

**DODATAK 3 OPISNOM IZVJEŠTAJU ZA PRVU GODINU
PROJEKTA 9.01/232**

**"ANALIZA NELINEARNIH KOMPONENATA S
PRIMJENAMA U KEMOMETRIJI I PATOLOGIJI"**

Dr. sc. Marijana Popović-Hadžija

Dr. sc. Mirko Hadžija

Dr. sc. Gorana Aralica

8. 11. 2013.

SADRŽAJ

3.1. Prikupljanje uzoraka humane jetre i izrada histopatoloških preparata

3.2. Uspostavljanje mišjeg modela masne jetre te izrada histoloških preparata

3.2.1 Eksperimentalne grupe i tretman miševa soja CBA

3.2.2. Eksperimentalne grupe i tretman miševa soja NOD

Popis slika:

Slika 1a. Zbirka uzoraka humane jetre: parafinske kocke s uklopljenim tkivom,

Slika 1b. Zbirka uzoraka humane jetre: mape histopatoloških rezova tkiva.

Slika 2a. Tkivo humane jetre obojeno hemalaun eozinom.

Slika 2b. Tkivo humane jetre obojeno korištenjem anti-CD34 antitijela koje se veže na endotelne stanice krvnih žila.

Slika 3a. Uzorak humane jetre s masnom degeneracijom obojan H&E. Povećanje 200x.

Slika 3b. Uzorak humane jetre s masnom degeneracijom: deparafinizirani histološki rez tkiva istog uzorka slikan u vidljivom dijelu spektra, prije primjene matematičkih algoritama za nenadziranu analizu slike. Povećanje 200x.

Slika 4. Miševi soja CBA hranjeni visoko-kaloričnom hranom.

Slika 5. Miš soja CBA hranjen visoko-kaloričnom hranom prije ekspiracije organa.

Slika 6. Mast u vakuolama stanica jetre miša soja CBA bojana bojom Sudan 3.

Slika 7a. Tkivo jetre miša soja CBA obojano s H&E.

Slika 7b. Tkivo jetre miša soja CBA obojano s bojom Sudan 3.

Slika 7c. Tkivo jetre miša soja CBA: neobojani krio-rez koji je poslužio za testiranje primjene algoritama nenadzirane dekompozicije slike.

Slika 8. Miševi soja NOD.

Slika 9. Miš soja NOD hranjen visoko-kaloričnom hranom prije ekstirpacije organa.

3.1. Prikupljanje uzoraka humane jetre i izrada histopatoloških preparata

Po odobrenju ovog Projekta pa do podnošenja izvještaja prikupljeno je 26 uzoraka humane jetre dobivenih iz Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju, Kliničke bolnice Dubrava. Uzorci su raspoređeni u tri glavne dijagnostičke grupe:

1. metabolički sindrom (N=8)

2. masna jetra (N=7)

3. pretilost (N=8)

(Uz uzorke ovih grupa, u oformljenoj zbirci uzoraka imamo 1 uzorak masne jetre s metastazama i 2 uzorka masne jetre poslije kemoterapije).

Svi uzorci popraćeni su s relevantnim kliničkim podacima. Kriteriji za određivanje metaboličkog sindroma usklađeni su s preporukama nekoliko asocijacija (*International Diabetes Federation, National Heart, Lung and Blood Institute, American Heart Association, World Heart Federation, International Atherosclerosis Society, International Association for the Study of Obesity*) a detaljno su opisani u radu Alberti i suradnici, *Circulation* 2009, 120; 1640-1645.

Uzorci humane jetre uklopljene u parafin su rezani na kriotomu (debljina reza 5 μm), a rezovi tkiva složeni su na obično mikroskopsko staklo ili silanizirano staklo. Parafinske kocke tkiva humane jetre, histološki rezovi tkiva kao i klinički podaci su pohranjeni u Laboratoriju za molekularnu endokrinologiju i transplantaciju (LMET) IRB-a, i čine zbirku uzoraka humane jetre potrebite za provođenje ovog projekta (Slike 1a i 1b).

