

Diferencijacija glija-stanica u in vitro uvjetima

Rebac, Robert

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:178:500578>

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

Robert Rebac

DIFERENCIJACIJA GLIJA-STANICA U *IN VITRO* UVJETIMA

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju

Predstojnica: Izv. prof. dr. sc. Martina Đuras

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

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

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Tajana Trbojević Vukičević
2. Prof. dr. sc. Zvonimir Kozarić
3. Izv. prof. dr. sc. Snježana Kužir
4. Izv. prof. dr. sc. Martina Đuras (zamjena)

Zahvaljujem se svojim mentorima dr. sc. Ivanu Aliću i izv. prof. dr. sc. Snježani Kužir za pomoć pri izradi diplomskog rada. Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima koji su mi bili velika podrška tijekom studiranja.

Robert Rebac

Popis korištenih kratica:

a2b5 (*engl.* cell surface ganglioside epitope), površinski gangliozidni stanični epitop
cc1 (*apc*) (*engl.* adenomatous polyposis coli (*apc*), clone cc1), biljeg oligodendrocita
dapi (4',6-diamidino-2-phenylindole), fluorescentna boja koja boji DNA (jezgre stanica)
gfap (*engl.* glial fibrillary acidic protein), kisela glijalna fibrilarna bjelančevina
mag (*engl.* myelin-associated glycoprotein), glikoproteina povezan s mijelinom
mbp (*engl.* myelin basic protein), bjelančevina mijelina
mog (*engl.* myelin oligodendrocyte glycoprotein), oligodendrocitni glikoprotein mijelina
ng2 (*engl.* neuron-glia antigen 2), neuron-glija antigen 2
nkx2.2 (*engl.* homeobox protein nkx2.2), biljeg pro-oligodendrocita
o1 (*engl.* oligodendrocyte marker 1), biljeg oligodendrocita 1
o4 (*engl.* oligodendrocyte marker 4), biljeg oligodendrocita 4
olig1 (*engl.* oligodendrocyte transcription factor 1), oligodendrocitni transkripcijski faktor 1
olig2 (*engl.* oligodendrocyte transcription factor 2), oligodendrocitni transkripcijski faktor 2
pdgfra (*engl.* platelet-derived growth factor receptor α), trombocitni čimbenik rasta α
plp (*engl.* proteolipid protein), proteolipidna bjelančevina
P0 (*engl.* postnatal), novorođeni miš
PBS (*engl.* phosphate buffered saline), puferirana otopina fosfatnih soli
PFA (*engl.* paraformaldehyde), paraformaldehid
sox2 [poznat i pod imenom: SRY (sex determining region Y)-box 2]

Popis priloga:

Tablica 1. Primarna protutijela korištena u ovom istraživanju.

Tablica 2. Sekundarna protutijela korištena u ovom istraživanju.

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

Slika 2. Diferencijacija glija-stanica i izražaj biljega specifičnih za pojedini razvojni stadij stanica tijekom razvoja. Preuzeto i prilagođeno od ZHANG (2001.).

Slika 3. Diferencijacija glija-stanica 1. (A), 3. (B), 5. (C) i 7. (D) dana *in vitro*. Tijekom sedam dana diferencijacije stanice su praćene i fotografirane na svjetlosnom mikroskopu (Evos, ThermoFisher). Mjerka = 100 μm .

Slika 4. Analiza diferencijacije glija-stanica 1., 3., 5. i 7. dana *in vitro*. Postotak glija-stanica tijekom diferencijacije (A). Izražaj olig2 pozitivnih stanica tijekom diferencijacije stanica (B); statistički signifikantna razlika prikazana je između svih vremenskih točaka pri čemu je $P < 0,001$ (***) između 1. i 3. dana, između 1. i 5. (7.) dana $P < 0,0001$ (****), dok je između 5. i 7. dana $P < 0,01$ (**). Izražaj o1 i o4 pozitivnih stanica tijekom diferencijacije stanica (C); tijekom prvih pet dana diferencijacije nema statistički signifikantne razlike (ns) između pojedinih točaka dok je razlika vidljiva između 1. i 7. dana, $P < 0,01$. Izražaj mbp pozitivnih stanica tijekom diferencijacije stanica (D); prikazana je statistički signifikantna razlika između 5. i 7. dana diferencijacije $P < 0,05$ (*). Izražaj plp pozitivnih stanica tijekom diferencijacije stanica (E); prikazana je statistički signifikantna razlika između 5. i 7. dana diferencijacije $P < 0,01$. Izražaj gfap pozitivnih stanica tijekom diferencijacije stanica (F) je konstantan i ne pokazuje statistički signifikantnu razliku između pojedinih vremenskih točka diferencijacije.

Slika 5. Imunocitokemija glija-stanica 1. dana diferencijacije *in vitro*. Tijekom prvog dana diferencijacije 99% stanica je olig2 pozitivno (B i F), dok neke od njih izražavaju i sox2 (A) te kolokaliziraju različitim intenzitetom (žuto). Svega 10% stanica je gfap pozitivno, a sve gfap pozitivne stanice izražavaju i olig2. Mjerka = 20 μm .

Slika 6. Imunocitokemija glija-stanica 1. dana diferencijacije *in vitro*. Tijekom prvog dana diferencijacije stanice su i nestin (A) pozitivne (biljeg matičnih stanica), ali su započele izražavati i biljege pro-oligodendrocita (o4) (C) i oligodendrocita (o1) (B). Mjerka = 20 μm .

Slika 7. Imunocitokemija glija-stanica 3. dana diferencijacije *in vitro*. Tijekom trećeg dana diferencijacije 86 \pm 3% stanica je olig2 pozitivno (B), 88 \pm 2% stanica je o4 (F) i o1 (J) pozitivno dok je 10 \pm 2% stanica gfap pozitivno (A, E i I). Na slici L vidi se potpuna kolokalizacija (žuto) između gfap i o1 pozitivnih stanica. Mjerka = 20 μm .

Slika 8. Imunocitokemija glija-stanica 5. dana diferencijacije *in vitro*. Tijekom petog dana diferencijacije 86 \pm 2% stanica je o4 (B) i o1 (F) pozitivno, svega 10 \pm 2% stanica je mbp (A, E i I) pozitivno dok je 79 \pm 2% stanica plp (J) pozitivno. Sve mbp pozitivne stanice kolokaliziraju s o4 (D), o1 (H) i plp (L). Svega 12% mijelinirajućih stanica je pozitivno na oba biljega mijelinirajućih oligodendrocita (mbp i plp, H). Mjerka = 20 μm .

Slika 9. Imunocitokemija glija-stanica 7. dana diferencijacije *in vitro*. Tijekom sedmog dana diferencijacije 82 \pm 3% stanica je o4 (B) i o1 (F) pozitivno, svega 13 \pm 2% stanica je mbp (A, E i I) pozitivno dok je 84 \pm 3% stanica plp (J) pozitivno. Na stopljenoj slici (D) vidi se kako sitnija, mbp (zelena) pozitivna stanica mijelinira veću, o4 (crvenu) pozitivnu stanicu. Mjerka = 20 μm .

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA..... | 4 |
| 3. MATERIJALI I METODE..... | 7 |
| 3.1. Životinje..... | 7 |
| 3.2. Izolacija progenitora oligodendrocita..... | 7 |
| 3.3. Priprema podloga za diferencijaciju stanica..... | 8 |
| 3.4. Nasadivanje, diferencijacija i fiksacija stanica..... | 8 |
| 3.5. Imunocitokemija..... | 9 |
| 3.6. Prebrojavanje stanica..... | 10 |
| 4. REZULTATI..... | 11 |
| 4.1. Diferencijacija glija-stanica..... | 11 |
| 5. RASPRAVA..... | 20 |
| 6. ZAKLJUČCI..... | 23 |
| 7. POPIS LITERATURE..... | 24 |
| 8. SAŽETAK..... | 28 |
| 9. SUMMARY..... | 29 |
| 10. ŽIVOTOPIS..... | 30 |

