pretilih ljudi, uključujući poremećenu glikemičnu kontrolu putem smanjene osjetljivosti na inzulin, pojačanu aktivaciju makrofaga, disfunkciju adipocita i fibrozu jetre<sup>40</sup> te uz ranije navedeni IL-1 $\beta$ <sup>41</sup> zasigurno precipitira razvoj dijabetesa tip 2. Postoji mogućnost da kod pretilih ljudi fetuin precipitira perzistiranje M1-fenotipa, koji održavajući upalno stanje u CNS-u, uzrokuje ubrzano kognitivno propadanje i raniji nastup demencije.<sup>42</sup> To nije teško za povjerovati budući da je uloga mikroglija stanica putem perzistirajuće upale i aktivacije M1-stanica već utvrđena u različitim neurodegenerativnim poremećajima.<sup>11</sup> Propadanje kognitivnih funkcija vidi se i kod kronične infekcije citomegalovirusom<sup>43</sup>, za kojeg smo u ranijim pokusima i sami utvrdili da potiče M1 polarizaciju kao i fetuin.

Korišteni markeri u pokusu i sami su nekad krivci za metaboličke oscilacije i disfunkcije u središnjem živčanom sustavu pa tako iNOS (Slika 5.) već ima utvrđenu vezu s kognitivnom disfunkcijom, koja se pokazala u slučajevima rekurentnog depresivnog poremećaja, gdje stradaju memorija, sposobnost učenja i prag pažnje.<sup>44</sup> ROS (radikalni kisikovi radikali), koji se u mikroglija stanica starije populacije štakora pokazao kao češće lučen metabolit nego iNOS, potiče upalu SŽS-a aktiviranjem NF $\kappa$ B puta i poticanjem proizvodnje IL-1 $\beta$ .<sup>45</sup> Vidimo da je u svim ovim slučajevima zastupljena predominacija M1 fenotipa i neodgovarajući prijelaz u M2 fenotip.



**Slika 9. Izraženi markeri BV-2 mikroglija stanica kod različitih koncentracija FCS-a.** Markeri specifični za M1 fenotip, C16/32, iNOS i C1q-1, najjači izražaj pokazuju na stanicama koje su kultivirane 96 sati u mediju s 10% FCS-om, koje pokazuju ameboidnu morfologiju očekivanu od M1 fenotipa. M2-specifični markeri, CD206 i Arg-1, najjači izražaj pokazuju na stanicama koje su kultivirane bez FCS-a kroz 96 sati, te pokazuju M2-specifičnu razgranatu formu

## Zaključak

Fetuin iz FCS-a (od engl. Fetal Calf Serum), pokazao se kao značajan aktivator proupalne, ameboidne M1 forme, te smo uklanjanjem istog iz jednadžbe uspjeli postići azgranatu, mirujuću M2 formu mikroglia stanica. Metabolički profil BV-2 mikroglia stanica razlikuje se znatno kod M1 i M2 aktivacijskog stanja, što vidimo i po samim markerima koji su bili izraženi u pokusu, a za koje je pokazano da imaju utjecaj na metabolizam mikroglia stanica, ali i cjelokupnog SŽS-a. M1 – fenotip preferira mehanizam aerobne glikolize, vezuje se uz povišene razine laktata u mozgu, i utječe putem lučenih citokina, poput IL-1 $\beta$ , na ekspresiju GLUT1 transportera zaslužnih za promet glukoze kroz krvno-moždanu barijeru. M2 – fenotip preferira mehanizam oksidativne fosforilacije, te preko adenzin-monofosfat aktivirane protein kinaze (AMPK) potiče lučenje interleukina-10 koji inhibira interleukin-1 $\beta$ , prelazak u M1 oblik mikroglia stanica te posljedično snižava razine glukoze i laktata u SŽS-u.