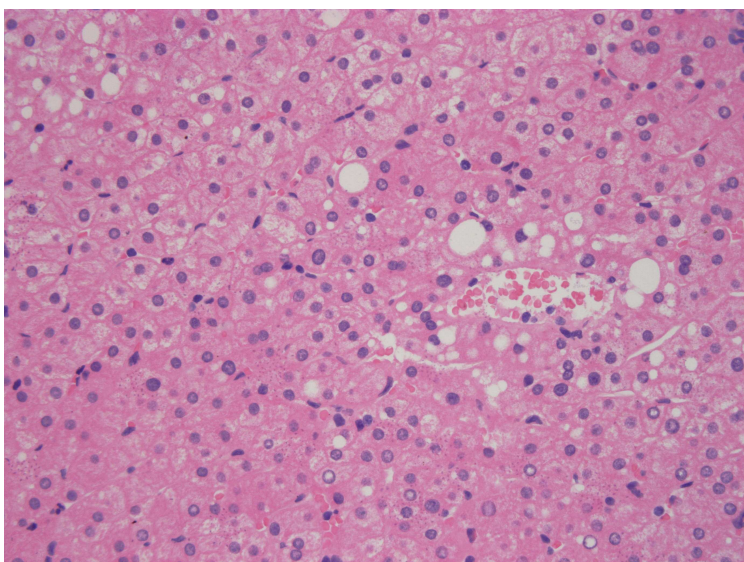


Slika 1a. Zbirka uzoraka humane jetre: parafinske kocke s uklopljenim tkivom,

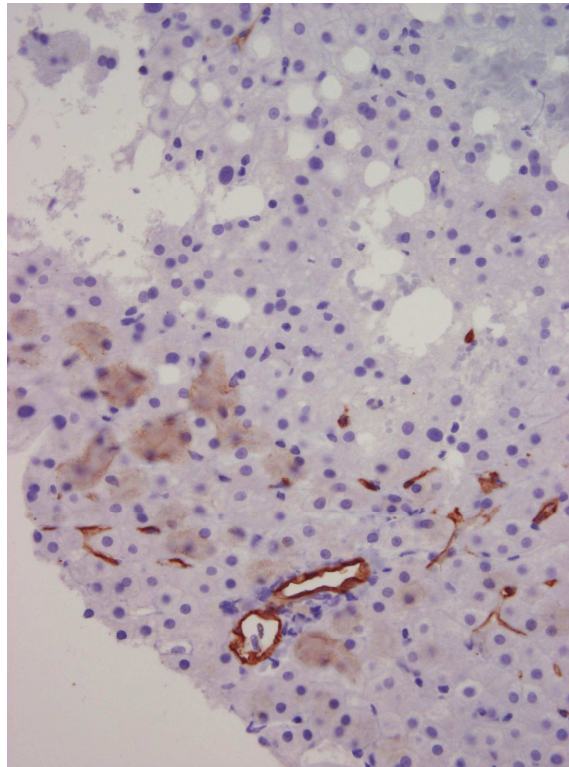


Slika 1b. Zbirka uzoraka humane jetre: mape histopatoloških rezova tkiva.

Tkivo jetre nakon rezanja i slaganja na mikroskopsko stakalce je bojano bojom hemalaun/eozin (H&E) (Slika 2a). Budući unutar histološkog reza jetre postoje različite tkivne strukture (parenhim, masne vakuole, krvne žile, retikulin) koje treba moći razlikovati matematičkim alogiritmima, bilo je nužno posjedovati i pozitivnu kontrolu. Stoga je na histološkom rezu jetre bojan transmembranski glikoprotein koji se nalazi na endotelnim stanicama krvnih žila. U tu svrhu je korišteno antitijelo CD-34 (Dakko, SAD) a za vizualizaciju pozitivnih stanica korištena metoda peroksidaza –anti peroksidaza (Slika 2b).