1. UVOD

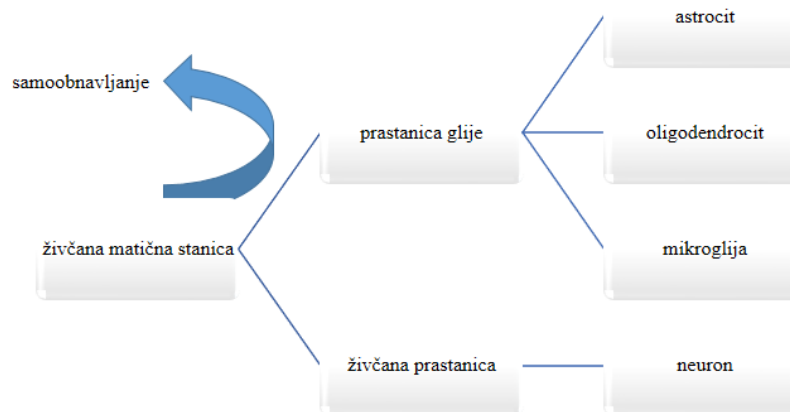
U posljednjih dvadesetak godina, razvojem tehnologije matičnih stanica, dolazi do intenzivnog porasta istraživanja u području neuroznanosti, posebice na pronalaženju novih oblika terapije. Produljenjem životnog vijeka, sve više ljudi obolijeva od različitih oblika bolesti živčanog sustava, a za većinu bolesti još uvijek nema odgovarajuće terapije. Budući da su prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije troškovi liječenja i najčešće doživotna skrb o pacijentima enormno veliki, ulažu se velika sredstva za pronalaženje novih oblika liječenja. Poseban interes znanstvene zajednice pobuđuju istraživanja na matičnim stanicama, odnosno induciranim pluripotentnim stanicama koje potječu od samog pacijenta i na taj način smanjuju imunosti odgovor organizma. Iako su ovakva istraživanja vrlo popularna i u velikom interesu javnosti, potrebno je napraviti veliki broj bazičnih istraživanja u staničnoj kulturi, potom na animalnim modelima da bi se u konačnici krenulo prema kliničkim istraživanjima i eventualnoj terapiji čovjeka. Upravo zbog toga, matične stanice u svim svojim oblicima, predstavljaju veliki izazov i veliku nadu u liječenju različitih neurodegenerativnih bolesti.

Iako su u literaturi opisane brojne podjele i sistematizacija matičnih stanica, većina autora navodi da su matične stanice (*engl.* stem cells) populacija stanica od kojih se u kontroliranim uvjetima mogu diferencirati različite vrste stanica. Morfološki, matične stanice su sitne, okruglaste stanice, veličine 10-20 μm . Zahvaljujući svojoj veličini, izražavanju brojnih čimbenika i neograničenoj sposobnosti dijeljenja, matične stanice se relativno jednostavno umnažaju (proliferiraju) i kasnije razvijaju (diferenciraju) prema određenim tipovima stanica. Osnovna, prema većini udžbenika iz embriologije, podjela dijeli matične stanice na:

- ✓ totipotentne stanice
- ✓ pluripotentne stanice
- ✓ multipotentne stanice

Zigota je jedini primjer totipotentne stanice budući da će se iz nje razviti apsolutno sve stanice budućeg organizma, uključujući i plodove ovojnice. Pluripotentne stanice su 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 imaju više ograničenu sposobnost diferencijacije i iz njih 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. Osim toga, opisane su i unipotentne stanice koje imaju još više

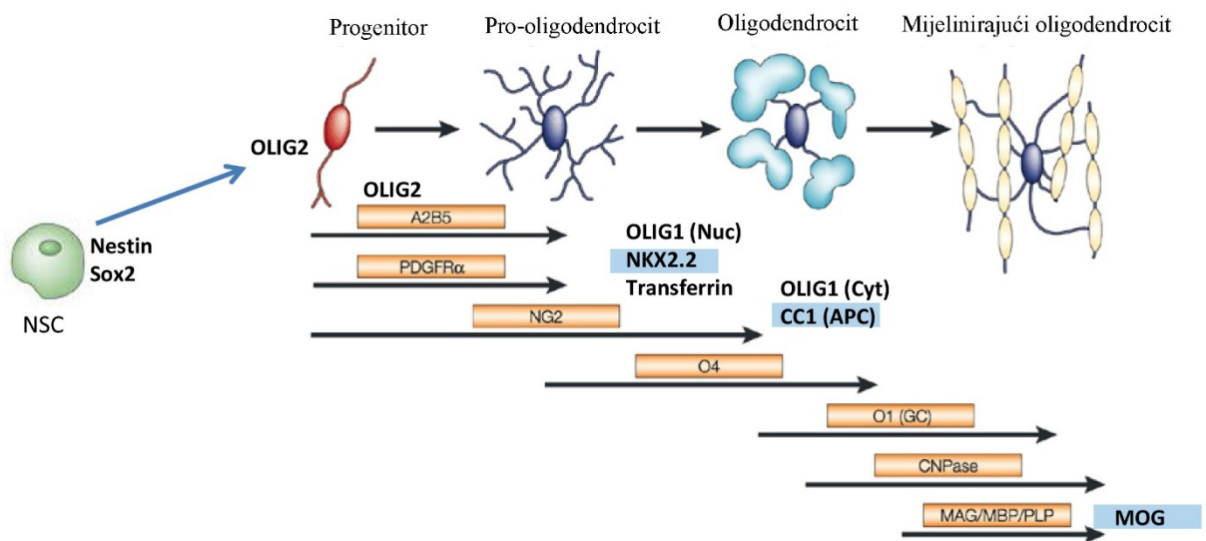
ograničenu sposobnost diferencijacije te će se od njih razviti određene vrste neurona (Slika 1) (HYTTEL i sur., 2010.; MCGEADY i sur., 2014.). Osim tijekom embrionalnog i fetalnog razdoblja, živčane matične stanice opisane su i u mozgu odraslog miša, ali znatno manje u mozgu čovjeka i to u subventrikularnoj zoni i u zrnatom sloju hipokampusa (GAGE, 2000.; MITREČIĆ i sur., 2009.; WATSON i sur., 2012.).



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

Budući da u velikom broju neurodegenerativnih bolesti ili stanja, kao što su primjerice mutipla skleroza, različite vrste demijelinacije ili reaktivna astroglia nakon moždanog udara, dolazi do odgovora glija-stanica, potrebno je dobro poznavanje razvojnih stadija stanica kao i izražaj pojedinih biljega tijekom njihovog sazrijevanja. Iako glija-stanice kreću od iste živčane matične stanice kao i neuroni, njihov put kao i izražaj pojedinih biljega znatno se razlikuje. Tijekom ranog razvoja, živčane matične stanice izražavaju nestin (citoplazma) i sox2 [SRX (sex determining region Y)-box 2] (jezgra). Onoga trenutka kada se stanice krenu diferencirati prema glija lozi, započinju izražavati olig2 (oligodendrocyte transcription factor), a2b5 (cell surface ganglioside epitope), pdgfra (platelet-derived growth factor receptor α) i ng2 (neuron-gial antigen 2) koji su biljezi **progenitora oligodendrocita**. U sljedećoj fazi razvoja: **pro-oligodendrocit**, stanice izražavaju o4 (oligodendrocyte marker 4), olig1 (oligodendrocyte

transcription factor 1) (jezgra), nkx2.2 (homeobox protein nkx2.2) i transferin, ali iz ranijeg razvojnog stadija zadržavaju izražaj ng2. U stadiju **oligodendrocita** izražavaju o4, o1 (oligodendrocyte marker 1), olig1 (citoplazma), cc1 (apc) (adenomatous polyposis coli (apc), clone cc1) (BIN i sur., 2016.). Konačno, potpuno diferencirane stanice odnosno **mijelinirajući oligodendrociti** izražavaju mag (myelin-associated glycoprotein), mbp (myelin basic protein), plp (proteolipid protein) i mog (myelin oligodendrocyte glycoprotein) (Slika 2).



Slika 2. Diferencijacija glija-stanica i izražaj biljega specifičnih za pojedini razvojni stadij stanica tijekom razvoja. Preuzeto i prilagođeno od ZHANG (2001.).

Glavni cilj ovoga istraživanja, bio je izolirati i kultivirati mišje progenitore oligodendrocita, diferencirati ih do potpuno zrelih, mijelinirajućih oligodendrocita te napraviti analizu izražaja biljega karakterističnih za pojedini razvojni stadij stanica.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

U literaturi je opisano nekoliko različitih protokola za diferencijaciju živčanih matičnih stanica, bilo da se radi o diferencijaciji neurona, astrocita ili u posljednjih nekoliko godina oligodendrocita. U posljednjih dvadesetak godina najviše istraživanja napravljeno je na diferencijaciji i različitim načinima uzgoja neurona, prvenstveno diferencijacija od mišjih živčanih matičnih stanica, ali isto tako i od ljudskih matičnih stanica. Detaljan opis uzgoja neurona od divljeg tipa mišjih stanica opisan je od grupe autora (KAPURALIN i sur., 2015.; KOSI i sur., 2015.; KOSI i sur., 2018.). Osim na divljem tipu miša, opisana je diferencijacija neurona koji su podrijetlom od različitih transgeničnih sojeva koji pod utjecajem promotora *Thy1* gena izražavaju zelenu fluorescentnu bjelančevinu (FENG i sur., 2000.; CORTI i sur., 2006.; ALIĆ, 2015.; ALIĆ, i sur.; 2016.; MITREČIĆ i sur., 2017.; STOJANAC i ALIĆ, 2017.) ili ubikvitarnog soja koji u svim stanicama izražava zelenu fluorescentnu bjelančevinu (MIRIĆ i sur., 2017.). U navedenim publikacijama, način uzgoja stanica, mediji i čimbenici rasta prilagođeni su isključivo neuronima te je preciznom analizom pokazano da se više od 95% stanica diferenciralo u zrele neurone, a svega 3-5% stanica se diferenciralo prema glija lozi, prvenstveno astrocitima. Ovakvim načinom uzgoja u staničnoj kulturi nisu zabilježeni oligodendrociti kao ni stanice mikroglije. Osim morfološki na temelju imunocitokemije, ovi rezultati potvrđeni su i na temelju izražaja bjelančevina (KOSI, 2016.) te na temelju izražaja gena (STOJANAC, 2016.).

