

# Diferencijacija stanica u primarnoj kulturi neurona

---

Mirić, Mladen

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:061182>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Mladen Mirić

**DIFERENCIJACIJA STANICA U PRIMARNOJ KULTURI NEURONA**

**Diplomski rad**

Zagreb, 2016.

Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju

Predstojnik: prof. dr. sc. Damir Mihelić

Mentorica: Izv. prof. dr. sc. Snježana Kužir

Komentor: dr. sc. Ivan Alić, dr. med. vet.

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Izv. prof. dr. sc. Tajana Trbojević Vukičević
2. Izv. prof. dr. sc. Martina Đuras
3. Izv. prof. dr. sc. Snježana Kužir
4. Doc. dr. sc. Ana Beck (zamjena)

## Zahvala

Zahvaljujem se svojim roditeljima koji su mi omogućili studiranje na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu, svojim prijateljima i kolegama koji su bili uz mene u lijepim, ali i u teškim trenucima, zahvaljujem se svim profesorima, docentima i asistentima koji su mi dali potrebno znanje i vještine za buduću profesiju, zahvaljujem se mentorima, izv. prof. dr. sc. Snježani Kužir te se posebno zahvaljujem dr. sc. Ivanu Aliću, dr. med. vet. bez kojeg ovaj diplomski rad ne bi bio moguć.

## Popis korištenih kratica

CFP (*engl.* cyan fluorescent protein, CFP), zeleno-plava fluorescentna bjelančevina  
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), fluorescentna boja koja boji jezgre  
BrdU (*engl.* 5-Bromo-2'-deoxyuridine), 5-bromo-2'-deoksiuridin  
E17,5 (*engl.* embryonic day), zametak u starosti 17,5 dana  
GFAP (*engl.* glial fibrillary acidic protein), kisela glijalna fibrilarna bjelančevina  
GFP (*engl.* green fluorescent protein), zelena fluorescentna bjelančevina  
MAP2 (*engl.* microtubule-associated protein 2), bjelančevina povezana s mikrotubulima 2  
NeuN (*engl.* neuronal nuclei), jezgre neurona  
PBS (*engl.* phosphate buffered saline), puferirana otopina fosfatnih soli  
PFA (*engl.* paraformaldehyde), paraformaldehid  
RFP (*engl.* red fluorescent protein), crvena fluorescentna bjelančevina  
Thy1 (*engl.* thymus cell antigen 1), antigen timusnih stanica  
YFP (*engl.* yellow fluorescent protein), žuta fluorescentna bjelančevina

## Popis priloga

**Grafikon 1.** Prikaz broja radova objavljenih na PubMedu od 2000. godine do danas.

**Grafikon 2.** Prebrojavanjem ukupnog broja stanica na deset vidnih polja određen je broj neurona i astrocita tijekom diferencijacije stanica u primarnoj kulturi neurona.

**Grafikon 3.** Prebrojavanjem ukupnog broja stanica na deset vidnih polja određen je broj neurona, Thy1 pozitivnih neurona i astrocita tijekom diferencijacije stanica u primarnoj kulturi neurona.

**Tablica 1.** Primarna protutijela krištena u ovom istraživanju.

**Tablica 2.** Sekundarna protutijela korištena u ovom istraživanju.

**Slika 1.** Shematski prikaz diferencijacije živčanih matičnih stanica.

**Slika 2.** Imunocitokemija GFP-LUC stanica (zeleno) tijekom 7. dana diferencijacije.

**Slika 3.** Imunocitokemija GFP-LUC stanica (zeleno) tijekom 14. dana diferencijacije.

**Slika 4.** Imunocitokemija Thy1-16 stanica (zeleno) tijekom 7. dana diferencijacije.

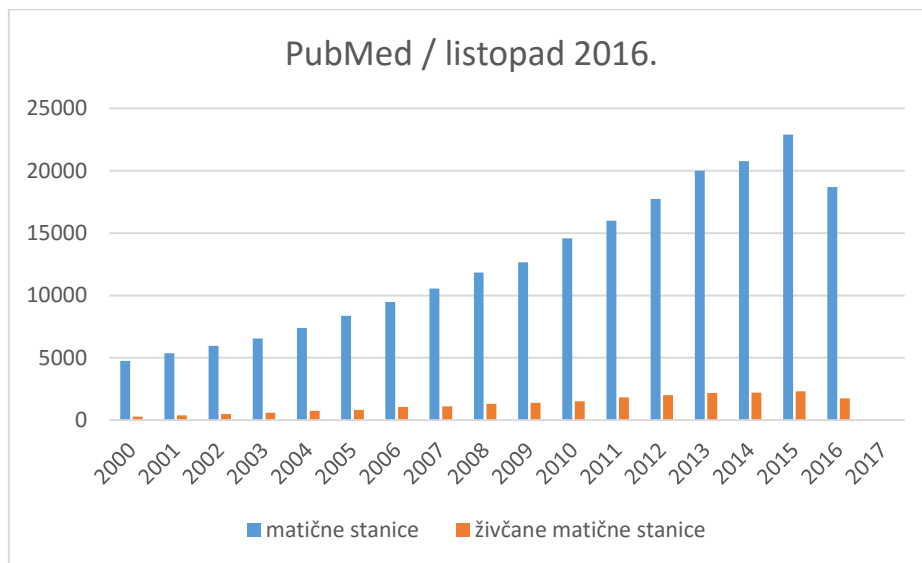
**Slika 5.** Imunocitokemija Thy1-16 stanica (zeleno) tijekom 14. dana diferencijacije

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA.....	4
3. MATERIJALI I METODE.....	6
3.1. Životinje.....	6
3.2. Izolacija živčanih matičnih stanica.....	6
3.3. Priprema podloga za diferencijaciju stanica.....	7
3.4. Nasadivanje, diferencijacija i fiksacija stanica.....	7
3.5. Imunocitokemija.....	8
3.6. Prebrojavanje stanica.....	9
4. REZULTATI.....	10
4.1. Diferencijacija GFP-LUC stanica.....	10
4.2. Diferencijacija Thy1-16 stanica.....	13
5. RASPRAVA.....	17
6. ZAKLJUČCI.....	19
7. LITERATURA.....	20
8. SAŽETAK.....	24
9. SUMMARY.....	25
10. ŽIVOTOPIS.....	26

## 1. UVOD

U posljednjih petnaestak godina tehnologija matičnih stanica intenzivno se razvija, a istraživanja u ovom području pobuđuju veliki znanstveni interes širom svijeta. Veliki interes za matične stanice, bilo koje vrste, prije svega vidi se prema broju objavljenih radova u relevantnim bazama podataka kao što je PubMed. Na priloženom grafikonu 1. vidi se konstantan rast radova, od čega živčane matične stanice zauzimaju razmjerno veliki postotak. Kada uzmemo u obzir da se u ovu kategoriju ubrajaju i mezenhimske matične stanice kao što su npr. krvotvorne stanice koje imaju veliki značaj u liječenju različitih vrsta leukemija, jasno vidimo da živčane matične stanice, odnosno terapija živčanim matičnim stanicama zauzima značajno mjesto u znanstvenim istraživanjima. Budući da adekvatne terapije za većinu bolesti živčanog sustava još uvijek nema, a njega pacijenata je izuzetno skupa i složena, terapija živčanim matičnim stanicama predstavlja jedan od najvećih izazova u suvremenoj neuroznanosti.



**Grafikon 1.** Prikaz broja radova objavljenih na PubMedu od 2000. godine do danas. Preuzeto (10. listopada 2016.) i prilagođeno s: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

Matične stanice (*engl.* stem cells) predstavljaju široku populaciju stanica od kojih se u kontroliranim uvjetima mogu diferencirati različite vrste stanica. Izgledom, većina matičnih stanica izgleda vrlo slično, radi se o vrlo sitnim stanicama (10-20 mikrona) koje su okruglastog oblika. Upravo takav oblik i veličina omogućuju stanicama, prije svega proliferaciju (umnažanje), rast i razvoj (diferencijaciju) u stanice određenog tipa. Najstarija, ali i najjednostavnija podjela dijeli matične stanice na: totipotentne, kakva je samo zigota iz koje će se razviti apsolutno sve stanice budućeg organizma, uključujući i plodove ovojnice. Nadalje, razlikujemo pluripotentne, kakve su primjerice embrionalne matične stanice iz kojih će se razviti budući embrio. To su stanice embrioblasta i za razliku od zigote imaju ipak manju sposobnost diferencijacije. Multipotentne matične stanice su one iz kojih će se razviti određena tkiva, organi i organski sustavi kao što su npr. živčane matične stanice, iz kojih će se razviti stanice živčanog sustava, neuroni i glija stanice (Slika 1.) (HYTTEL i sur., 2010.; MCGEADY i sur., 2014.). Osim tijekom embrionalnog i fetalnog razdoblja, danas znamo iz literature da se živčane matične stanice nalaze u mozgu odraslog miša, ali znatno manje u mozgu čovjeka i to u subventrikularnoj zoni i u zrnatom sloju hipokampusa (GAGE, 2000.; MITREČIĆ i sur., 2009.; WATSON i sur., 2012.).