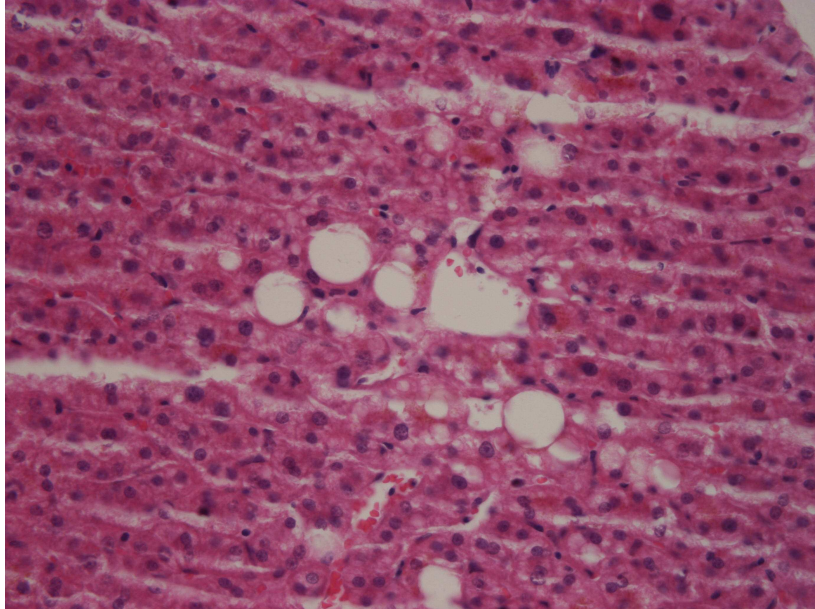
Slika 2a. Tkivo humane jetre obojeno hemalaun eozinom.



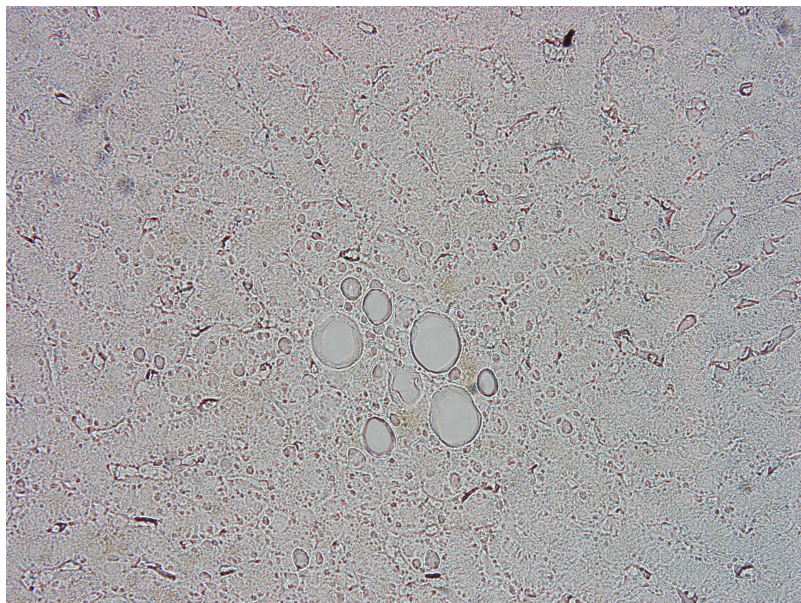
Slika 2b. Tkivo humane jetre obojeno korištenjem anti-CD34 antitijela koje se veže na endotelne stanice krvnih žila.