Drugi način uzgoja odnosno diferencijacije stanica usmjeren je prema diferencijaciji astrocita. Način uzgoja astrocita u *in vitro* uvjetima vrlo je jednostavan jer se u klasični medij dodaje samo fetalni goveđi serum koji živčane matične stanice usmjerava prema astrocitima. Sami uzgoj astrocita traje znatno duže nego uzgoj neurona. Primjerice mišji neuroni potpuno su zreli već nakon petog dana diferencijacije, dok je astrocitima potrebno minimalno tjedan dana da bi postigli svoj maksimalan razvoj. Ovakav način diferencijacije važan je prvenstveno radi tzv. „kondicioniranja“ medija, odnosno pripreme medija u kojem će se kasnije uzgajati primarni neuroni, budući da astrociti u medij izlučuju tvari koje su neophodne za normalan rast i diferencijaciju primarnih neurona (KAPURALIN i sur., 2015.). Usmjeravanje mišjih stanica prema astrocitima opisano je u ko-kulturama s ljudskim matičnim stanicama sluznice usne šupljine (*engl.* human oral mucosa stem cells) (ALAJBEG i sur., 2018.).

Treći način uzgoja stanica je usmjeren prema diferencijaciji oligodendrocita koji je znatno kompliciraniji nego u prethodna dva protokola, a detaljno je opisan u poglavlju materijali i metode (CHEN i sur., 2007.). Prema navedenom protokolu stanice su nakon tjedan dana diferencijacije a2b5 i o4 pozitivne, ali su o1 i mbp negativne, što upućuje na diferencijaciju prema oligodendrocitima, ali još uvijek nisu potpuno zreli, mijelinirajući oligodendrociti.

Osim istraživanja *in vitro*, diferencijacija oligodendrocita opisana je u brojnim istraživanjima tijekom embrionalnog, fetalnog i postnatalnog razvoja u ljudi i miševa. Prema većini istraživanja, oligodendrociti jesu mijelinirajuće stanice središnjeg živčanog sustava koje prolaze složenu i vremenski vrlo preciznu proliferaciju, migraciju i diferencijaciju te u konačnici stvaraju mijelinske ovojnice oko aksona. Upravo zbog svog kompliciranog procesa diferencijacije, jedinstvenog metabolizma i fizioloških procesa, oligodendrociti se smatraju najosjetljivijim stanicama središnjeg živčanog sustava (BRADL i LASSMANN, 2010.; YAMAZAKI i sur., 2017.). Na temelju izražaja mRNA, preteče oligodendrocitne loze u miša pojavljuju se u ograničenom ventralnom dijelu diencefalona tijekom 9,5. dana embrionalnog razvoja odakle migriraju i naseljavaju različite dijelove središnjeg živčanog sustava (TIMSIT i sur., 1995.). Za razliku od miša u kojega mijelinacija započinje u postnatalnom razdoblju, u čovjeka mijelinacija započinje u prenatalnom razdoblju i to već sredinom gestacije. Vrlo rano, već u razdoblju između 17. i 23. gestacijskog tjedna, rani progenitori oligodendrocita prisutni su u subventrikularnoj zoni. Subpopulacija ranih progenitora oligodendrocita u telencefalonu potječe iz ganglijske eminencije (RAKIC i ZECEVIC, 2003.). Prvi mijelinirani aksoni opisani su u diencefalonu, ali ne i u telencefalonu (JAKOVCEVSKI i ZECEVIC, 2005a.; JAKOVCEVSKI i sur., 2009.). Imunohistokemijski je pokazano da rani progenitori oligodendrocita i progenitori radijalne glije izražavaju olig1, dok se olig2 nalazi u zrelijim oblicima stanica kao i u subpopulaciji progenitora neurona. Na temelju izražaja olig1 i olig2, autori zaključuju da su ova dva transkripcijska čimbenika važna ne samo u diferencijaciji oligodendrocita nego da imaju ulogu u sazrijevanju i usmjeravanju živčanih stanica (JAKOVCEVSKI i ZECEVIC, 2005b.).

Osim tijekom fiziološkog, embrionalnog, fetalnog ili postnatalnog razdoblja, važnost glija-stanica, prvenstveno astrocita, opisana je nakon izazivanja patoloških stanja u središnjem živčanom sustavu miša i štakora. KOSI i sur. (2018.) opisuju važnost reaktivne astroglioze nakon izazivanja moždanog udara u miša gdje glija-stanice tvore jaku demarkaciju između

zdravog i oštećenog tkiva. Diferencijacija transplantiranih stanica prema glija lozi opisana je i nakon avulzije spinalnog ganglija u štakora (KONIG i sur., 2017.). Isto tako, transplantirane stanice štakora, korištene za intravaskularnu transplantaciju na modelu amiotrofične lateroskleroze, prošle su kroz krvno-moždanu barijeru i ugradile se u mozak domaćina te diferencirale prema neuronskoj, ali i prema glija lozi (MITREČIĆ i sur., 2010.; MITREČIĆ, 2011.). WILHELMSSON i sur. (2006) opisuju razliku između ne-reaktivnih i reaktivnih astrocita, odnosno hipertrofiju reaktivnih astrocita nakon neurotraume, moždanog udara ili neurodegeneracije na mišjem modelu. Budući da kod multiple skleroze dolazi do propadanja mijelina, na animalnim modelima može se izazvati slično stanje, lokalno (lyzolecitinom) ili sustavno (cuprizonom). Ova istraživanja su od velike važnosti jer opisuju re-populaciju, odnosno re-mijelinaciju „novorođenim“ oligodendrocitima koji potječu iz različitih dijelova središnjeg i perifernog živčanog sustava (FANCY i sur., 2009.; FANCY i sur., 2011.).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Životinje

Za potrebe ovoga istraživanja korišteni su novorođeni (perinatalni) miševi (*engl.* perinatal day 0, P0) jednog legla. 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: 251-61-01/139-17-1) fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.2. Izolacija progenitora oligodendrocita

Izolacija i kultivacija stanica napravljena je prema Nature protokolu (CHEN i sur., 2007.). Za izolaciju progenitora oligodendrocita korišteno je jedno leglo odnosno šest novorođenih miševa. Novorođeni miševi, nakon pothlađivanja na ledu su dekapitirani te je materijal stavljen u petrijevu posudicu s hladnim HBSS (Gibco) puferom. Nakon dekapitacije svih miševa, promijenjen je pufer kako bi se uklonio višak krvi. Pod disekcijskim mikroskopom, medijano je prerezana koža i lubanja te je izoliran mozak. Nakon izolacije mozga uklonjeni su ostaci moždanih ovojnica i krvnih žilica kako bi se izoliralo „čisto“ živčano tkivo. Nakon odvajanja ovojnica, odstranjeno je moždano deblo i mali mozak te je za izolaciju stanica korišten samo korteks. Izolirani korteksi prebačeni su u čisti HBSS pufer te su sterilnim kirurškim škalicama usitnjeni na sitne komadiće ~ 1 mm³. Na usitnjeno tkivo dodano je 13,6 mL HBSS u koji je dodano 0,8 mL DNaze I (0,2 mg/mL) i 0,6 mL tripsina (0,25%) te je inkubirano 15 minuta u inkubatoru na 37°C. Nakon djelovanja enzima sadržaj je prebačen u 50 mL sterilnu tubu te je dodano 5 mL DMEM20S medija kako bi se spriječilo daljnje djelovanje enzima. Nakon toga stanice su centrifugirane na 100 g (~ 800 r.p.m.) tijekom 5 minuta. Nakon centrifugiranja, pipetom je uklonjen tekući sadržaj, a na stanice je dodano 20 mL DMEM20S medija te je nježno titurirano kako bi se stanice odvojile od ostataka tkiva. Tituracija je jako važan korak kako bismo dobili što više stanica, ali pri tome treba biti oprezan kako se stanice ne bi mehanički uništile. Kada je suspenzija stanica gotovo homogena potrebno je pričekati kako bi se ostatci tkiva istaložili, a suspenziju stanica potrebno je dva puta profiltrirati kroz 70 µL najlonski filter (*engl.* nylon cell strainer) kako bi se dobile stanice bez komadića tkiva ili ovojnica. Nakon toga stanice su nasadene u flaske koje su prethodno obložene s poly-D-lysinom te je u jednu flasku stavljeno 10 mL stanične suspenzije koja sadrži približno 10 000 000 stanica.