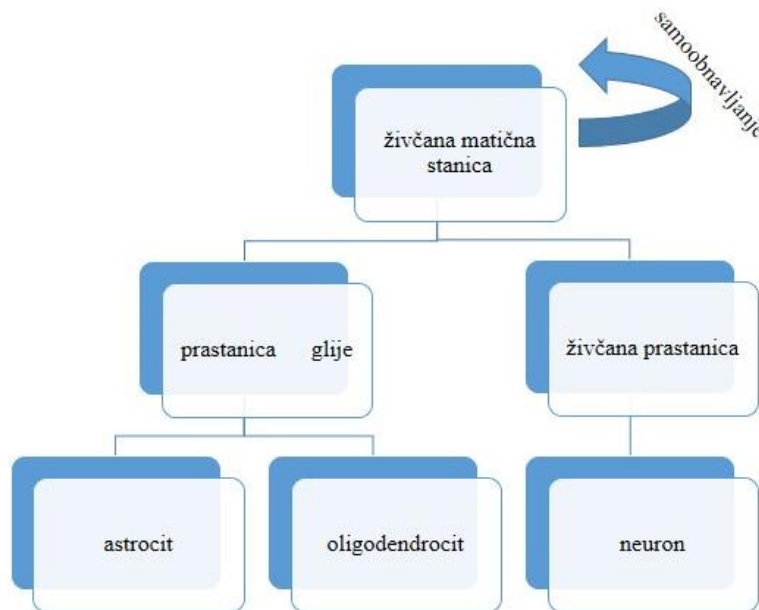
U istraživanjima matičnih stanica, veliku i nezaobilaznu ulogu imaju transgenične životinje, odnosno životinje kojima su zahvaljujući genetskim modifikacijama ugrađene fluorescentne bjelančevine. Najčešća i najpoznatija takva bjelančevina jest zelena fluorescentna bjelančevina ili GFP (*engl.* green fluorescent protein) ili jedna od spektralnih varijanti: YFP (*engl.* yellow fluorescent protein), RFP (*engl.* red fluorescent protein) i CFP (*engl.* cyan fluorescent protein). U literaturi su opisane brojne modifikacije miševa, no najčešće se radi ili o ubikvitarno pozitivnim životinjama, što znači da sve stanice u tijelu izražavaju zelenu fluorescentnu bjelančevinu ili druga varijanta je da se fluorescentna bjelančevina izražava preko određenog gena i pozitivne su samo određene stanice. U ovom istraživanju korištena su dva mišja soja, ubikvitarni GFP-LUC i Thy1-YFP soj.

GFP-LUC mišji soj razmjerno je novi soj, na kojem, prema mojim saznanjima, još nije napisana niti jedna publikacija, a napravljen je na Medicinskom fakultetu u Salzburgu 2014. godine, te je doniran Laboratoriju za matične stanice pri Hrvatskom institutu za istraživanje mozga u sklopu suradnje na projektima. Ovaj soj je ubikvitarni GFP, što znači da izražava zelenu fluorescentnu bjelančevinu u svim stanicama. Osim toga ovaj soj izražava i LUC (luciferazu, gen podrijetlom od krijesnice te se može pratiti preko bioluminiscencije *in vivo*).



Thy1-YFP mišji soj postoji već šesnaest godina (FENG i sur., 2000.), a karakterizira ga izražaj fluorescentne bjelančevine pomoću promotora *Thy1* gena. Fluorescencija je visoko specifična isključivo za neurone i niti jedna druga stanica nije pozitivna. Iako je ova skupina autora napravila čak 25 sojeva ovog miša, zanimljivo je da svi imaju različiti uzorak fluorescencije i obilježavaju različitu populaciju neurona. Thy1-YFP pozitivne stanice izražavaju fluorescentnu bjelančevinu u svim svojim dijelovima stanice uključujući: jezgru, perikarion, nastavke (akson i dendriti), čak i spine.

Glavni cilj ovoga istraživanja, bio je napraviti primarnu kulturu neurona podrijetlom iz dva mišja soja, opisati uzorak izražaja bjelančevine te ih međusobno usporediti. Budući da se radi o razmjerno novim mišjim sojevima, prema meni dostupnim informacijama, primarna kultura neurona na ovim sojevima do sada još nije napravljena.



**Slika 1.** Shematski prikaz diferencijacije živčanih matičnih stanica. Od živčanih prastanica, dio stanica služi za samoobnavljanje dok se drugi dio stanica usmjerava prema neuronskoj odnosno glija lozi stanica.

## 2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

U literaturi je opisano nekoliko načina obilježavanja stanica kao bi se mogao pratiti njihov diferencijacijski potencijal u *in vitro* uvjetima, ali i *in vivo*, bilo da se radi o stanicama domaćina bilo da se radi o stanicama koje su transplantirane u domaćina. Međutim, dva su osnovna načina obilježavanja stanica: pomoću egzogenih boja ili genetskim modifikacijama ugrađivanjem fluorescentne bjelančevine.

Obilježavanje egzogenim bojama razmjerno je jednostavno, brzo i relativno jeftino. Ovakav način obilježavanja koristi se često u neuroznanosti, a opisane su različite boje kao što je npr. fluorescentna boja PKH26 (Sigma) ili BrdU (Sigma). Fluorescentne boje se često koriste u transplantacijama stanica i omogućuju praćenje stanica u tkivu domaćina. Međutim, ove boje imaju i svoje velike nedostatke, primjerice intenzitet boje slabi s vremenom, tijekom staničnih dioba boja se razdijeli na stanice-kćeri, tijekom diferencijacije stanica boja se raširi po čitavoj stanici te ju je vrlo često nemoguće vizualizirati i najveći nedostatak ovakvog načina bojanja stanica je da oboji i tkivo domaćina pa se ne može sa 100% sigurnošću razlikovati obilježene stanice od obojanog tkiva (ALIC, 2015.; ALIC i sur., 2016.; KOSI, 2016.). Druga boja koja se također često koristi u sličnim istraživanjima jest BrdU (5-bromo-2'-deoksiuridin) koja obilježava stanice koje se dijele. Ova boja se ugrađuje u jezgru tijekom stanične diobe i obilježava sve novonastale stanice. Stanice obilježene s BrdU mogu se obilježavati *in vivo*, intraperitonealnom injekcijom otopine BrdU u miša (KOSI i sur., 2015.) ili obilježavanjem stanica *in vitro* koje se nakon obilježavanja transplantiraju životinji (KOSI, 2016.).

Drugi način obilježavanja stanica temelji se na genetskim manipulacijama i ugradnji fluorescentne bjelančevine u određene stanice domaćina što je prvi put opisao CHALFIE i sur. (1994.). Zahvaljujući ovom istraživanju, kao i brojnim koja su uslijedila nakon njega, mi danas možemo izolirati stanice iz različitih dijelova tijela i pratiti njihovu diferencijaciju *in vitro* (CORTI i sur., 2006., ALIC i sur., 2016.), ali i *in vivo* (FENG i sur., 2000). Iako je ovakav način obilježavanja stanica znatno kompliciraniji i daleko skuplji od prethodnog, u konačnici daje neusporedivo bolje rezultate. Iako postoji mali broj publikacija koje opisuju negativan utjecaj GFP na fiziološke funkcije stanice i životinje (COMLEY i sur., 2011.) postoje i publikacije koje dokazuju suprotno (FENG i sur., 2000.; HUANG i sur., 2000.).

Budući da je GFP-LUC tek stvoren mišji soj, na njemu još nije objavljena niti jedna publikacija, te je ovo istraživanje prvi, mali korak kojeg će slijediti *in vivo* kao i *in vitro* analize. No, postoje slični GFP sojevi na kojima su rađena istraživanja poput istraživanja KONIG i sur. (2014.) u kojem su autori pratili diferencijaciju transplantiranih GFP stanica nakon avulzije spinalnog ganglija. GFP stanice su se diferencirale u fiziološki zdrave motoričke neurone kao i u interneurone. Osim toga, GFP stanice štakora koristile su se i za intravaskularnu transplantaciju na modelu amiotrofične lateroskleroze pri čemu su uspješno prošle kroz krvno-moždanu barijeru i ugradile se u mozak domaćina (MITREČIĆ i sur., 2010.; MITREČIĆ, 2011.)

Iako Thy1-YFP postoji već petnaestak godina, napravljeno je relativno malo istraživanja na ovom mišu, ali postupno se na njemu povećava broj istraživanja. Prvi opis soja i dosta gruba analiza napravljena je od skupine koja je napravila miša (FENG i sur., 2000.; KELLER-PECK i sur., 2001.) koji su najveći dio istraživanja napravili na dva soja (YFP-H i GFP-S) tijekom prva dva tjedna postnatalnog života (PORRERO i sur., 2010.). Od svih sojeva Thy1 miša najviše je istraživanja napravljeno na soju YFP-H. CARTER i suradnici (2008.) opisali su degenerativne promjene i oporavak koji se zbivaju nakon ozljede kralježnične moždine, dok je druga skupina autora opisala važnost soja u istraživanjima tumora, upalama kao i u cijeljenju rana (JOSVAY i sur., 2014.). Velika prednost ovog soja jest vidljiv izražaj YFP u jezgri, ali i u citoplazmi neurona što omogućuje vizualiziranje čitave stanice (BANNERMAN i sur., 2005.; WANG i sur., 2006.). te na taj način omogućuje preciznu analizu izražaja bjelančevine u svim dijelovima stanice. Detaljna analiza diferencijacije živčanih matičnih stanica Thy1-YFP soja tijekom diferencijacije *in vitro*, tijekom embrionalnog razvoja i nakon transplantacije u mozak miša zahvaćen moždanim udarom opisana je u grupi Laboratorija za matične stanice (ALIĆ, 2015.; ALIĆ i sur., 2016.). Nadalje, na istom soju je napravljena i analiza izražaja gena tijekom diferencijacije živčanih matičnih stanica pomoću RT-PCR (STOJANAC, 2016.).