Budući se u slučaju uzoraka humane jetre radi o uzorcima tkiva uklopljenih u parafin, čija prethodna obrada uključuje inkubaciju tkiva u seriji različitih koncentracija alkohola, nakupljena mast u vakuolama se otopila. Zbog toga se ovi uzorci ne mogu bojati bojom Sudan 3 (ovom bojom se boje masti koje ostaju u vakuolama nakon rezanja tkiva na kriostatu). Stoga ovi parafinski uzorci predstavljaju novi izazov za primjenu algoritama slijepog razdvajanja signala na uzorcima čije se strukture minimalno razlikuju po gustoći. Do podnošenja ovog izvještaja, od prikupljenih uzoraka humane jetre testiranje primjenjivosti algoritama za nenadziranu analizu slike humane jetre, provedeno je na samo jednom uzorku iz svake (od tri) dijagnostičke skupine. Ti uzorci različitih dijagnostičkih skupina su poslužili za parametrizaciju matematičkih algoritama u svrhu smanjenog rizika od neuspjeha, dobivanja najboljih rezultata i podnošenja patentne prijave. U tu svrhu rezovi humane jetre su deparafinizirani (u toluenu, seriji različitih koncentracija etilnog alkohola i citratnom puferu) i slikani na mikroskopu (Olympus BX51) u vidljivom dijelu spektra, uz maksimalno mogući kontrast (dobiven namještanjem objektiva) i uz povećanje 200x i 400x. Pod istim uvjetima je

slikan (bez bilo kakve prethodne obrade) rez tkiva istog uzorka obojan H&E na kojem se vidi struktura tkiva, slike 3a i 3b.



Slika 3a. Uzorak humane jetre s masnom degeneracijom obojan H&E. Povećanje 200x.



Slika 3b. Uzorak humane jetre s masnom degeneracijom: deparafinizirani histološki rez tkiva istog uzorka slikan u vidljivom dijelu spektra, prije primjene matematičkih algoritama za nenadziranu analizu slike. Povećanje 200x.

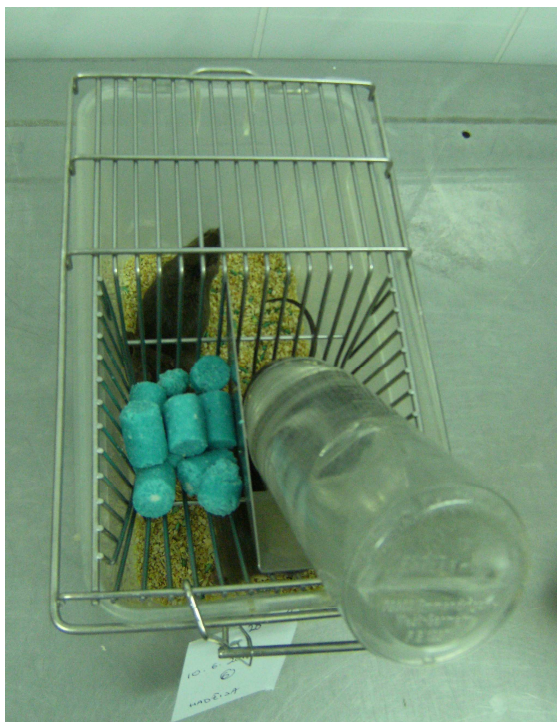
U drugoj i trećoj godini projekta će se, prema prije definiranim parametrima, analizirati i preostale prikupljene uzorke. Osim toga, cilj nam je ovu analizu proširiti i na uzorke humane jetre s metastazama ili primarnim tumorima, što primjenu algoritama nelinearnog slijepog razdvajanja signala čini klinički relevantnijim.