Stanice su potom uzgajane u inkubatoru pod temperaturom od 37°C i 5% CO₂. Narednih 10 dana stanicama je mijenjan medij svaka dva dana, a medij sadrži (DMEM, 4mM L-glutamin, 1mM sodium pyruvat, 20% FBS te Pen/Strep) (Gibco).

3.3. Priprema podloga za diferencijaciju stanica

Neposredno prije nasađivanja stanica potrebno je prirediti podloge za diferencijaciju stanica, odnosno stakla (*engl.* cover slips) promjera 12 mm. Budući da su kvalitetno pripremljene podloge jedan od glavnih čimbenika u diferencijaciji stanica, priprema mora biti besprijekorna, a za sam postupak potrebno je 4-5 dana. Prvi korak je stavljanje stakala u dušičnu kiselinu preko noći na shakeru. Nakon tretmana u kiselini, stakla je potrebno dobro isprati sterilnom vodom tijekom dva sata uz uzastopne izmjene vode. Kako bi se kiselina potpuno isprala, ispiranje se također radi na shakeru. Nakon ispiranja, stakla su ostavljena 24 sata u 70% alkoholu. Sljedeći dan, nakon izlijevanja alkohola stakla su sterilizirana na temperaturi od 250°C tijekom 12 sati. Nakon sterilizacije i hlađenja, stakla su spremna za nasađivanje stanica. U laminaru na stakla je stavljeno 250 µL Poly-D,L-ornithina tijekom 24 sata. Nakon oblaganja s poly-D,L-ornithinom stakla su isprana svježim medijem i spremna su za nasađivanje stanica.

3.4. Nasađivanje, diferencijacija i fiksacija stanica

Deset dana nakon uzgoja u flaskama stanice su proliferirale i u potpunosti prekrile dno flaske u nekoliko slojeva, pri čemu su na dnu astrociti dok se na površini nalaze progenitori oligodendrocita spremni za nasađivanje na podloge. Sljedeći korak je odvojiti progenitore oligodendrocita, koji se radi na shakeru pri velikoj brzini od 200 r.p.m., a postupak se izvodi u dvije faze. U prvoj fazi flaske su na shakeru sat vremena kako bi se odvojile stanice mikroglije koje se vrlo brzo odvajaju. Nakon sat vremena, izmjeni se medij te se flaske stave opet na shaker preko noći. Ključni korak u ovom postupku jest hermetičko zatvaranje flasksi čime se sprječava dotok kisika, jer se na taj način progenitori oligodendrocita lakše odvajaju od podloge. Nakon toga pokupi se suspenzija stanica, a u flaske se doda 10 mL svježeg medija te se postupak može ponoviti još jednom nakon deset dana. Suspenzija prikupljenih stanica stavi se u netretiranu petrijevu posudu tijekom 30-60 minuta u inkubator, kako bi se uklonili astrociti i mikroglije koji će se vrlo brzo prihvatiti za podlogu dok će progenitori oligodendrocita ostati u suspenziji. Dobivene stanice potrebno je još jednom profiltrirati kroz filter s veličinom pora od 20 µm. Filtriranu suspenziju stanica potom centrifugiramo 10 minuta na 100 g. Nakon centrifuge,

ukloni se tekućina, a istaložene stanice se resuspenziraju u maloj količini medija (~ 0,5 mL), izbroje se i nasade na stakla u gustoći od 1×10^4 po cm^2 . Stanice se potom diferenciraju u inkubatoru pod temperaturom od 37°C i 5% CO_2 . Medij za diferencijaciju mijenja se svaka dva dana, a sadrži 20 ng/mL PDGF-AA i 20 ng/mL bFGF. Stanice su fiksirane u vremenskim točkama 1., 3., 5. i 7. dan diferencijacije s 4% paraformaldehidom (PFA) tijekom 15 minuta te su isprane s PBS-om (*engl.* phosphate buffer saline) puferom i ostavljene na $+4^\circ\text{C}$ do bojanja.

3.5. Imunocitokemija

Nakon fiksacije u određenim vremenskim točkama, stanice pohranjene na $+4^\circ\text{C}$ isprane su tri puta po pet minuta s PBS-om, nakon čega je na njih nasloženo 500 μL otopine za permeabilizaciju stanične membrane i blokiranje nespecifičnog vezanja sekundarnog protutijela (0,2% triton X-100 (Sigma, T8787-100ML) u PBS-u + 3% kozjeg seruma). Prema uobičajenom protokolu, blokiranje nespecifičnog vezanja sekundarnog protutijela traje 60 minuta. Nakon blokiranja na stanice je dodano 85 μL otopine primarnog protutijela (0,2% triton X-100 u PBS-u + 1% kozjeg seruma + primarno protutijelo) i stanice su pohranjene na inkubaciju preko noći u hladnjaku na $+4^\circ\text{C}$. Primarna protutijela korištena u ovom istraživanju prikazana su u Tablici 1.

Sljedeći dan, nakon inkubacije primarnih protutijela, stanice su ponovno isprane tri puta po pet minuta s PBS-om, te je nakon ispiranja na stanice nasložena 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. Sekundarna protutijela inkubirana su u zamračenoj prostoriji na sobnoj temperaturi tijekom dva sata. Po završetku inkubacije stanice su ponovno isprane tri puta po pet minuta s PBS-om te je na njih nasložena fluorescentna boja (dapi) koja boji DNA odnosno jezgru svih stanica u koncentraciji 1:8000. Nakon deset minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, stanice su ponovno isprane s PBS-om te su poklopljene medijem za fluorescentno poklapanje (Dako Fluorescent Mounting Medium, S3023). Poklopljeni preparati pohranjeni su u hladnjaku na $+4^\circ\text{C}$ do analize na konfokalnom mikroskopu (Zeiss).

Tablica 1. Primarna protutijela korištena u ovom istraživanju.

| Protutijelo | Podrijetlo | Razrjeđenje | Proizvođač |
|--------------------|-------------------|--------------------|-----------------------------------|
| gfap | štakor | 1:1000 | ThermoFisher Scientific (13-0300) |
| mbp | štakor | 1:200 | abcam (ab7349) |
| nestin | miš | 1:200 | abcam (ab22035) |
| o1 | miš | 1:200 | eBioscience (14-6506-80) |
| o4 | miš | 1:200 | Sigma (O7139) |
| olig2 | miš | 1:200 | Millipore (MABN50) |
| plp | miš | 1:200 | Merck (MAB388) |
| sox2 | kunić | 1:200 | abcam (ab97959) |

Tablica 2. Sekundarna protutijela korištena u ovom istraživanju.

| Protutijelo | Razrjeđenje | Proizvođač |
|--|--------------------|-----------------------|
| Alexa Fluor 568 koza anti - štakor IgG (H+L) | 1:1000 | ThermoFisher (A11077) |
| Alexa Fluor 633 koza anti - miš IgM | 1:500 | ThermoFisher (A21046) |
| Alexa Fluor 568 koza anti - miš IgM | 1:1000 | ThermoFisher (A21043) |
| Alexa Fluor 488 magarac anti - kunić IgG (H+L) | 1:1000 | ThermoFisher (A21206) |
| Alexa Fluor 488 magarac anti - miš IgG (H+L) | 1:1000 | ThermoFisher (A21202) |