Istraživanje na primarnoj kulturi neurona, ali na stanicama divljeg tipa miša pokazalo je da se stanice diferenciraju uglavnom prema neuronima (KAPURALIN i sur., 2015.). No međutim, u literaturi u potpunosti nedostaju istraživanja koja bi opisala diferencijaciju stanica u primarnoj kulturi ovih transgeničnih sojeva. Primarna kultura neurona posebno je zanimljiva u transgeničnih mišjih sojeva jer omogućuje vizualizaciju različitih tipova stanica kao i različiti uzorak izražaja bjelančevina. Osim toga, diferencijacija stanica u primarnoj kulturi neurona znatno se razlikuje od diferencijacije živčanih matičnih stanica koja se češće koristi u literaturi.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Životinje**

Za potrebe ovoga istraživanja korištene su dvije gravidne ženke, podrijetlom iz dva različita mišja soja: Ubikvitarni GFP-LUC (izražava GFP u svim stanicama) i Thy1-16 (izražava GFP u određenim neuronima). Istraživanje je provedeno u Laboratoriju za matične stanice na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga, a odobreno je od Etičkog povjerenstva Medicinskog (Ur. broj: 04-77/2010-238) i Veterinarskog (Ur. broj: 251-61-01/139-16-2) fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

#### **3.2. Izolacija živčanih matičnih stanica**

Kako bi izolirali živčane matične stanice, potrebne su ženke koje su gravidne 17,5 dana. Takve ženke su žrtvovane cervikalnom dislokacijom, te su im izolirani gravidni rogovi maternice. Od tog trenutka proces izolacije živčanih matičnih stanica se nastavlja u sterilnim uvjetima, u laminaru u staničnoj kulturi. Izolirani gravidni rogovi su prebačeni u sterilnu petrijevku posudu u kojoj se nalazi HBSS pufer (Gibco). Zametak treba odvojiti od ovojnica, nakon čega je napravljena dekapitacija, te je telencefalon pažljivo odvojen. Telencefaloni su mehanički usitnjeni škaricama i premješteni u sterilnu tubu (BD Falcon, 50 mL). Kako bi se nastalo usitnjeno tkivo proteolitički razgradilo i kako bi se dobila suspenzija stanica, potrebno je dodati 5 mL akutaze (StemPro®Acutase® Cell Dissociation Reagent, Gibco by life Technologies, A11105-01) kroz 20 minuta, na temperaturi 37 °C. Tkivo je dodatno usitnjeno mehaničkim provlačenjem kroz nastavak za pipetu tijekom tih 20 min. Stanična suspenzija je nakon 20 minuta prebačena u novu tubu i na nju je dodana ista količina medija kako bi se akutaza deaktivirala. Osim toga, potrebno je cijelu tubu staviti na centrifugu pri brzini od 300 g kroz 6 minuta, na temperaturi od 21 °C. Nakon centrifugiranja potreban je samo talog, stoga se tekući dio ukloni. Stanice se moraju međusobno odvojiti i osloboditi komadića tkiva koje je zaostalo, pa je iz tog razloga na talog dodano 2 mL medija. U međuvremenu je, prema broju stanica, pripremljen medij u kojem su stanice nasađene na podloge. Stanice su nasađene u mediju (DMEM/F-12 (1:1) (1X)+GlutaMAX™-I, Gibco by life Technologies, 31331-028) u koji je dodan B-27 (B-27®Supplement (50X), Gibco by life Technologies, 17504-044), Pen Strep (Penicillin Streptomycin, Gibco by life Technologies, 15070-063) i N-2 (N-2 Supplement (100x)). Stanice su uzgajane u inkubatoru pod temperaturom od 37 °C i 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.3. Priprema podloga za diferencijaciju stanica

Da bi pripremili podlogu za diferencijaciju stanica, odnosno stakla (*engl.* cover slips) promjera 12 mm, potrebno je 4-5 dana. Prvo su stakla ostavljena preko noći u dušičnoj kiselini, nakon čega su ispirana sterilnom vodom kroz dva sata. Nakon ispiranja ostavljena su 24 sata u 70% alkoholu. Sljedećeg dana stakla su sterilizirana na temperaturi od 250 °C tijekom 12 sati. Nakon sterilizacije, na stakla je stavljeno 130 µL Poly-D-lizina u koncentraciji 500 µg/mL (Poly-D-lysine hydrobromide, SIGMA, P6407-5MG) tijekom 24 sata. Poly-D-lizin je ispran sterilnom vodom, a stakla su premještena u ploče za diferencijaciju (*engl.* 24 well plate), te je na njih stavljeno 400 µL laminina u koncentraciji 10 µg/mL (Laminin from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma basement membrane, SIGMA, L2020-1MG) tijekom 24 sata. Nakon toga se laminin dva puta ispere svježim medijem i tada su stakla spremna za diferencijaciju stanica.

### 3.4. Nasađivanje, diferencijacija i fiksacija stanica

Stanice su nasađene u koncentraciji od 200-250 000 stanica po jednom staklu. Budući da su za potrebe ovog istraživanja korištene primarne kulture neurona, stanice su neposredno nakon izolacije nasađene na prethodno pripremljene podloge, bez uobičajene proliferacije i uzgoja u flaskama. Nakon nasađivanja stanice su stavljene na diferencijaciju u inkubator. Stanicama je nakon 24 sata promijenjen medij, kako bi se podržao rast i diferencijacija neurona. Za primarne kulture u Laboratoriju za matične stanice, standardno se koristi tzv. „kondicionirani“ medij. Kondicionirani medij dobiven je na način da se Neurobasal medij, u koji su dodani čimbenici i antibiotik, stavi na uzgojene astrocite. Nakon 24 sata medij je pokupljen s astrocita, profiltriran i dodan na neurone. Kondicionirani medij se koristi kako bi potaknuo rast neurona, budući da su astrociti u njega izlučili svoje produkte koji se fiziološki nalaze u živčanom tkivu. Stanice su za potrebe ovoga istraživanja uzgajane u dvije vremenske točke (7 i 14 dana) kako bismo dobili potpuno diferencirane neurone. Nakon 7 i 14 dana stanice su fiksirane 4% paraformaldehidom tijekom 15 minuta te su isprane s PBS (*engl.* Phosphate buffer saline) puferom i ostavljene na +4° C do bojanja.

### 3.5. Imunocitokemija

Fiksirane stanice se tri puta po pet minuta ispiru PBS-om, nakon čega im se dodaje 500  $\mu$ L otopine za permeabilizaciju i blokiranje nespecifičnog vezanja sekundarnog protutijela (0,2% triton X-100 (Sigma, T8787-100ML) u PBS-u + 3% kozjeg seruma). Blokiranje sekundarnog protutijela traje 60 minuta. Zatim je stanicama dodano 85  $\mu$ L otopine primarnog protutijela (0,2% triton X-100 u PBS-u + 1% kozjeg seruma + primarno protutijelo) i to je ostavljeno preko noći u hladnjaku na +4 °C. Primarna protutijela korištena u ovom istraživanju prikazana su u Tablici 1.

Sljedeći dan primarna protutijela isprana su tri puta po pet minuta PBS-om, poslije čega je na stanice stavljena otopina sekundarnih protutijela (0,2% triton X-100 u PBS-u + sekundarno protutijelo). Popis sekundarnih protutijela korištenih u ovom istraživanju prikazan je u Tablici 2. Inkubacija sekundarnim protutijelima zbiva se na sobnoj temperaturi u zamračenoj prostoriji tijekom dva sata. Nakon toga su sekundarna protutijela ispirana istim postupkom kao i primarna, te se na stanice stavlja DAPI, fluorescentna boja za jezgre, u koncentraciji 1:8000. DAPI se ispiru nakon deset minuta, i to jednako kao primarna i sekundarna protutijela, odnosno tri puta po pet minuta. Kada je DAPI isprana, stanice su poklopljene medijem za fluorescentno poklapanje (Dako Fluorescent Mounting Medium, S3023). Poklopljeni preparati su ostavljeni na sušenju u hladnjaku na +4 °C i spremni su za mikroskopiranje na konfokalnom mikroskopu (Zeiss, LSM 510 Meta).