3.2. Uspostavljanje mišjeg modela masne jetre te izrada histoloških preparata

3.2.1 Eksperimentalne grupe i tretman miševa soja CBA

Miševi soja CBA/H, muškog spola, uzgojeni su u Pogonu laboratorijskih životinja (PLŽ) Instituta Ruđera Boškovića (IRB-a). Nakon odvajanja od majke (oko 20-tog dana starosti) iz uzgojnog dijela prebačeni su u eksperimentalni dio PLŽ-a. Nakon perioda privikavanja (aklimatizacije) u trajanju od tjedan dana, životinje su izvagane i određena im je koncentracija glukoze u krvi (radi potvrde normoglikemičnog stanja). Životinje su tada nasumično raspoređene u dvije grupe:

1. one koje će biti hranjene standardnom hranom (25,8% proteina, 62,8% ugljikohidrata, 11,4% masti; 12.6 kJ/g; Mucedola, Italija) (N=7)
2. one koje će biti hranjene visokokaloričnom hranom (58% masti, 16,4% proteina, 25,6% ugljikohidrata; 23 kJ/g; Mucedola, Italija) (N=15) (Slika 4).



Slika 4. Miševi soja CBA hranjeni visoko-kaloričnom hranom.

Tretman i briga o životinjama za cijelo vrijeme trajanja pokusa provedena je sukladno propisima koji su određeni Zakonom o zaštiti životinja i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u pokusne i druge znanstvene svrhe (brojevi licenci osoba koje su radile sa životinjama: 5.2-13, HR 191/02/P, 17.3-13, HR 191/02/P, 69.3-13, HR 191/02/P).

Sve životinje su tijekom pokusa boravile u prostoriji sa standardnim uvjetima: prosječna temperatura iznosila je 21⁰C, a prosječna vlažnost zraka bila je 55%. Životinje su imale slobodan pristup hrani i vodi. Stelja u kavezima (Scobis-Uno, Italija) je mijenjana obavezno jednom tjedno ili po potrebi češće.

Životinje su hranjene tijekom 19-20 tjedana i svaki tjedan je mjeren prirast tjelesne mase. Također je postojanje glikozurije (prisutnost šećera u urinu) testirano Keto-Diabur-test 5000 trakicama (Roche, Njemačka).

Nakon 10-tog tjedna tretmana, po četiri miša iz svake skupine (obzirom na vrstu hrane) boravili su u metaboličkom kavezu tijekom 24 sata kako bi se dobio uvid u osnovne razlike u parametrima metabolizma među životinjama dviju eksperimentalnih grupa. Životinje obje skupine su sukcesivno ulazile u završnu fazu pokusa. Naime, nakon anestezije i analgezije

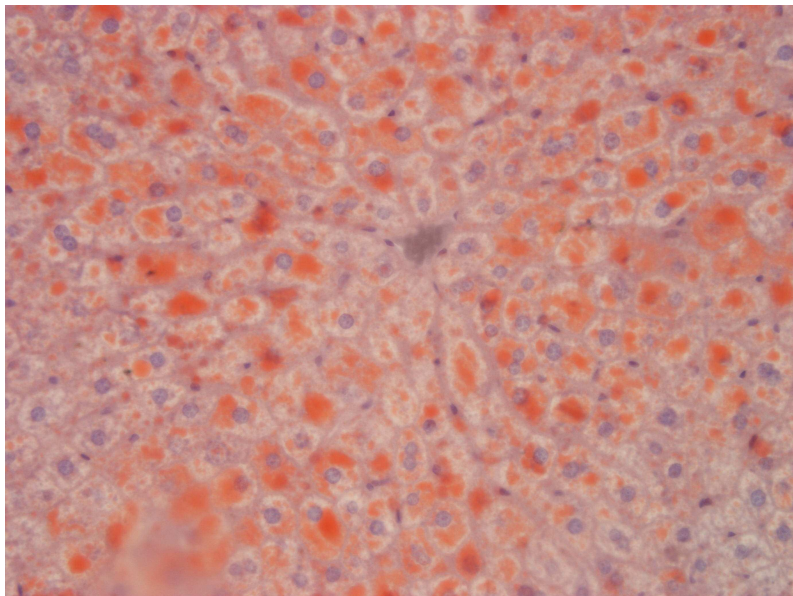
životinje, izdvojena je krv za dobivanje seruma. Iz abdominalne šupljine su izvađeni organi od interesa (jetra, bubreg, tanko crijevo, slezena, gušterača, masno tkivo) (Slika 5) i pohranjeni na odgovarajući način (u tekući dušik za molekularnu analizu, na temperaturu -20⁰C i/ili u fiksativ Bouin pa potom u 30%-tnu sukrozu za histološku analizu). Svi navedeni organi su nam bili od interesa jer je poznato da pretilost (uzrokovana visokokaloričnom hranom) dovodi do prekomjernog nakupljanja masti u stanicama jetre, što potom inducira razvoj metaboličkog sindroma to jest, razvoj šećerne bolesti tipa 2. Tim procesom su zahvaćeni osim organa koji sudjeluju u metabolizmu proteina, ugljikohidrata i masti i organi uključeni u inflamatorni proces.