Eksperimentalni pristup ove vrste značajan je jer nam omogućuje pornije ispitivanje ravnoteže između ova dva stanja, kao i faktora koji pomiču tu ravnotežu na proupalnu (M1) ili mirujuću (M2) stranu. Otkrivanjem faktora pogodnijih za M2 aktivaciju mikroglia, smatramo da možemo u kliničkoj praksi s vremenom razviti nove terapijske modele za stanja gdje je kronična upala SŽS-a uvjetovana nesvršishodnom, prolongiranom aktivacijom M1 mikroglia stanja, što vodi između ostalog i do metaboličkog stresa u pozadini neurodegenerativnih bolesti i ozljeda središnjeg živčanog sustava

Daljnijim ispitavanjem metaboličkih razlika među ova dva fenotipa i njihovih preferenci prema različitim citokinima i metaboličkim stanjima može se utjecati na čitavu paletu disfunkcija središnjeg živčanog sustava koji su posljedica metaboličkog disbalansa zbog nesvršishodne, perzistirajuće upale predvođene M1 mikroglia stanicama.



## Sažetak

Mikroglia stanice predstavnice su prirođenog imunološkog sustava u središnjem živčanom sustavu (SŽS). Funkcija mikroglia stanica usko je vezana uz njihovu morfološku prezentaciju, a ona dalje o uvjetima, faktorima i medijatorima kojima su mikroglia stanice izložene. Tako su utvrđena dva osnovna fenotipa, M1 i M2, kao i prijelazni, M1/M2 miješani oblik. M1 oblik metabolički se vezuje uz proces aerobne glikolize i pojačane produkcije laktata, dok se M2, razgranati fenotip vezuje uz oksidativnu fosforilaciju i smirivanje upale.

Cilj rada bio je otkriti ukoliko fetuin, aktivni sastojak u FCS-u, utječe na stanje polarizacije (M1/M2) i posljedične promjene fenotipskih i metaboličkih obilježja BV-2 stanica in-vitro.

Kulture uzgajane bez FCS-a kroz 96 sati pokazale su morfološka i funkcijska obilježja M2 mirujuće, razgranate mikroglie, uključujući i pojačanu ekspresiju M2-specifičnih imunoflorescentnih markera (CD206).

Otkrivanjem faktora koji pomiču M1/M2 ravnotežu u središnjem živčanom sustavu u korist M2 fenotipa, otvaraju se nova vrata za terapiju stanja koja u svojoj podlozi imaju metabolički stres (kisikovi radikali, iNOS, laktati) uzrokovan kroničnom upalom SŽS-a (neurodegenerativne bolesti, psihijatrijski poremećaji i bolni sindromi, dijabetes tipa 2).

Ključne riječi : mikroglia, fetuin, imunološki sustav, metabolizam

## Summary

Microglia cells are the resident innate immune cells in the central nervous system (CNS). The function of microglia cells is tightly linked with their morphological presentation, which is in itself influenced by the conditions, factors and mediators to which microglia cells are exposed. It is in this manner we identify two basic phenotypes, M1 and M2, as well as a transitional, M1/M2 mixed form. The M1 phenotype is usually metabolically linked to the process of aerobic glycolysis and the increased production of lactates, while the M2 ramified phenotype is usually metabolically linked to the process of oxidative phosphorylation and the calming of inflammation.

The goal of this research was to discover whether fetuin, an active ingredient in FCS, influenced the polarization state (M1/M2) with phenotype and metabolic changes of BV-2 cells that followed in-vitro.

Cultures grown without FCS, through a period of 96 hours, demonstrated morphological and functional characteristics of resting M2, ramified microglia cells, including an increase in expression of M2-specific immunofluorescence markers (CD206).

By identifying the factor that shifts the M1/M2 balance in the central nervous system towards the M2 phenotype, doors are opened into new therapeutic options for conditions that have metabolic stress at its base (oxygen radicals, iNOS, lactate), caused by chronic neuroinflammation (neurodegenerative diseases, psychiatric disorders, chronic pain syndromes and diabetes type II).