**Tablica 1.** Primarna protutijela krištena u ovom istraživanju.

Protutijelo	Podrijetlo	Razrjeđenje	Proizvođač
Doublecortin	kunić	1:200	Cell Signaling (#4606)
GFAP	pile	1:250	Abcam (ab4674)
GFP	pile	1:500	Molecular probes (A10262)
MAP2	pile	1:1000	Abcam (ab5392)
NeuN	miš	1:200	Millipore (MAB377)
$\beta$ 3-tubulin	kunić	1:200	Cell Signaling (D71G9)

**Tablica 2.** Sekundarna protutijela korištena u ovom istraživanju.

Protutijelo	Razrjeđenje	Proizvođač
Alexa Fluor 546 koza anti - pile IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A11040)
Alexa Fluor 488 koza anti - kunić IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A11084)
Alexa Fluor 488 koza anti - pile IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A11039)
Alexa Fluor 488 magarac anti - kunić IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A21206)
Alexa Fluor 647 magarac anti - miš IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A21202)
Alexa Fluor 546 magarac anti - kunić IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A21206)
Alexa Fluor 647 magarac anti - kunić IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A21002)

### 3.6. Prebrojavanje stanica

Broj obojanih stanica je određen nakon slikanja preparata konfokalnim mikroskopom (Zeiss LSM 510 Meta) na deset vidnih polja. Za kvantifikaciju stanica in vitro korištene su stanice oba mišja soja u vremenskim točkama od 7 i 14 dana. Kvantifikacija je rađena kako bi se odredio broj Thy1 pozitivnih stanica, broj neurona i astrocita u primarnoj kulturi neurona. Prebrojavanje je napravljeno od strane dva neovisna istraživača, a rezultati prebrojavanja su se poklapali u 100% slučajeva.

## 4. REZULTATI

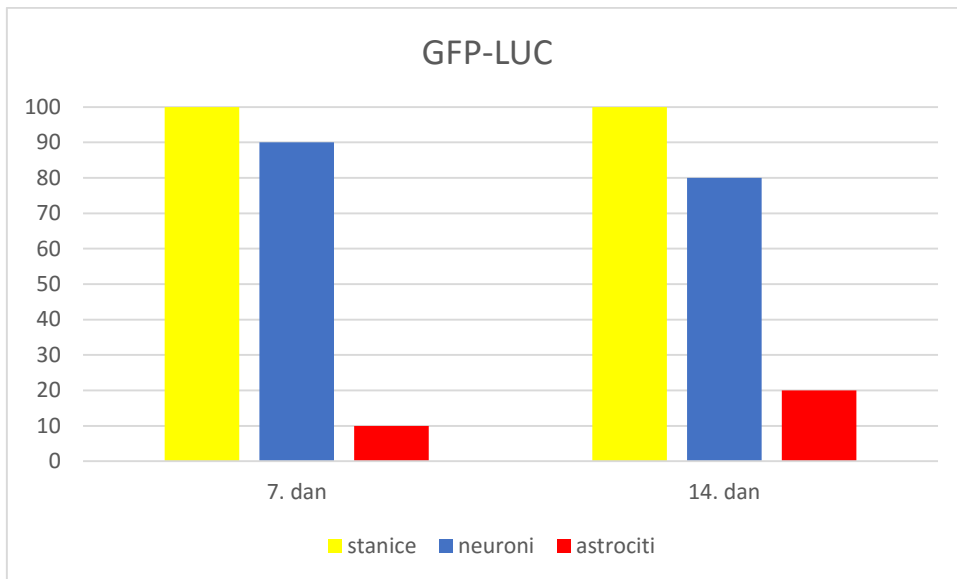
### 4.1. Diferencijacija GFP-LUC stanica

Tijekom sedmog dana diferencijacije, stanice podrijetlom od GFP-LUC mišjeg soja u potpunosti su se diferencirale u zrele, razgranate neurone i astrocite. Budući da su stanice podrijetlom od ubikvitarnog mišjeg soja, sve stanice, neuroni i astrociti, su GFP pozitivne (Slika 2 A-C, zeleno). Osim GFP, koji je pozitivan u 100% diferenciranih stanica, napravljeno je bojanje stanica na tipične biljege neurona (MAP2,  $\beta$ 3-ubulin i NeuN) te za astrocite (GFAP). Tipični citoplazmatski biljezi neurona (MAP2 i  $\beta$ 3-tubulin) pozitivni su u 90% diferenciranih stanica (Grafikon 2) i jasno su pozitivni u perikarionu i nastavcima neurona (Slika 2 A i C, crveno). Treći biljeg neurona NeuN (Slika 2 A-C, plavo) koji je specifičan za jezgru neurona, također boji 90% stanica, ali osim u jezgrama, NeuN je u potpuno diferenciranim stanicama pozitivan i u nastavcima. Pozitivnost NeuN-a u nastavcima očituje se kao granulirani signal koji je izražen gotovo čitavom dužinom nastavaka. Na stopljenim slikama jasno se vidi da se sva tri biljega neurona u potpunosti podudaraju sa signalom GFP-a. Svega 10% (Grafikon 2) stanica je diferencirano u astrocite i GFAP je pozitivno i također pokazuju kolokalizaciju s GFP (Slika 2 B, crveno).

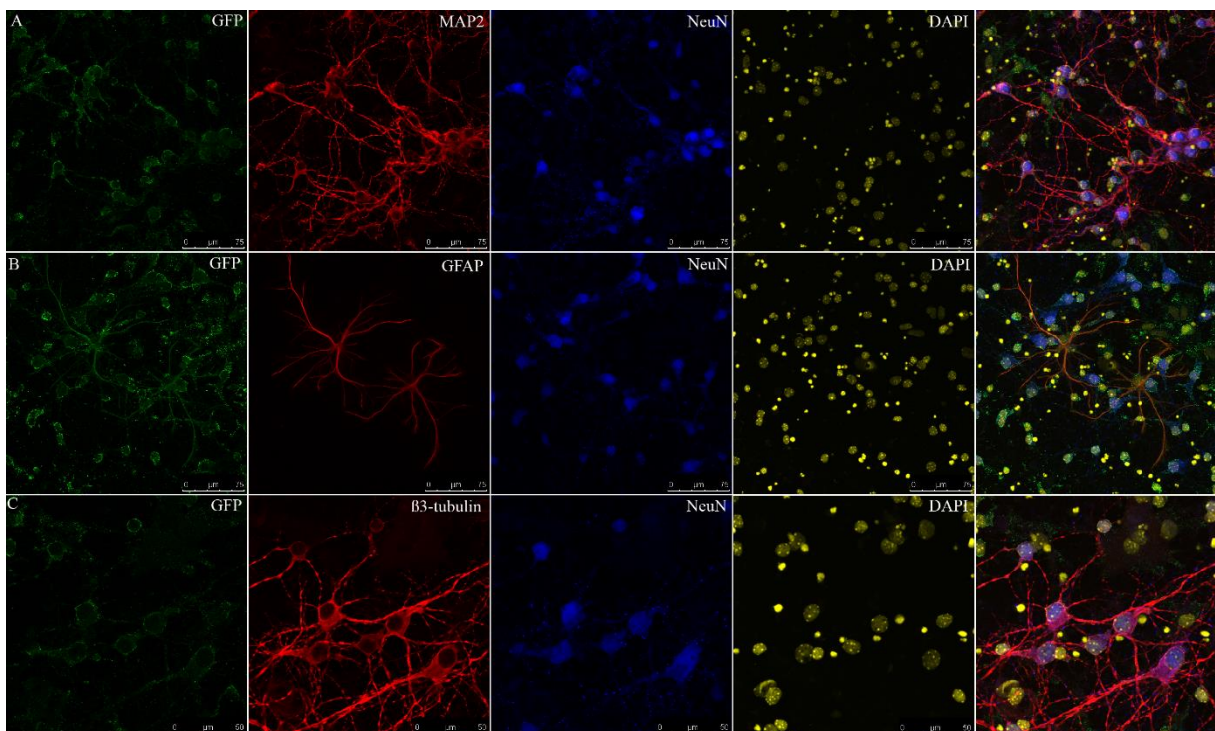
Tijekom četrnaestog dana diferencijacije, stanice su znatno razvijenije nego u prethodnoj vremenskoj točki. Razvijenost, odnosno zrelost stanica očituje se u većem broju i debljini samih nastavaka. U ovoj vremenskoj točki govorimo o potpuno zreloj primarnoj kulturi mišjih neurona. Ukupan broj stanica u kulturi je manji zbog prirodnog odumiranja stanica *in vitro*, ali su stanice izrazito diferenciranije i zrelije. Neurona u staničnoj kulturi ima 80% od ukupnog broja prebrojanih stanica (Grafikon 2) i u potpunosti kolokaliziraju s MAP2 (Slika 3 A, crveno),  $\beta$ 3-tubulinom (Slika 3 C, crveno) i NeuN-om (Slika 3 A-C, plavo). Zrelost neurona najbolje se vidi na snažnom izražaju NeuN-a čija je citoplazmatska granuliranost neusporedivo veća nego u prethodnoj vremenskoj točki. Budući da se astrociti sporije diferenciraju, ali i zbog odumiranja pojedinih neurona u ovoj vremenskoj točki nalazi se veći broj GFAP pozitivnih stanica i iznosi 20% (Grafikon 2) od ukupnog broja prebrojanih stanica (Slika 3 B, crveno).

Kao negativna kontrola bojanja stanica, na jedno staklo u svakoj vremenskoj točki je stavljena samo otopina sekundarnih protutijela. Budući da nije bilo primarnih protutijela, sekundarna protutijela se nisu imala na što vezati te na ovim preparatima nije vidljiv nikakav signal (nije prikazano).