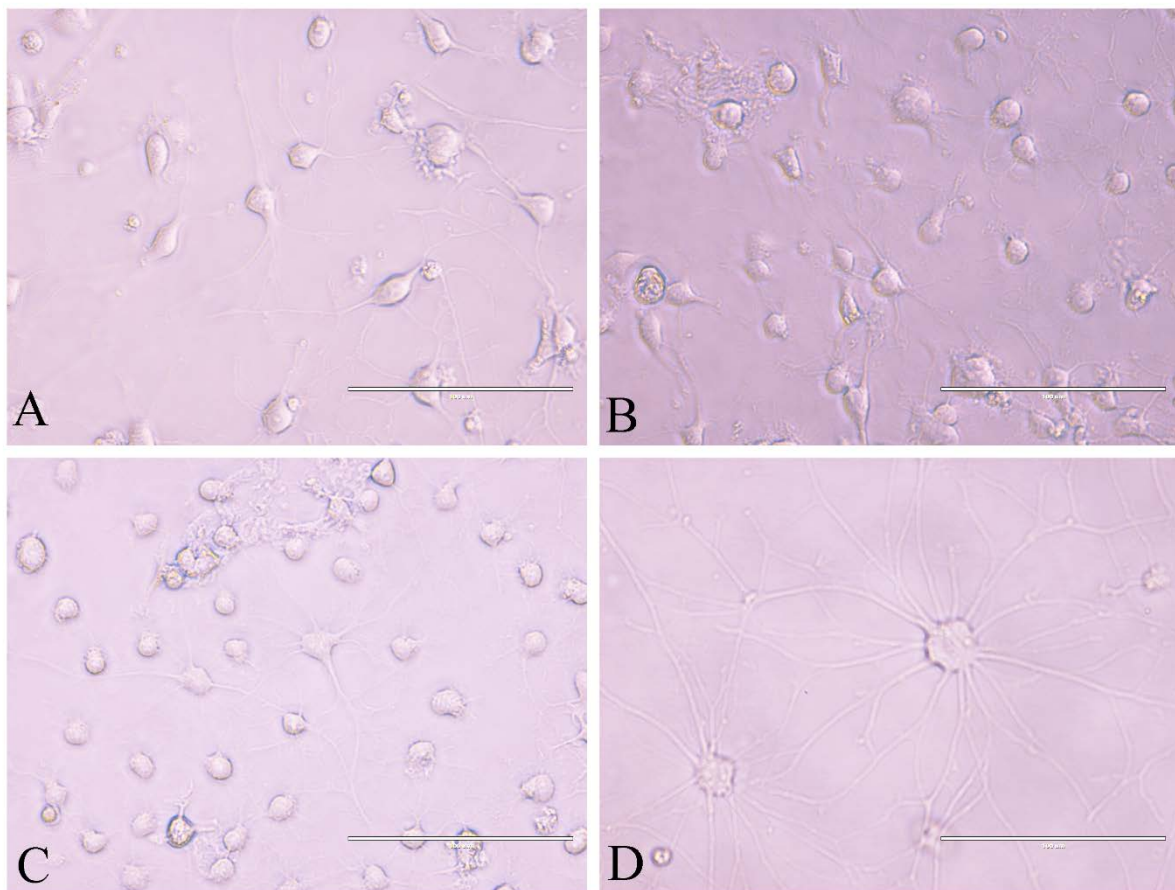
3.6. Prebrojavanje stanica

Stanice su prebrojane na deset reprezentativnih vidnih polja, po vremenskoj točki, izabranih korištenjem konfokalnog mikroskopa (Zeiss). Prebrojavanje je napravljeno na način da se odredi broj i razvojni stadij glija-stanica u pojedinoj vremenskoj točki. Stanice su prebrojane na temelju izražaja sljedećih biljega: progenitora oligodendrocita (olig2), pro-oligodendrocita (o4), oligodendrocita (o1), mijelinirajućih oligodendrocita (mbp i plp) te astrocita (gfap). Tri uzastopna prebrojavanja stanica napravila su dva potpuno neovisna istraživača, a rezultati prebrojavanja su se poklapali u 100% slučajeva. Nakon prebrojavanja izračunata je prosječna vrijednost broja stanica, standardna devijacija te standardna pogreška, a vrijednosti između pojedinih vremenskih točki uspoređene su studentskim t-testom. Statistička značajnost prikazana je pomoću (*) te se razlikuje ukoliko je: $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****).

4. REZULTATI

4.1. Diferencijacija glija-stanica

Tijekom sedam dana uzgoja *in vitro*, stanice, progenitori oligodendrocita, u potpunosti su se diferencirale od stanica koje izražavaju biljege matičnih stanica i progenitora oligodendrocita sve do potpuno zrelih, mijelinirajućih oligodendrocita. Diferencijacija glija-stanica 1., 3., 5. i 7. dana *in vitro* prikazana je na slici 3.



Slika 3. Diferencijacija glija-stanica 1. (A), 3. (B), 5. (C) i 7. (D) dana *in vitro*. Tijekom sedam dana diferencijacije stanice su praćene i fotografirane na svjetlosnom mikroskopu (Evos, ThermoFisher). Mjerka = 100 μm .

Prvog dana diferencijacije, odnosno 24 sata nakon nasađivanja na prethodno priređene podloge, stanice su započele s diferencijacijom. Stanice su nasađene u stadiju progenitornih stanica koje su okruglastog oblika i neposredno nakon nasađivanja pružile su jedan ili više nastavaka (Slika 3A) te izražavaju specifične biljege glija-stanica. Gotovo 99% stanica je olig2 pozitivno, za kojeg je poznato da je biljeg progenitora oligodendrocita (Slika 4A i 4B, Slika 5B i 4F). U tri uzastopna brojanja po deset vidnih polja vidi se da je $97\pm 3\%$ stanica olig2 pozitivno. Osim toga, stanice još uvijek, iako vrlo blijedo, izražavaju biljege matičnih stanica kao što su sox2 (Slika 5A) i nestin (Slika 6A). U istom razvojnem stadiju $88\pm 2\%$ stanica izražava biljege pro-oligodendrocita (o4) i oligodendrocita (o1) (Slika 4A i 4D, Slika 6B i 6C). Te stanice su i olig2 pozitivne, dok je svega 10% stanica gfap pozitivno (Slika 4A i 4C, Slika 5E). Iako stanice tijekom prvog dana izražavaju biljege nekoliko razvojnih stadija oligodendrocita, na temelju analize intenziteta imunocitokemije i same morfologije stanica jasno je vidljivo da je preko 90% stanica izrazito olig2 pozitivno, a vrlo blijedo, iako u velikom postotku, zadržavaju pozitivnost na biljege matičnih stanica kao i znatno razvijenijih stadija pro-oligodendrocita i oligodendrocita.

Trećeg dana diferencijacije stanice su znatno više diferencirane nego u prvoj vremenskoj točki. Pružile su brojne razgranate nastavke i poprimaju morfologiju oligodendrocita (Slika 3B). Tijekom trećeg dana diferencijacije $86\pm 3\%$ stanica je olig2 pozitivno (Slika 4A i 4B, Slika 7B). Stanice više ne izražavaju biljege matičnih stanica, dok je razina izražaja biljega o4 i o1 ista kao i prvog dana diferencijacije i iznosi $88\pm 2\%$ (Slika 4A i 4D, Slika 7F i 7J). Što se tiče biljega astrocita, stanje je slično kao i prvog dana diferencijacije i iznosi $10\pm 2\%$ pozitivnih stanica (Slika 4A i 4C, Slika 7A, 7E i 7I). Astrociti, odnosno gfap pozitivne stanice izražavaju u svojim jezgrama i olig2, ali isto tako kolokaliziraju s biljezima o4 i o1. Potpuna kolokalizacija gfap-a i o1 vidljiva je na slici 7L koja se očituje pojavom žute boje na stopljenoj slici. U ovom stadiju diferencijacije, kako je i očekivano, još uvijek nema niti jedna mbp ili plp pozitivna stanica (Slika 4A, 4E i 4F).

Petog dana diferencijacije stanice morfološki izgledaju kao potpuno diferencirani oligodendrociti (Slika 3C). Budući da su stanice gotovo potpuno diferencirane, udio izražaja pojedinih biljega znatno se promijenio u odnosu na prethodne dvije vremenske točke. Udio olig2 pozitivnih stanica smanjio se za 70% u odnosu na prvu vremensku točku i iznosi svega $11\pm 2\%$ stanica (Slika 4A i 4B). Zanimljivo da je udio pro-oligodendrocita i oligodendrocita ostaje gotovo na istoj razini tijekom cijelog razdoblja diferencijacije i u ovoj vremenskoj točki