Keywords : microglia, fetuin, immune system, metabolism

## Literatura

1. Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M. & Verkhratsky, A. Physiology of Microglia. *Physiol. Rev.* **91**, 461–553 (2011).
2. Saijo, K. & Glass, C. K. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 775–787 (2011).
3. microglia | biology | Britannica.com. Available at: <https://www.britannica.com/science/microglia#ref1089740>. (Accessed: 14th May 2017)
4. Harry, G. J. Microglia during development and aging. *Pharmacol. Ther.* **139**, 313–326 (2013).
5. Kettenmann, H., Kirchhoff, F. & Verkhratsky, A. Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron* **77**, 10–18 (2013).
6. Fricker, M. *et al.* MFG-E8 mediates primary phagocytosis of viable neurons during neuroinflammation. *J. Neurosci.* **32**, 2657–66 (2012).
7. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science (80-. ).* **324**, 1029–1033 (2009).
8. Dziegielewska, K. M., Andersen, N. A. & Saunders, N. R. Modification of macrophage response to lipopolysaccharide by fetuin. *Immunol. Lett.* **60**, 31–5 (1998).
9. Chen, G. Y. & Nuñez, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 826–837 (2010).

10. Orihuela, R., McPherson, C. A. & Harry, G. J. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br. J. Pharmacol.* **173**, 649–665 (2016).
11. Cherry, J. D., Olschowka, J. A. & O'Banion, M. K. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J. Neuroinflammation* **11**, 98 (2014).
12. Henn, A. *et al.* The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX* **26**, 83–94 (2009).
13. Gordon, S. & Taylor, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 953–964 (2005).
14. MacMicking, J., Xie, Q. & Nathan, C. NITRIC OXIDE AND MACROPHAGE FUNCTION. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 323–350 (1997).
15. Gimeno-Bayón, J., López-López, A., Rodríguez, M. J. & Mahy, N. Glucose pathways adaptation supports acquisition of activated microglia phenotype. *J. Neurosci. Res.* **92**, 723–731 (2014).
16. Wynn, T. A., Chawla, A. & Pollard, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* **496**, 445–55 (2013).
17. Martinez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* **6**, 13 (2014).
18. Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J. & Hill, A. M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol.* **164**, 6166–73 (2000).
19. Jurcovicova, J. Glucose transport in brain - effect of inflammation. *Endocr. Regul.* **48**,

- 35–48 (2014).
20. Mueckler, M. & Thorens, B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol. Aspects Med.* **34**, 121–38 (2013).
  21. Dashty, M. A quick look at biochemistry: Carbohydrate metabolism. *Clin. Biochem.* **46**, 1339–1352 (2013).
  22. Hardie, D. G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 774–785 (2007).
  23. MURRAY, P. Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Curr. Opin. Pharmacol.* **6**, 379–386 (2006).
  24. Sag, D., Carling, D., Stout, R. D. & Suttles, J. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. *J. Immunol.* **181**, 8633–41 (2008).
  25. Chen, S. & Sang, N. Hypoxia-Inducible Factor-1: A Critical Player in the Survival Strategy of Stressed Cells. *J. Cell. Biochem.* **117**, 267–78 (2016).
  26. Zhang, H. *et al.* Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* **283**, 10892–903 (2008).
  27. Sakwe, A. M., Koumangoye, R., Goodwin, S. J. & Ochieng, J. Fetuin-A ( $\alpha$ 2HS-glycoprotein) is a major serum adhesive protein that mediates growth signaling in breast tumor cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 41827–35 (2010).
  28. Smith, E. R., Nilforooshan, R., Weaving, G. & Tabet, N. Plasma Fetuin-A is Associated with the Severity of Cognitive Impairment in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. *J.*