Slika 5. Miš soja CBA hranjen visoko-kaloričnom hranom prije ekspiracije organa.

Uzorci organa su dodatno obrađeni (uklapanje u parafin ili OCT medij) u Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, što je ovisilo o vrsti rezanja: mikrotom (5 μ m) ili kriostat (10 μ m), te rezovi tkiva lijepljeni na obična ili na silanizirana mikroskopska stakla. Uzorci tkiva uklopljeni u parafin su bojani hemalaun/eozinom (H&E). U

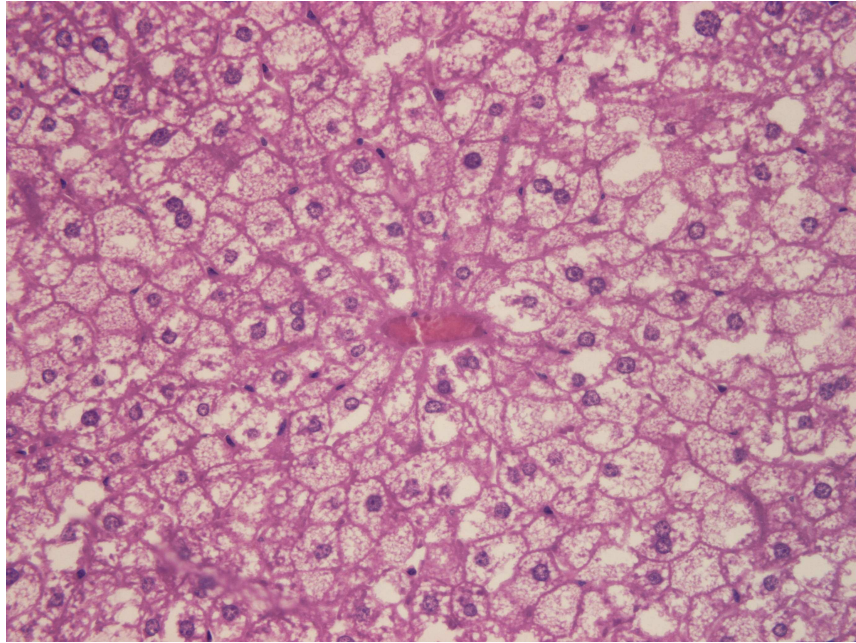
slučaju animalnog modela smo nakon ekstirpacije organa mogli odmah pristupiti rezanju tkiva na kriostatu bez bilo kakve prethodne obrade tkiva s alkoholom. To nam je omogućilo bojanje masti (pozitivna kontrola) u vakuolama unutar stanica jetrenog parenhima bojom Sudan 3 (Merck, Njemačka), slika 6.