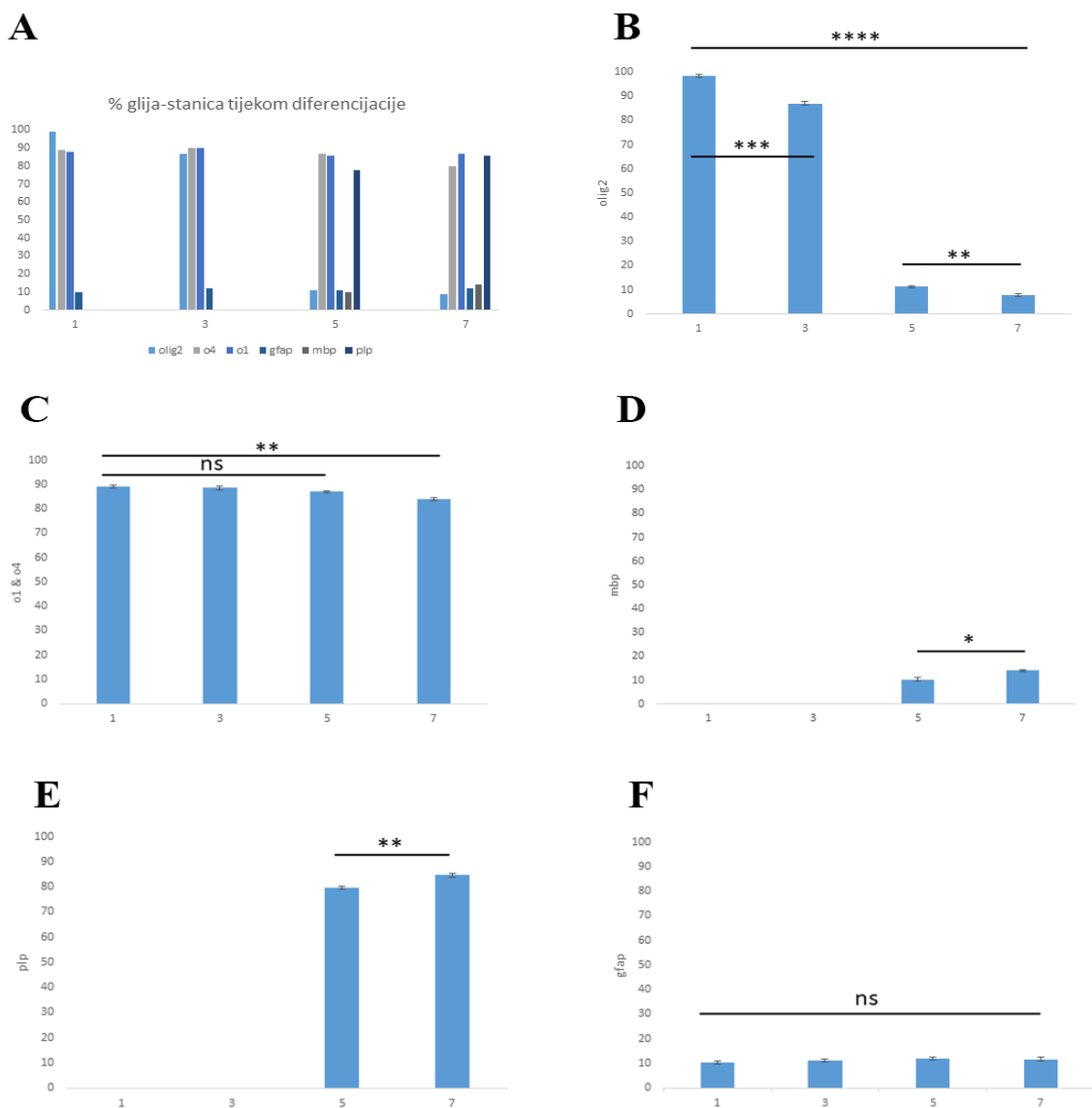
iznosi $86\pm 2\%$ (Slika 4A i 4D, Slika 8B i 8F). Vrlo slično se ponašaju i gfap pozitivne stanice te u ovoj vremenskoj točki je svega $11\pm 2\%$ stanica gfap pozitivno. Budući da stanice morfološki izgledaju kao potpuno zreli oligodendrociti, započele su izražavati biljege zrelih, odnosno mijelinirajućih oligodendrocita. Tako udio mbp pozitivnih stanica iznosi $10\pm 2\%$, dok je udio plp pozitivnih stanica znatno veći i iznosi $79\pm 2\%$ (Slika 4A, 4E i 4F, Slika 8L). Sve mbp i plp pozitivne stanice u potpunosti kolokaliziraju s o4 i o1 pozitivnim stanicama (Slika 8D i 8H). Međutim, kako je vidljivo i na grafičkom prikazu (Slika 4E i 4F), svega 12% mijelinirajućih oligodendrocita izražava mbp i plp odnosno kolokalizira.

Sedmog dana diferencijacije stanice su dosegnule maksimalan razvoj u diferencijaciji glija-stanica (Slika 3D). Udio olig2 pozitivnih stanica znatno se smanjio i iznosi svega $8\pm 2\%$ stanica (Slika 4A i 4B). Udio o4 i o1 pozitivnih stanica neznatno se smanjio, ali i dalje iznosi $82\pm 3\%$ stanica (Slika 4A i 4D), za razliku od gfap pozitivnih stanica čiji je udio malo porastao i iznosi $11\pm 3\%$ stanica (Slika 4A i 4C). Gledajući sveukupno, iako je zabilježen mali pad odnosno blagi porast u izražaju ova tri biljega tijekom razdoblja diferencijacije, izražaj ovih biljega je konstantan (Slika 4A, 4C i 4D). Postotak mbp pozitivnih stanica porastao je na $13\pm 2\%$, dok je postotak plp pozitivnih stanica porastao na $84\pm 3\%$ (Slika 4A, 4E i 4F). Na slici 9, osim ranije opisane kolokalizacije između mbp-a i biljega o4, o1 te plp, u kombinaciji mbp + o4 (Slika 9D), jasno se vidi gdje mbp pozitivna stanica mijelinira, odnosno omotava se oko o4 pozitivne stanice.

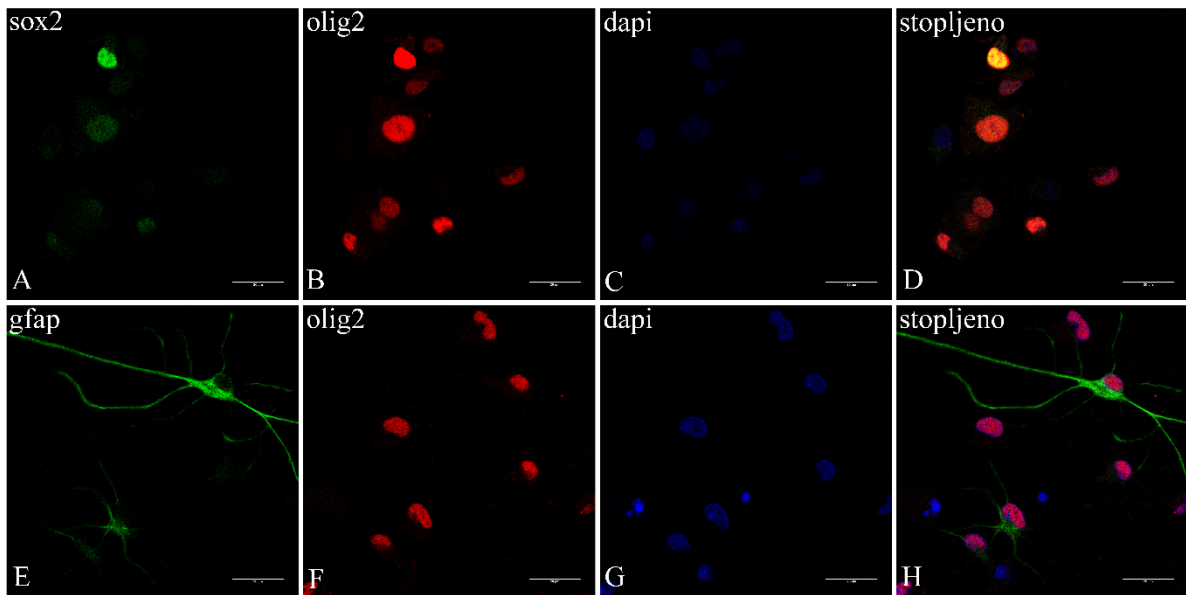
Osim diferencijacije stanica, izražaja specifičnih biljega koji se pojavljuju tijekom razvoja stanica vidljiva je i razlika u intenzitetu svakog pojedinog biljega. Od biljega korištenih u ovom istraživanju jedino su sox2 i olig2 nuklearni biljezi dok su ostali biljezi citoplazmatski. Tijekom prvog dana razvoja jasno je vidljiv vrlo slab izražaj nestina, gotovo na granici detektibilnosti (Slika 6). Nasuprot tome, biljezi pro-oligodendrocita (o4) i oligodendrocita (o1) pojavljuju se od prvog dana diferencijacije i zadržavaju se do kraja u gotovo jednakom intenzitetu. Zanimljivo je da oba biljega, osim ujednačene citoplazmatske pozitivnosti, imaju i snažnu, također citoplazmatsku, vezikularnu pozitivnost koja se povećava tijekom diferencijacije posebno u o1 pozitivnih stanica (Slike 6-9).