- Alzheimer's Dis.* **24**, 327–333 (2011).
29. Harris, V. K. *et al.* Fetuin-A deficiency protects mice from Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) and correlates with altered innate immune response. *PLoS One* **12**, e0175575 (2017).
  30. Mason, S. *et al.* A hypothetical astrocyte-microglia lactate shuttle derived from a (1)H NMR metabolomics analysis of cerebrospinal fluid from a cohort of South African children with tuberculous meningitis. *Metabolomics* **11**, 822–837 (2015).
  31. Patrizio, M., Riitano, D., Costa, T. & Levi, G. Selective enhancement by serum factors of cyclic AMP accumulation in rat microglial cultures. *Neurochem. Int.* **29**, 89–96 (1996).
  32. Fetuin from fetal calf serum.
  33. de Andres, B. *et al.* A regulatory role for Fc gamma receptors (CD16 and CD32) in hematopoiesis. *Immunol. Lett.* **68**, 109–13 (1999).
  34. Saha, R. N. & Pahan, K. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 929–47 (2006).
  35. Silverman, S. M. *et al.* C1q propagates microglial activation and neurodegeneration in the visual axis following retinal ischemia/reperfusion injury. *Mol. Neurodegener.* **11**, 24 (2016).
  36. Marzolo, M. P., von Bernhardi, R. & Inestrosa, N. C. Mannose receptor is present in a functional state in rat microglial cells. *J. Neurosci. Res.* **58**, 387–95 (1999).
  37. Giulian, D. & Baker, T. J. Characterization of ameboid microglia isolated from

- developing mammalian brain. *J. Neurosci.* **6**, 2163–78 (1986).
38. Vawter, M. P. *et al.* Mitochondrial related gene expression changes are sensitive to agonal-pH state. *Mol. Psychiatry* **11**, 615–615 (2006).
  39. Genc, S., Kurnaz, I. a & Ozilgen, M. Astrocyte - neuron lactate shuttle may boost more ATP supply to the neuron under hypoxic conditions - in silico study supported by in vitro expression data. *BMC Syst. Biol.* **5**, 162 (2011).
  40. Trepanowski, J. F., Mey, J. & Varady, K. A. Fetuin-A: a novel link between obesity and related complications. *Int. J. Obes.* **39**, 734–741 (2015).
  41. Dinarello, C. A., Donath, M. Y. & Mandrup-Poulsen, T. Role of IL-1 $\beta$  in type 2 diabetes. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **17**, 1 (2010).
  42. Saedi, E., Gheini, M. R., Faiz, F. & Arami, M. A. Diabetes mellitus and cognitive impairments. *World J. Diabetes* **7**, 412–22 (2016).
  43. Dickerson, F. *et al.* Association between cytomegalovirus antibody levels and cognitive functioning in non-elderly adults. *PLoS One* **9**, e95510 (2014).
  44. Alexopoulos, G. S. & Morimoto, S. S. The inflammation hypothesis in geriatric depression. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* n/a-n/a (2011). doi:10.1002/gps.2672
  45. von Bernhardi, R., Eugenín-von Bernhardi, L. & Eugenín, J. Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Front. Aging Neurosci.* **7**, 124 (2015).

## Životopis

Eliša Papić rođen je 17.01.1992 godine u Beogradu. U Puli je završio Osnovnu školu Veruda te Gimnaziju Pula, gdje je bio i učenik generacije. Upisao je Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci 2011. godine. Tijekom studija bio je demonstrator na Zavodu za fiziologiju i imunologiju te Zavodu za biologiju.

Od listopada 2014. godine obnašao je dužnosti lokalnog dužnosnika za ljudska prava i mir u Međunarodnoj udruzi studenata medicine (CroMSIC), a od 2016. godine i dužnost nacionalnog dužnosnika za ljudska prava i mir. U sklopu svog rada vodio je organizacijski odbor 3. studentskog simpozija i 1. studentskog kongresa :“Studenti za ljudska prava“ 2015. i 2016. godine koji su održani na Medicinskom fakultetu u Rijeci, dok je 2017. godine nadzirao organizaciju sličnih simpozija na razini Hrvatske, u Zagrebu, Splitu, Osijeku i Rijeci.

Organizator je i nekolicine humanitarnih koncerata, u Pallachu i RiverPubu u Rijeci, u suradnji sa Udrugom Hepatos Rijeka

2016./2017. akademske godine sudjelovao je na Znanstvenom pikniku gdje odnosi nagradu za najbolji rad, a kasnije iste akademske godine i na NeuRI-ju gdje je dobitnik nagrade za najbolje izlaganje.

Aktivno se bavi glazbom, te sklada i nastupa pod imenom Elisha, te je autor romana „6 žica i stetoskop“ koji je izdan 2017. godine pod Nakladom Bošković u Splitu.