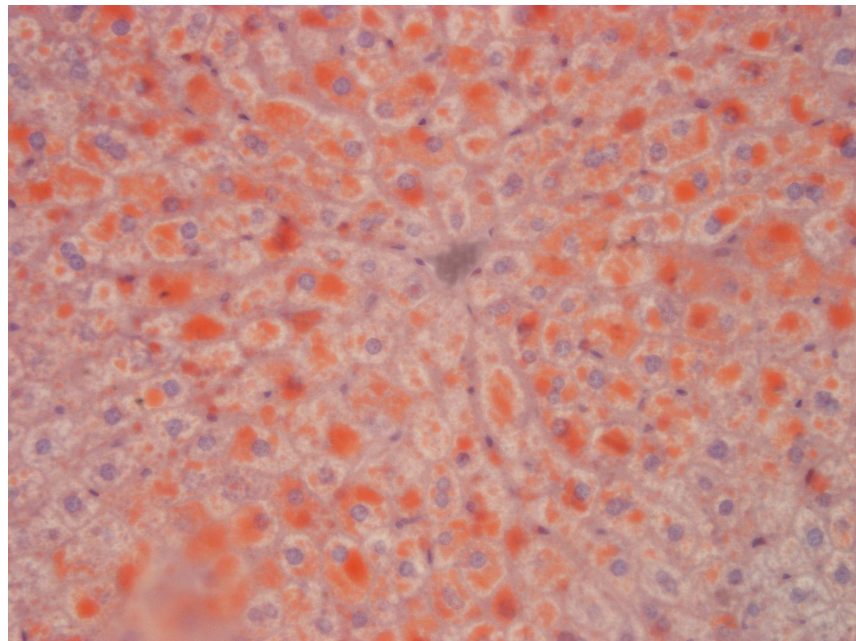
Slika 6. Mast u vakuolama stanica jetre miša soja CBA bojana bojom Sudan 3.

Uzorci su sukcesivno obrađivani na opisani način te potom pregledani i slikani na mikroskopu (Olympus, BX 51). Tri reza istog tkiva (jedan obojan s H&E, drugi s bojom Sudan 3, i treći neobojani krio-rez) su slikani uz filter u vidljivom dijelu spektra, uz maksimalno mogući kontrast (dobiven namještanjem objektiva) i uz povećanje 200x i 400x (Slike 7a, 7b i 7c). Na dobivenim slikama je nadalje testirana primjenjivost algoritama za nenadziranu analizu slike. (Ovaj dio radne aktivnosti je na nekim uzorcima napravljen već tijekom prve godine Projekta iako je radnim planom ova analiza predviđena u drugoj i trećoj godini). Slike, kao rezultat primjene algoritama na nebojane krio-rezove, su analizirali članovi stručnog tima ovog projekta.

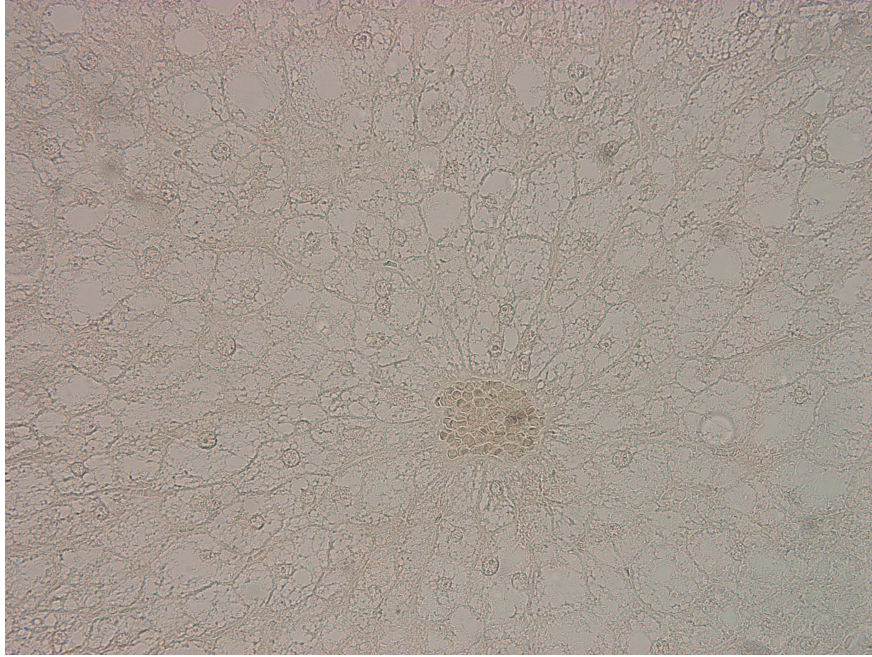
Do podnošenja ovog izvještaja svi miševi soja CBA nisu u potpunosti obrađeni. Obrada nekih uzoraka je u tijeku a neki će biti obrađeni u narednom razdoblju.