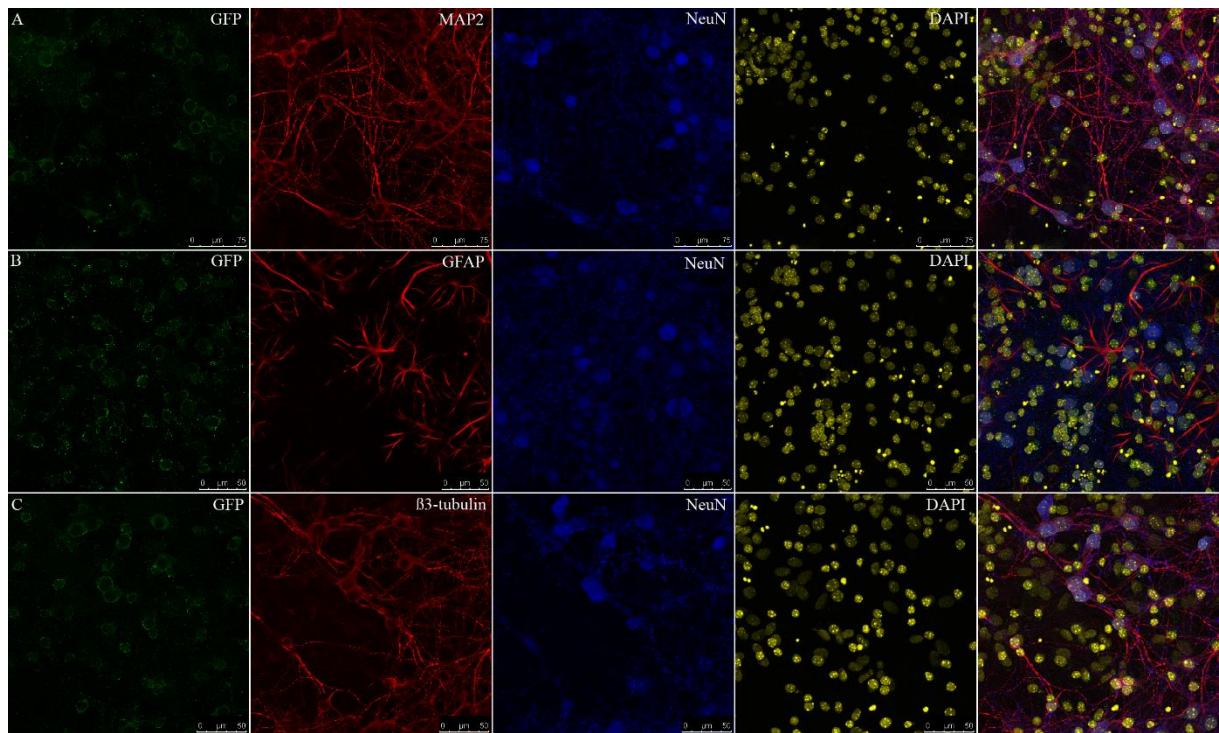




**Grafikon 2.** Prebrojavanjem ukupnog broja stanica na deset vidnih polja određen je broj neurona i astrocita tijekom diferencijacije stanica u primarnoj kulturi neurona. Na osi X prikazane su vremenske točke diferencijacije stanica, dok je na osi Y prikazan broj stanica izražen u postotku.



**Slika 2.** Imunocitokemija GFP-LUC stanica (zeleno) tijekom 7. dana diferencijacije. Na slici A prikazano je bojanje s MAP2 (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) te stopljena slika. Na slici B prikazano je bojanje s GFAP-om (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) te stopljena slika. Na slici C prikazano je bojanje s  $\beta$ 3-tubulinom (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) te stopljena slika.



**Slika 3.** Imunocitokemija GFP-LUC stanica (zeleno) tijekom 14. dana diferencijacije. Na slici A prikazano je bojanje s MAP2 (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) te stopljena slika. Na slici B prikazano je bojanje s GFAP-om (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) te stopljena slika. Na slici C prikazano je bojanje s  $\beta$ 3-tubulinom (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) te stopljena slika.

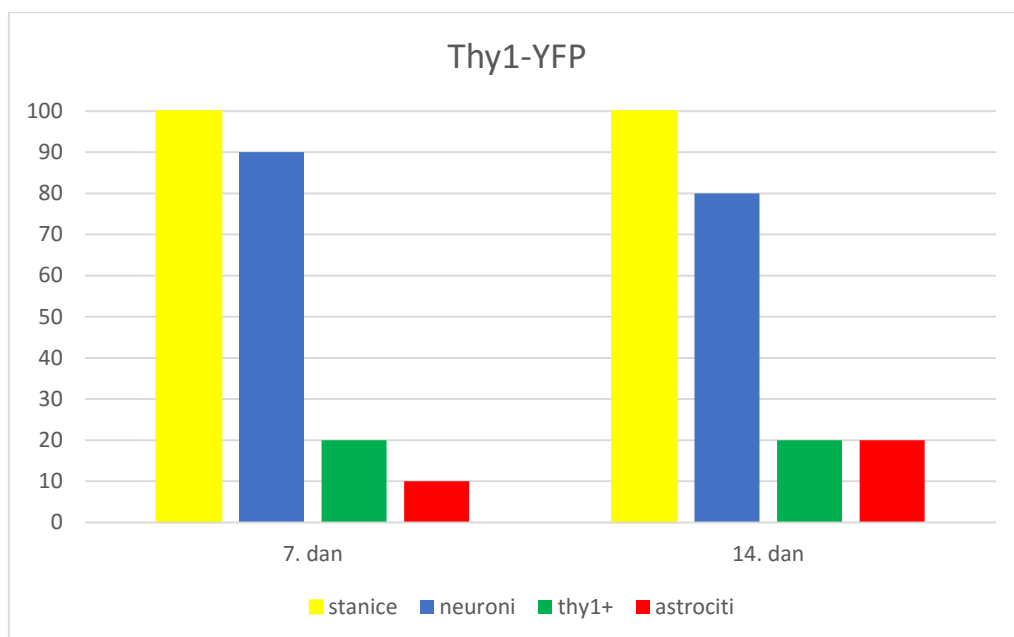
## 4.2. Diferencijacija Thy1-16 stanica

Tijekom sedmog dana diferencijacije, stanice podrijetlom od Thy1-YFP mišjeg soja, u potpunosti su se diferencirale u zrele neurone i astrocite. Budući da ovaj mišji soj ne izražava ubikvitarno GFP, već samo u određenom postotku neurona, prebrojavanjem stanica vidljivo je da svega 20% neurona izražava GFP odnosno njegovu varijantu YFP (Slika 4 A-E, zeleno). Osim ovog biljega neurona, čija se fluorescencija izražava bez imunocitokemije, na stanicama je napravljena imunocitokemija kako bi se odredila kolokalizacija s biljezima neurona (MAP2,  $\beta$ 3-tubulin, NeuN i Doublecortin) te astrocita (GFAP). Sve Thy1 pozitivne stanice kolokaliziraju s tipičnim biljezima neurona: MAP2 (Slika 4 A, B i E, crveno)  $\beta$ 3-tubulin (Slika 4 A-plavo, C-crveno i D-plavo), NeuN (Slika 4 B i C, plavo) te Doublecortin (Slika 4 E, plavo). Niti jedna Thy1 pozitivna stanica nije GFAP pozitivna, odnosno izražaj Thy1 je specifičan za neurone. Na stopljenim slikama (Slika 4 A-E) vidi se potpuna kolokalizacija Thy1 s biljezima neurona (ljubičasto), dok su astrociti crveni. Prebrojavanjem diferenciranih stanica u ovoj vremenskoj točki vidljivo je da je u kulturi prisutno 90% neurona i 10% astrocita. Od ukupnog broja neurona, njih 20% je Thy1 pozitivno (Grafikon 3).