U ovom istraživanju, osim po vremenskim točkama napravljena je i analiza izražaja svakog pojedinog biljega tijekom sedam dana diferencijacije stanica. Prema tome tijekom diferencijacije olig2 pozitivnih stanica vidljiva je statistički signifikantna razlika između svih

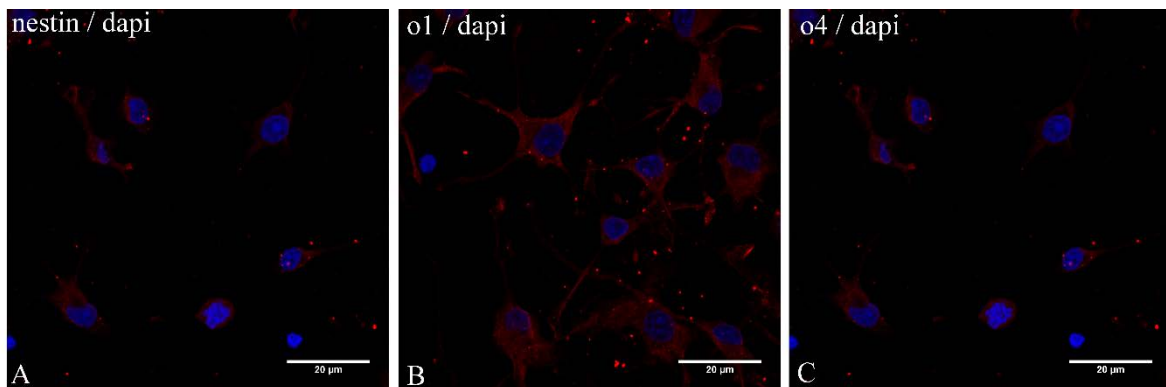
vremenskih točaka pri čemu je $P < 0,001$ (***) između 1. i 3. dana, između 1. i 5. (7.) dana je $P < 0,0001$ (****), dok je između 5. i 7. dana $P < 0,01$ (**) (Slika 4B). Nasuprot tome, tijekom diferencijacije o1 i o4 pozitivnih stanica tijekom prvih pet dana nema statistički signifikantne razlike između pojedinih točaka dok je razlika vidljiva jedino između 1. i 7. dana $P < 0,01$ (**) (Slika 4C). Iako se mbp i plp pozitivne stanice pojavljuju tek petog dana diferencijacije, između ove dvije vremenske točke vidljiva je statistički signifikantna razlika pri čemu je za mbp pozitivne stanice $P < 0,05$ (*) (Slika 4D), dok je za plp pozitivne stanice $P < 0,01$ (Slika 4E). Jedini biljeg koji je konstantan i kod kojega nema statistički signifikantne razlike između pojedinih vremenskih točaka jest gfap (Slika 4F).



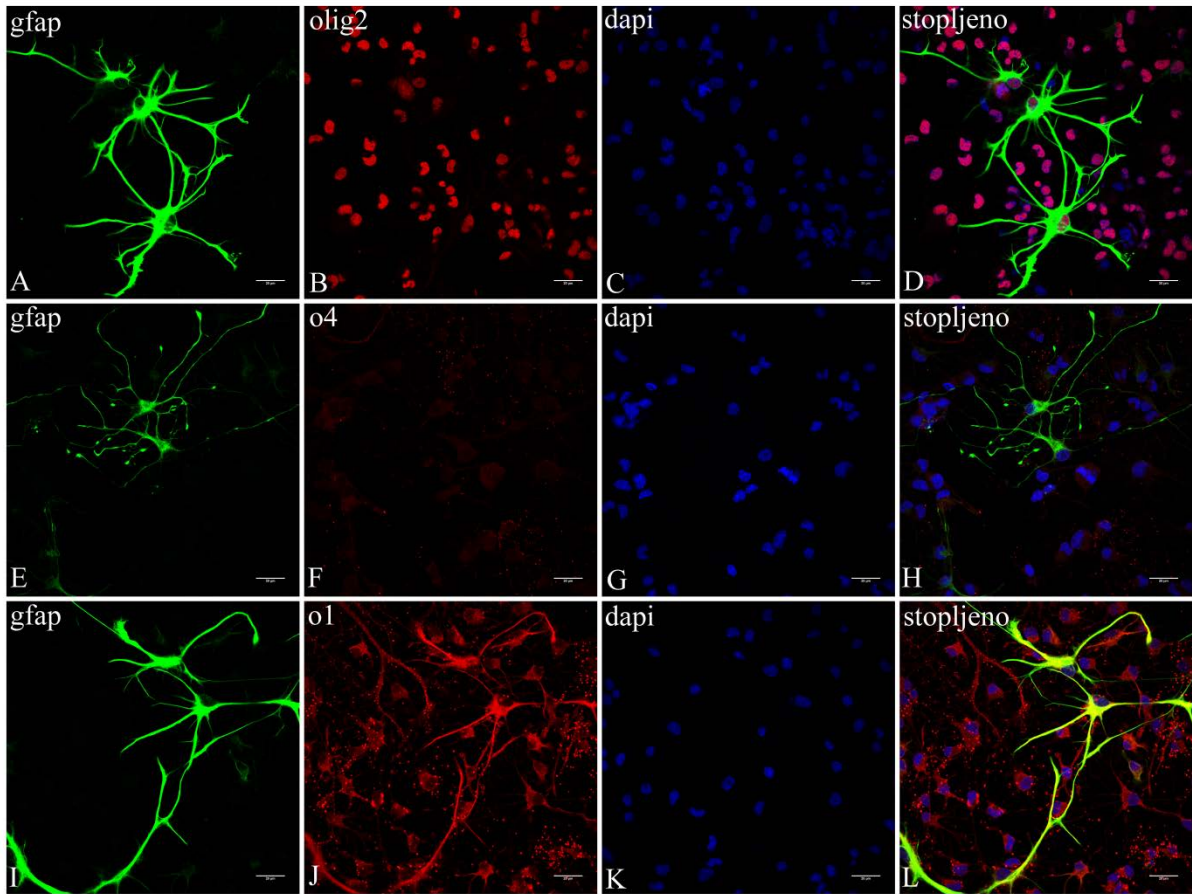
Slika 4. Analiza diferencijacije glija-stanica 1., 3., 5. i 7. dana *in vitro*. Postotak glija-stanica tijekom diferencijacije (A). Izražaj olig2 pozitivnih stanica tijekom diferencijacije stanica (B); statistički signifikantna razlika prikazana je između svih vremenskih točaka pri čemu je $P < 0,001$ (***) između 1. i 3. dana, između 1. i 5. (7.) dana $P < 0,0001$ (****), dok je između 5. i 7. dana $P < 0,01$ (**). Izražaj o1 i o4 pozitivnih stanica tijekom diferencijacije stanica (C); tijekom prvih pet dana diferencijacije nema statistički signifikantne razlike (ns) između pojedinih točaka dok je razlika vidljiva između 1. i 7. dana $P < 0,01$. Izražaj mbp pozitivnih stanica tijekom diferencijacije stanica (D); prikazana je statistički signifikantna razlika između 5. i 7. dana diferencijacije $P < 0,05$ (*). Izražaj plp pozitivnih stanica tijekom diferencijacije stanica (E); prikazana je statistički signifikantna razlika između 5. i 7. dana diferencijacije $P < 0,01$. Izražaj gfap pozitivnih stanica tijekom diferencijacije stanica (F) je konstantan i ne pokazuje statistički signifikantnu razliku između pojedinih vremenskih točaka diferencijacije.