Slika 7a. Tkivo jetre miša soja CBA obojano s H&E.



Slika 7b. Tkivo jetre miša soja CBA obojano s bojom Sudan 3.



Slika 7c. Tkivo jetre miša soja CBA: nebojani krio-rez koji je poslužio za testiranje primjene algoritama nenadzirane dekompozicije slike.

3.2.2. Eksperimentalne grupe i tretman miševa soja NOD

U izradi Projekta koristili smo i miševе soja NOD/ShiLtJ (eng. *non-obese diabetic*), slika 8. Miševi ovog soja (posebice ženke) specifični su po tome što spontano razvijaju dijabetes tipa 1. Ovaj model je znanstveno priznati model za istraživanje dijabetesa tipa 1 jer po karakteristikama bolesti odgovara onom u ljudima.



Slika 8. Miševi soja NOD.

Tri para NOD miševa kupljeni su od The Jackson Laboratory, SAD. Nakon obavezne karantene u trajanju od 7 dana, životinje su premještene u uzgojnu animalnu jedinicu PLŽ-a, u nešto specifičnije uvjete koji trebaju biti ispunjeni za ovaj soj. Naime, optimalna temperatura za održavanje ovog soja je nešto viša od uobičajene i iznosi do 26 do 28⁰C. Vlažnost zraka kretala se od 50% do 70%, a izmjena dana i noći nakon perioda od 12 sati. Životinje su imale slobodan pristup hrani (standardnoj, Mucedola, Italija) i vodi. Miševi su pažljivo održavani i razmnožavani prema definiranim pravilima (shema stabla postavljanja parova i njihovog razmnožavanja pohranjena je u uzgojnoj animalnoj jedinici PLŽ-a i LMET-a) s ciljem uspostavljanja linije visokosrođenih miševa soja NOD s dovoljnim brojem mladih miševa. Rasplodivi mladi miševi su nakon odvajanja od majke mogli biti uključeni u istraživačke svrhe. Zbog ograničenog broja NOD miševa do sada je u ovaj projekt bilo uključeno manji broj miševa (N=13). Trenutno su NOD miševi u uzgoju, i nakon odvajanja od majke biti će obrađeni na istovjetan način.

Miševi (ženke) raspoložive za tretman su nasumično podijeljeni u dvije grupe obzirom na vrstu hrane kojom su hranjeni:

1. visokokaloričnom hranom (N=9)
2. standardnom hranom (N=4).

Miševi su nakon tretmana obrađeni na istovjetan način koji je prethodno detaljno opisan za miševe soja CBA, slika 9.



Slika 9. Miš soja NOD hranjen visoko-kaloričnom hranom prije ekspiracije organa.

Nadalje, NOD miševi spontano razvijaju šećernu bolest tipa 1 i ta skupina miševa biti će uključena u pokuse s prvim simptomima hiperglikemije. Oni će osim uobičajenog tretmana hranom svakodnevno dobivati inzulin (1U, intramuskularno, Novo Nordisk). Stoga će preostala financijska sredstva u narednom razdoblju biti korištena za razmnožavanje i održavanje miševa soja NOD, selekciju odgovarajućih životinja za eksperiment, tretman životinja tijekom dužeg razdoblja, obradu eksperimentalnog modela (kako onih čiji tretman je u tijeku tako i onih čiji tretman će tek započeti), te kupnju potrebitih materijala/kemikalija za procesuiranje uzoraka.