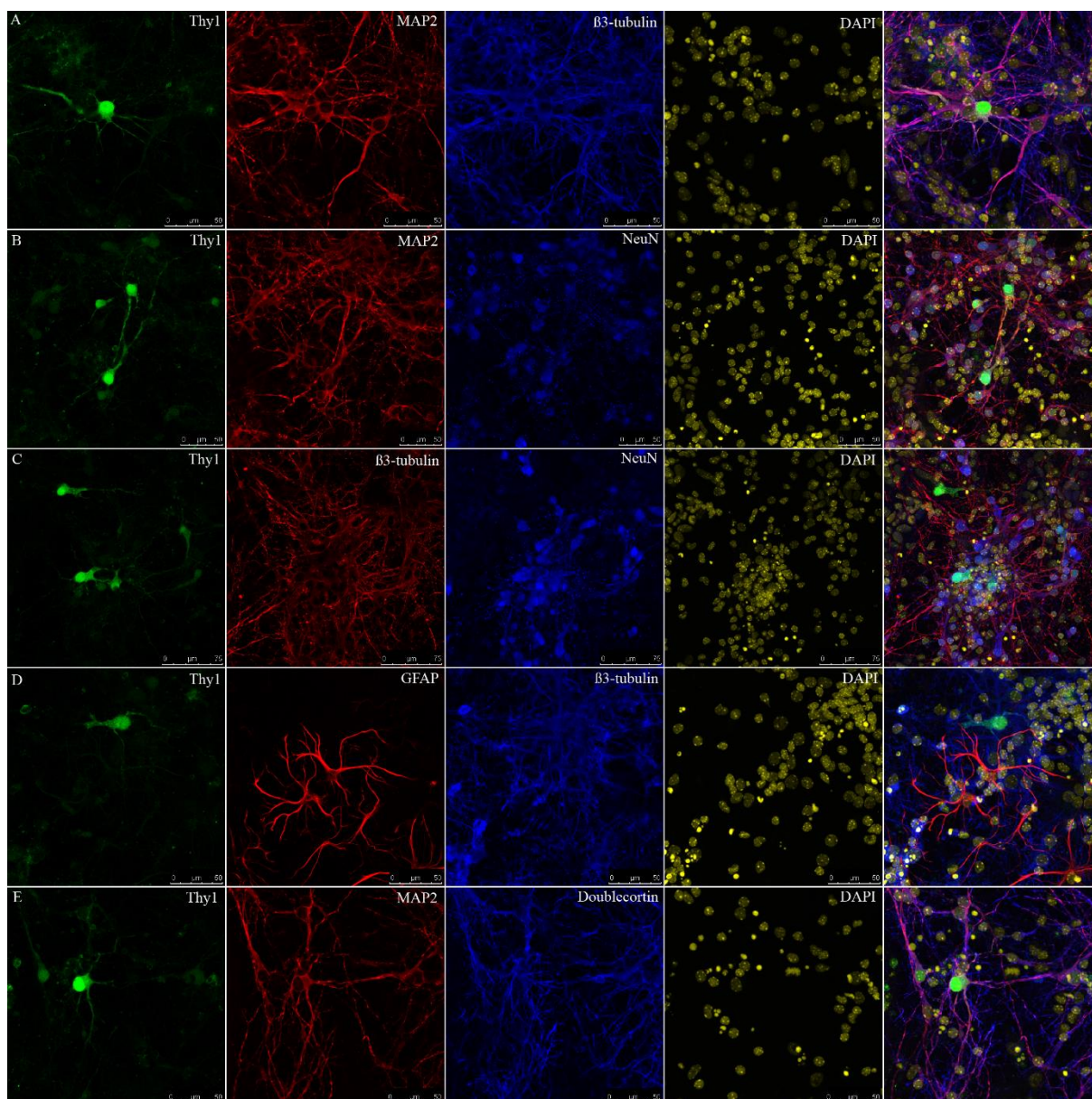
Tijekom četrnaestog dana diferencijacije, stanice su znatno razvijenije nego u prethodnoj vremenskoj točki. Kao i kod prethodnog mišjeg soja, razvijenost, odnosno zrelost stanica očituje se u većem broju i debljini samih nastavaka. I u ovih stanica ukupan broj stanica po vidnom polju je nešto manji, ali i ovdje zbog načina uzgoja stanica prevladavaju neuroni (80%), od kojih je 20% Thy1 pozitivno, a udio astrocita iznosi također 20% (Grafikon 4). Na slici 5 prikazane su stanice obojane biljezima neurona i astrocita. Osim imunohistokemije na svim slikama su obojane i jezgre s DAPI bojom (žuto).

Zanimljiva je velika pozitivnost Doublecortina (Slika 4 i 5 E, plavo) za kojeg znamo iz literature da je biljeg mladih neurona, odnosno neurona u nastanku. Ovakvim načinom uzgoja stanica i u ovim uvjetima, Doublecortin je pozitivan u obje vremenske točke i u potpunosti kolokalizira s Thy1 i drugim biljezima neurona što se jasno vidi na stopljenim slikama (Slika 4 i 5 E, ljubičasto).

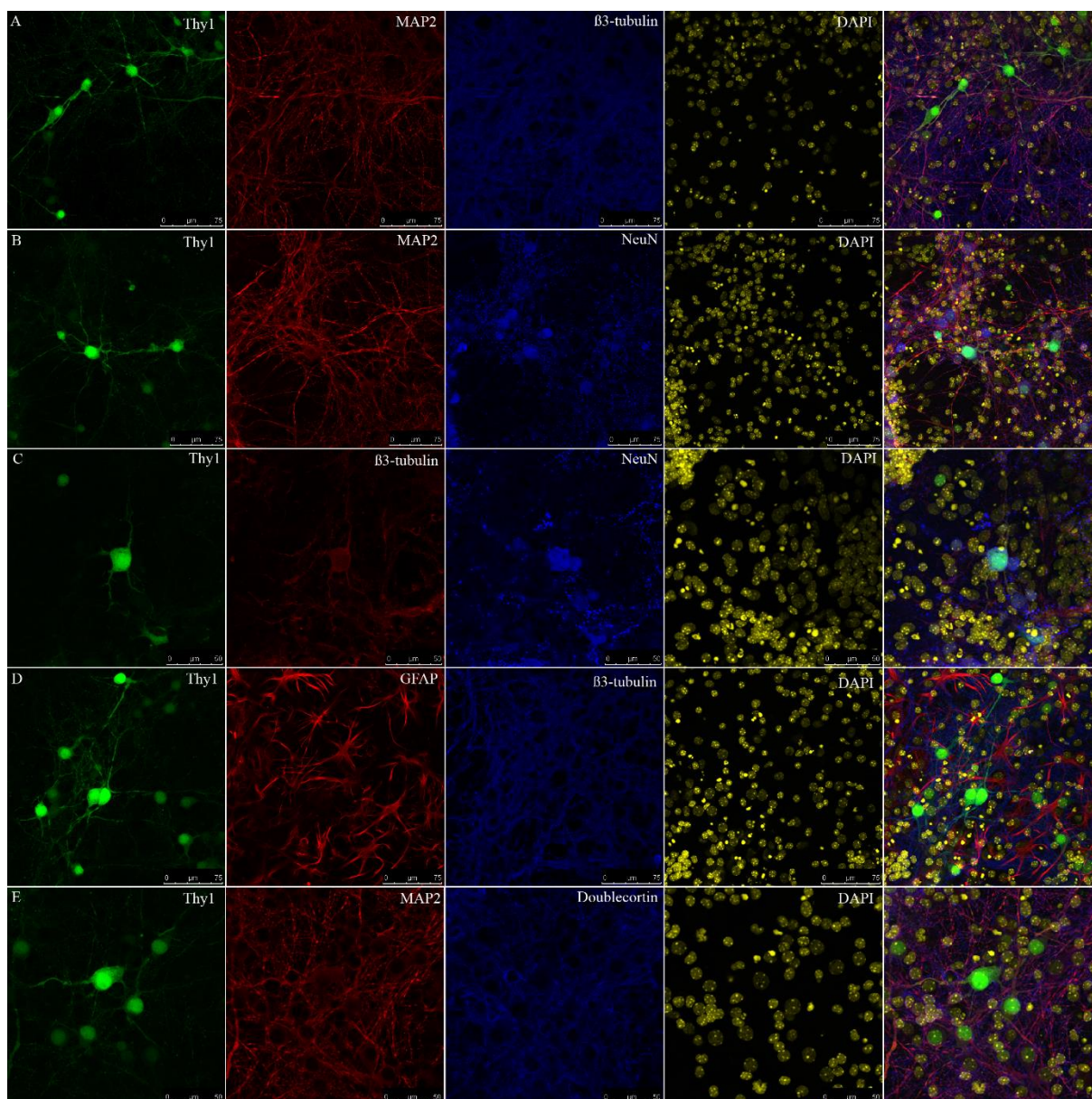
Kao negativna kontrola bojanja stanica, na jedno staklo u svakoj vremenskoj točki je stavljena samo otopina sekundarnih protutijela. Budući da za Thy1 nije potrebno protutijelo, na ovim preparatima su vidljive samo Thy1 (zelene) stanice (nije prikazano).



**Grafikon 3.** Prebrojavanjem ukupnog broja stanica na deset vidnih polja određen je broj neurona, Thy1 pozitivnih neurona i astrociti tijekom diferencijacije stanica u primarnoj kulturi neurona. Na osi X prikazane su vremenske točke diferencijacije stanica, dok je na osi Y prikazan broj stanica izražen u postotku



**Slika 4.** Imunocitokemija Thy1-16 stanica (zeleno) tijekom 7. dana diferencijacije. Na slici A prikazano je bojanje s MAP2 (crveno),  $\beta$ 3-tubulinom (plavo), DAPI (žuto) te stopljena slika. Na slici B prikazano je bojanje s MAP2 (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) te stopljena slika. Na slici C prikazano je bojanje s  $\beta$ 3-tubulinom (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) te stopljena slika. Na slici D prikazano je bojanje s GFAP-om (crveno),  $\beta$ 3-tubulinom (plavo), DAPI (žuto) te stopljena slika. Na slici E prikazano je bojanje s MAP2 (crveno), Doublecortinom (plavo), DAPI (žuto) te stopljena slika.



**Slika 5.** Imunocitokemija Thy1-16 stanica (zeleno) tijekom 14. dana diferencijacije. Na slici A prikazano je bojanje s MAP2 (crveno),  $\beta$ 3-tubulinom (plavo), DAPI (žuto) te stopljena slika. Na slici B prikazano je bojanje s MAP2 (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) te stopljena slika. Na slici C prikazano je bojanje s  $\beta$ 3-tubulinom (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) te stopljena slika. Na slici D prikazano je bojanje s GFAP-om (crveno),  $\beta$ 3-tubulinom (plavo), DAPI (žuto) te stopljena slika. Na slici E prikazano je bojanje s MAP2 (crveno), Doublecortinom (plavo), DAPI (žuto) te stopljena slika.

## 5. RASPRAVA

Tijekom ovog istraživanja napravljena je primarna kultura neurona podrijetlom od dva mišja soja, GFP-LUC i Thy1-YFP. Stanice su neposredno nakon izolacije nasadene na prethodno pripremljene podloge te su stavljene na diferencijaciju kroz četrnaest dana kako bi se odredio broj diferenciranih stanica, uzorak izražaja fluorescentne bjelančevine te međusobno usporedile stanice podrijetlom od ova dva soja.

Budući da se radi o stanicama u primarnoj kulturi neurona, stanice su uzgajane znatno dulje nego što diferenciraju živčane matične stanice u Laboratoriju za matične stanice. Stanice podrijetlom iz GFP-LUC soja 100% su pozitivne budući da je GFP ubikvitarno „ubačen“ u blastocistu miša. Sve stanice su pozitivne, odnosno zelene. Za vizualizaciju ovog biljega potrebno je protutijelo, što je uobičajeno kod ubikvitarnih GFP mišjih sojeva. Opisujući kulturu stanica GFP je citoplazmatski biljeg, koji je intenzivno pozitivan u čitavoj citoplazmi perikariona i nastavaka dok jezgra nije pozitivna. Nadalje, razlikuje se citoplazmatska obojenost neurona i astrocita, dok se u neuronima vidi granulirana pozitivnost, astrociti su zagasito zelene boje i signal je ujednačen, odnosno nema granulacije kakva je opisana u neuronima. Stanice podrijetlom iz ovog soja potpuno su se diferencirale sa sedam dana, a nakon četrnaest dana dosežu svoj maksimalni diferencijacijski potencijal. Drugim riječima, stanice nakon 14. dana postupno počinju propadati te se povećava broj mrtvih stanica u ovakvom načinu uzgoja. Stanice pokazuju kolokalizaciju sa svim neuronskim kao i biljezima glije.

Thy1-YFP stanice su se također potpuno diferencirale već sa sedam dana te su kao i GFP-LUC stanice dosegnule svoj maksimum četrnaestog dana. Za razliku od GFP, za Thy1 nije potrebno protutijelo, ovaj biljeg je pozitivan u čitavoj stanici, uključujući perikarion s jezgrom, nastavcima, čak i spinama. Na temelju broja spina i položaja na nastavcima određuje se sinaptička aktivnost odnosno funkcionalna uloga neurona, međusobno, ali i sa stanicama glije (VUKŠIĆ i sur., 2008.). No međutim, za razliku od GFP, Thy1 je pozitivan samo u određenom broju neurona i to u svega 20% stanica. Ovaj broj je stalan i ne mijenja se tijekom diferencijacije stanica.

Iako je način uzgoja i diferencijacije ovih stanica prilagođen neuronima, i zapravo pogoduje razvoju neurona, ipak, u kulturi se tijekom sedmog dana nalazi 10% astrocita (GFAP pozitivnih stanica) dok je četrnaestog dana taj udio porastao na 20%. Razmjerno veliki postotak

astrociti može se objasniti na tri načina: astrociti se znatno sporije diferenciraju tijekom embrionalnog razvoja pa im i u *in vitro* uvjetima treba duže vremena da bi postigli svoju pozitivnost, drugi uzrok je taj što su stanice izolirane iz starijih zametaka i odmah nasadene te je u samom početku bilo više progenitora glije i konačno, odumiranjem neurona i „starenjem“ kulture aktiviraju se glija stanice koje imaju ulogu čistača i na taj način dolaze do izražaja. Iako ovi rezultati pokazuju značajno veći udio astrociti u odnosu na prethodna istraživanja na ovom soju napravljena na živčanim matičnim stanicama (ALIĆ i sur., 2016.; STOJANAC, 2016.), rezultati su svojevrsni nastavak istraživanja i nadogradnja postojećih rezultata. U istraživanju STOJANAC (2016.) opisan je izražaj GFAP-a već trećeg dana diferencijacije na razini izražaja gena, dok su imunocitokemijski prve stanice vidljive tek petog dana diferencijacije. Rezultat ovog istraživanja pokazuje da su i progenitori GFAP pozitivni, odnosno razina nukleinskih kiselina u stanici je dovoljna da bi se mogla očitati, ali da bi se stvorila bjelančevina vizualizirana s protutijelima potrebna su još dva dana diferencijacije. Iako je materijal iz kojeg su izolirani primarni neuroni stariji odnosno zreliji tri dana od prethodnih istraživanja, sedmog dana diferencijacije u kulturi se nalazi samo 5% više astrociti u odnosu na živčane matične stanice.

U ovom istraživanju zapažena su i opisana dva pomalo neočekivana nalaza. Stanice podrijetlom oba soja pozitivne su i kolokaliziraju 100% s neuronskim biljezima. Međutim, NeuN za kojeg iz dostupne literature znamo (KRZISCH i sur., 2015.) da boji jezgru stanice, kako mu i engleski naziv kaže (neuron nuclei) u ovih, zrelih stanica obojao je granulirano nastavke neurona. Ovaj nalaz posebno se ističe kod četrnaestog dana gdje njegov izražaj gotovo podsjeća na druge citoplazmatske biljege. Drugi biljeg je Doublecortin koji je obojao sve stanice, zrele i manje zrele. Za Doublecortin se također zna da boji samo mlade, novonastale, uglavnom bipolarne neurone (TANAKA i sur., 2004.). U ovim uvjetima uzgoja Doublecortin je pozitivan u potpuno zrelih stanicama i potpuno kolokalizira sa Thy1 i drugim biljezima neurona.



## 6. ZAKLJUČCI

Primarna kultura neurona podrijetlom od ova dva mišja soja po prvi put je napravljena te su na temelju analize dobivenih rezultata proizašli sljedeći zaključci:

1. Stanice podrijetlom iz oba mišja soja potpuno su diferencirane 7. dana diferencijacije dok su 14. dana dosegle svoj diferencijacijski maksimum
2. GFP-LUC je pozitivan u citoplazmi i razlikuje se pozitivnost neurona u odnosu na astrocite
3. Thy1-YFP je pozitivan u svega 20% stanica, ali je pozitivan u svim dijelovima stanice
4. U oba mišja soja nalazi se isti postotak astrocita: 10% (7. dan) odnosno 20% (14. dan)
5. NeuN je, osim u jezgri neurona, jako pozitivan u nastavcima
6. Doublecortin je pozitivan u potpuno zrelim neuronima

## 7. LITERATURA

ALIĆ, I. (2015): Morfološka analiza nastanka i diferencijacije neurona u staničnoj kulturi, tijekom razvoja zametka i nakon transplantacije u mozak miša korištenjem matičnih stanica dobivenih iz mišjeg soja THY1 YFP-16. Doktorski rad. Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska.

ALIĆ, I., N. KOSI, K. KAPURALIN, D. GORUP, S. GAJOVIĆ, R. POCHET, D. MITREČIĆ (2016): Neural stem cells from mouse strain Thy1 YFP are a valuable tool to monitor and evaluate neuronal differentiation and morphology. *Neuroscience letters* 634, 32–41.

BANNERMAN, P. G., A. HAHN, S. RAMIREZ, M. MORLEY, C. BÖNNEMANN, S. YU, G.-X. ZHANG, A. ROSTAMI, D. PLEASURE (2005): Motor neuron pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis: studies in THY1-YFP transgenic mice. *Brain* 128, 1877–1886.

CARTER, L. M. M. L. STARKEY, S. F. AKRIMI, M. DAVIES, S. B. MCMAHON. E. J. BRADBURY (2008). The Yellow Fluorescent Protein (YFP-H) Mouse Reveals Neuroprotection as a Novel Mechanism Underlying Chondroitinase ABC-Mediated Repair after Spinal Cord Injury. *J Neurosci* 28,14107–14120.

CHALFIE, M., Y. TU, G. EUSKIRCHEN, W. W. WARD, D. C. PRASHER (1994): Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science* 263, 802–805.

COMLEY, L. H., T. M. WISHART, B. BAXTER, L. M. MURRAY, A. NIMMO, D. THOMSON, S. H. PARSON, T. G. GILLINGWATER (2011): Induction of Cell Stress in Neurons from Transgenic Mice Expressing Yellow Fluorescent Protein: Implication for Neurodegeneration Research. *PLoS ONE* 6, 1–7.

CORTI, S., F. LOCATELLI, D. PAPADIMITRIOU, C. DONADONI, S. SALANI, R. DEL BO, S. STRAZZER, N. BRESOLIN, G. P. COMI (2006): Identification of a Primitive Brain-Derived Neuronal Stem Cell Population Based on Aldehyde Dehydrogenase Activity. *Stem Cells* 24, 975–985.

FENG, G., R. H. MELLOR, M. BERNSTEIN, C. KELLER-PECK, Q. T. NGUYEN, M. WALLACE, J. M. NERBONNE, J. W. LICHTMAN, J. R. SANES (2000): Imaging Neuronal Subsets in Transgenic Mice Expressing Multiple Spectral Variants of GFP. *Neuron* 28, 41–51

GAGE, F. H. (2000): Mammalian Neural Stem Cells. *Science* 287, 1433–1438.

HUANG, W. Y., J. ARAMBURU, P. S. DOUGLAS., S. IZUMO (2000): Transgenic expression of green fluorescence protein can cause dilated cardiomyopathy. *Nat Med* 6, 482–483.

JOSVAY, K., Z. WINTER, R. KATONA, L. PECZEL, A. MARTON, A. BUHALA, G. SZAKONYI, Z. OLAH, C. VIZLER (2014): Besides neuro-imaging, the Thy1-YFP mouse could serve for visualizing experimental tumours, inflammation and wound-healing. *Scientific Reports*, DOI: 10.1038/srep06776.

HYTTEL, P., F. SINOWATZ, M. VEJLSTED (2010): *Essentials of Domestic Animal Embryology*. Saunders Elsevier. Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto. 23-56.

KAPURALIN, K., M. ĆURLIN, D. MITREČIĆ, N. KOSI, C. SCHWARZER, G. GLAVAN, S. GAJOVIĆ (2014): STAM2, a member of the endosome-associated complex ESCRT-0 is highly expressed in neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience* 67, 104–115.

KELLER-PECK, C., M. K. WALSH, W. B. GAN, G. FENG, J. R. SANES, J. W. LICHTMAN (2001): Asynchronous Synapse Elimination in Neonatal Motor Units: Studies Using GFP Transgenic Mice. *Neuron* 31, 381–394.

KONIG, N., C. TROLLE, K. KAPURALIN, I. ADAMEYKO, D. MITREČIĆ, H. ALDSKOGIUS, P. J. SHORTLAND, E. N. KOZLOVA (2014): Murine neural crest stem cells and embryonic stem cell-derived neuron precursors survive and differentiate after transplantation in a model of dorsal root avulsion. *J Tissue Eng Regen Med*. doi: 10.1002/term.1893.

KOSI, N., I. ALIĆ, M. KOLAČEVIĆ, N. VRSALJKO, N. JOVANOVIĆ MILOŠEVIĆ, M. SOBOL, A. PHILIMONENKO, P. HOZAK, S. GAJOVIĆ, R. POCHE, D. MITREČIĆ (2015): Nop2 is expressed during proliferation of neural stem cells and in adult mouse and human brain. *Brain Res* 1597, 65–73.

KOSI, N. (2016): Diferencijacija i sinaptičko povezivanje živčanih matičnih stanica transplantiranih u mozak miša zahvaćen ishemijskom. Doktorski rad. Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska.

KRZISCH, M., S. G. TEMPRANA, L. A. MONGIAT, J. ARMIDA, J. SCHMUTZ, M. A. VIRTANEN, J. KOCHER-BRAISSANT, R. KRAFTSIK, L. VUTSKITS, K. K. CONNZELMANN, M. BERGAMI, F. H. GAGE, A. F. SCHNIDER, N. TONI (2015): Pre-existing astrocytes form functional perisynaptic processes on neurons generated in the adult hippocampus. *Brain Struct Funct* 220, 2027-2042.

MITREČIĆ, D., S. GAJOVIĆ, R. POCHE (2009): Toward the Treatments with Neural Stem Cells: Experiences from Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Anat Rec* 292, 1962–1967.

MITREČIĆ, D., C. NICAISE, S. GAJOVIĆ, R. POCHE (2010): Distribution, Differentiation, and Survival of Intravenously Administered Neural Stem Cells in a Rat Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cell Transplant* 19, 537–548.

MITREČIĆ, D. (2011): Current Advances in Intravascular Administration of Stem cells for Neurological Diseases: A New Dose of Rejuvenation Injected. *Rejuvenation Research* 5, 1–3.

MCGEADY, T. A., P. J. QUINN, E. S. PITZPATRICK, M. T. RYAN (2014): Veterinarska embriologija. Naklada Slap. Zagreb. 1-30.

PORRERO, C., P. RUBIO-GARRIDO, C. AVENDAÑO, F. CLASCÁ (2010): Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing Thy1-eYFP-H transgenic mice. *Brain research* 1345, 59–72.

STOJANAC, A. (2016): Analiza izražaja gena tijekom in vitro diferencijacije neurona. Studentski znanstveni rad. Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska.

TANAKA, T, F. F. SERNEO, H. C. TSENG, A.B. KULKARNI, L.H. TSAI, J. G. GLEESON (2004): Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration. *Neuron*, 41, 215–227.

VUKŠIĆ, M., D. DEL-TURCO, C. B. ORTH, G. J. BURBACH, G. FENG, C. M. SCHWARZACHER, W. STEPHAN. T. DELLER (2008): 3D-reconstruction and functional properties of GFP-positive and GFP-negative granule cells in the fascia dentata of the Thy1-GFP mouse. *Hippocampus* 18, 364–375.

WANG, Y., J. ZHANG, S. MORI, J. NATHANS (2006): Axonal Growth and Guidance Defects in Frizzled3 Knock-Out Mice: A Comparison of Diffusion Tensor Magnetic Resonance Imaging, Neurofilament Staining, and Genetically Directed Cell Labeling. *J Neurosci* 26, 355–364.

WATSON, C., G. PAXINOS, L. PUELLES (2012): *The Mouse Nervous System*. Elsevir. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo. 16-45.

## 8. SAŽETAK

### Diferencijacija stanica u primarnoj kulturi neurona

Glavni cilj ovoga istraživanja bio je napraviti primarnu kulturu neurona podrijetlom iz dva mišja soja kroz 7 i 14 dana, opisati uzorak izražaja bjelančevine te ih međusobno usporediti. Stanice mišjeg soja GFP-LUC tijekom sedmog dana su se diferencirale u potpunosti u zrele neurone i astrocite, od kojih je GFP pozitivan u 100% diferenciranih stanica, dok su biljezi neurona (MAP2,  $\beta$ 3-tubulin i NeuN) pozitivni u 90% diferenciranih stanica, a biljeg astrocita GFAP u samo 10%, odnosno tijekom četrnaestog dana su stanice razvijenije (veći broj i deblji nastavci), a biljezi neurona su pozitivni u 80% diferenciranih stanica, a biljeg astrocita u 20%. Stanice mišjeg soja Thy1-YFP tijekom sedmog dana su se također u potpunosti diferencirale u zrele neurone i astrocite, međutim ovdje je samo 20% neurona YFP pozitivno. Kao i kod GFP-LUC mišjeg soja, i ovdje je u kulturi prisutno 90% neurona i 10% astrocita, odnosno 80% neurona i 20% astrocita tijekom četrnaestog dana.

**Ključne riječi:** GFP-LUC, Thy1-YFP, matične stanice, diferencijacija, transgenični miš

## 9. SUMMARY

### Cell differentiation in primary neuronal culture

The main goal of this study was to differentiate a primary culture of neurons derived from two different mouse strains through 7 and 14 days, to describe the pattern of protein expression, and compare them with each other. Cells derived from GFP-LUC mouse strain during the 7<sup>th</sup> day were completely differentiated into mature neurons and astrocytes and they were 100% GFP positive; 90% were neurons and express neuronal markers (MAP2,  $\beta$ 3-tubulin and NeuN) while the 10% were astrocytes and express GFAP. On the 14<sup>th</sup> day of differentiation 80% express neuronal markers while 20% express GFAP. On the other hand, cell derived from Thy1-YFP mouse strain were also completely differentiated on the 7<sup>th</sup> day, but only 20% neurons express Thy1-YFP. Similar, like GFP-LUC cells on the 7<sup>th</sup> day we observed 90% neurons and 10% astrocytes in cell culture, while on the 14<sup>th</sup> day percentage of neurons decrease at 80% while percentage of astrocytes increase on 20%.

**Key words:** GFP-LUC, Thy1-YFP, stem cells, differentiation, transgenic mouse

## 10. ŽIVOTOPIS

### Osobni podaci:

- Datum rođenja: 19. prosinca 1991.
- Mjesto rođenja: Rijeka, Hrvatska
- Državljanstvo: hrvatsko
- Adresa: Julija Klovića 21c, 51260 Crikvenica
- Telefon: 099/ 191 19 78
- E-mail: [miric\\_mladen@yahoo.com](mailto:miric_mladen@yahoo.com)

### Školovanje:

- 1998. – 2006. - Osnovna škola „Vladimir Nazor“, Crikvenica
- 2006. – 2010. - Srednja škola „dr. Antun Barac“ - Opća gimnazija, Crikvenica
- 2010. – danas - Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

### Izvanfakultetske aktivnosti:

- Tijekom osnovnog i srednjoškolskog obrazovanja trenirao sam nogomet u „NK Crikvenica“
- Rekreativno se bavim nogometom
- Volontiram u Veterinarskoj ambulanti Crikvenica
- Volontiram u Veterinarskoj ambulanti Nera u Zagrebu