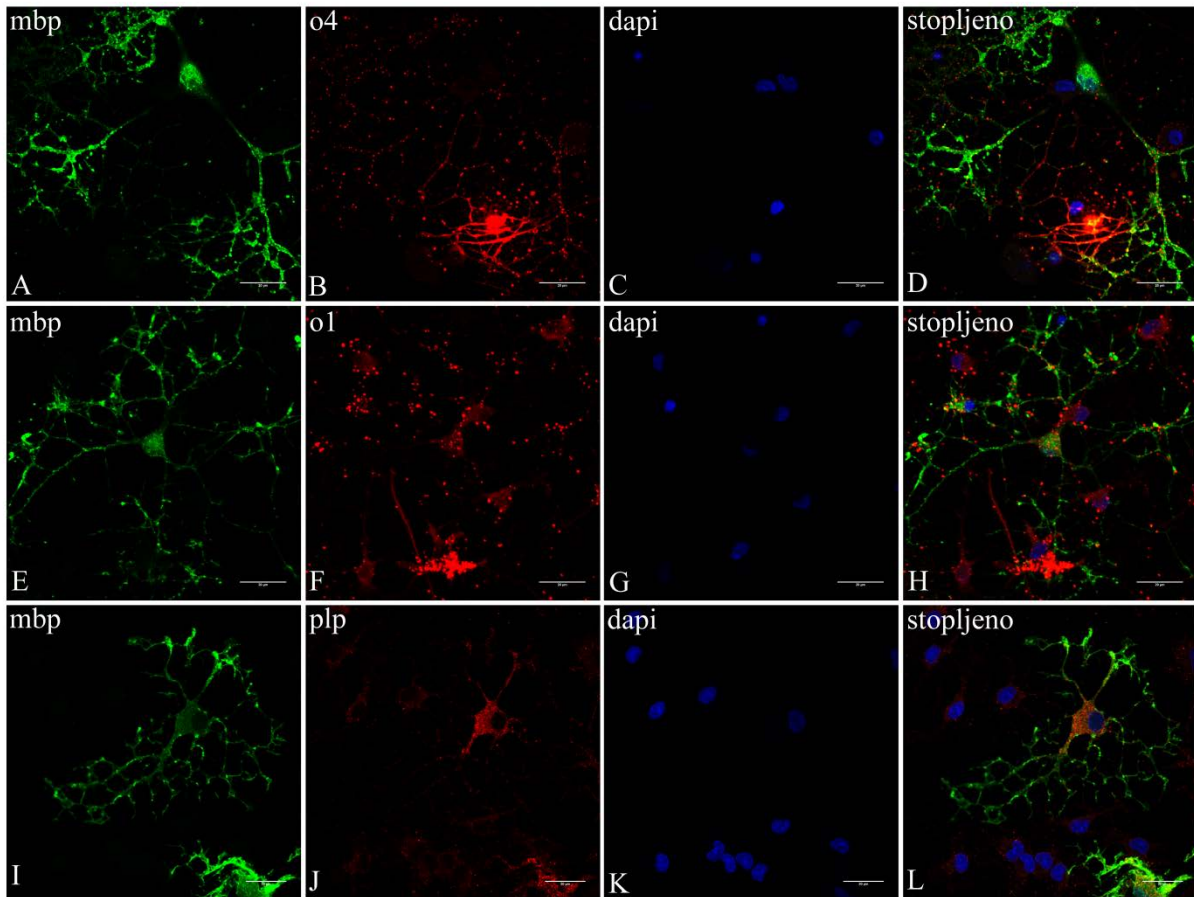
Slika 5. Imunocitokemija glija-stanica 1. dana diferencijacije *in vitro*. Tijekom prvog dana diferencijacije 99% stanica je olig2 pozitivno (B i F), dok neke od njih izražavaju i sox2 (A) te kolokaliziraju različitim intenzitetom (žuto). Svega 10% stanica je gfap pozitivno, a sve gfap pozitivne stanice izražavaju i olig2. Mjerka = 20 μ m.



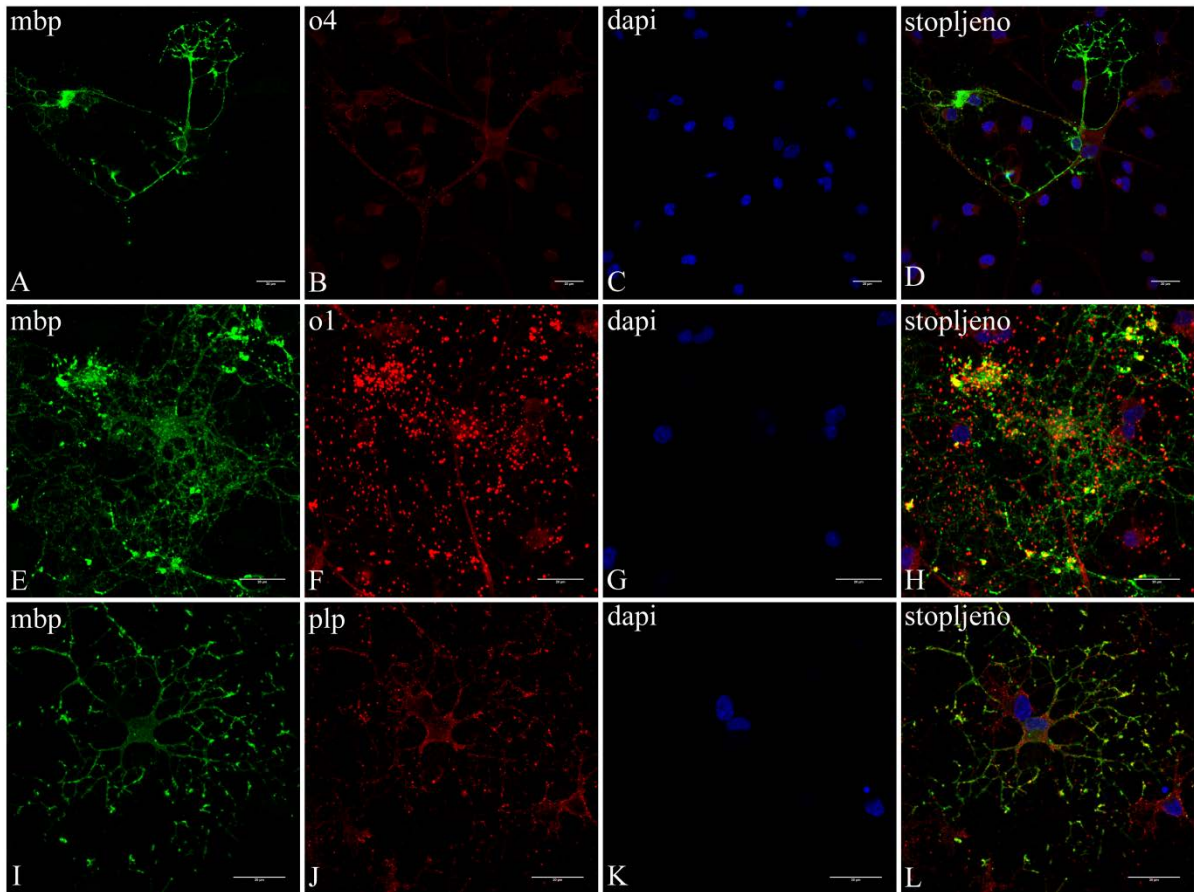
Slika 6. Imunocitokemija glija-stanica 1. dana diferencijacije *in vitro*. Tijekom prvog dana diferencijacije stanice su i nestin (A) pozitivne (biljeg matičnih stanica), ali su započele izražavati i biljege pro-oligodendrocita (o4) (C) i oligodendrocita (o1) (B). Mjerka = 20 μ m.



Slika 7. Imunocitokemija glija-stanica 3. dana diferencijacije *in vitro*. Tijekom trećeg dana diferencijacije $86\pm 3\%$ stanica je olig2 pozitivno (B), $88\pm 2\%$ stanica je o4 (F) i o1 (J) pozitivno dok je $10\pm 2\%$ stanica gfap pozitivno (A, E i I). Na slici L vidi se potpuna kolokalizacija (žuto) između gfap i o1 pozitivnih stanica. Mjerka = 20 μm .



Slika 8. Imunocitokemija glija-stanica 5. dana diferencijacije *in vitro*. Tijekom petog dana diferencijacije $86\pm 2\%$ stanica je o4 (B) i o1 (F) pozitivno, svega $10\pm 2\%$ stanica je mbp (A, E i I) pozitivno dok je $79\pm 2\%$ stanica plp (J) pozitivno. Sve mbp pozitivne stanice kolokaliziraju s o4 (D), o1 (H) i plp (L). Svega 12% mijelinirajućih stanica je pozitivno na oba biljega mijelinirajućih oligodendrocita (mbp i plp, H). Mjerka = 20 μm .



Slika 9. Imunocitokemija glija-stanica 7. dana diferencijacije *in vitro*. Tijekom sedmog dana diferencijacije $82\pm 3\%$ stanica je o4 (B) i o1 (F) pozitivno, svega $13\pm 2\%$ stanica je mbp (A, E i I) pozitivno dok je $84\pm 3\%$ stanica plp (J) pozitivno. Na stopljenoj slici (D) vidi se kako sitnija, mbp (zelena) pozitivna stanica mijelinira veću, o4 (crvenu) pozitivnu stanicu. Mjerka = $20\ \mu\text{m}$.

5. RASPRAVA

Tijekom ovog istraživanja, po prvi puta u Laboratoriju za matične stanice napravljena je izolacija progenitora oligodendrocita i njihova diferencijacija do zrelih, mijelinirajućih oligodendrocita. Sami postupak izolacije i diferencijacije stanica napravljen je prema Nature protokolu (CHEN i sur., 2007.). Prema navedenom protokolu, progenitore oligodendrocita moguće je izolirati iz novorođenih štakora ili miševa, ali isto tako i iz embrija miša. Ukoliko se izolacija radi iz embrija miša, onda je postupak izolacije stanica, ali i uzgoj do neurosfera gotovo identičan onome opisanom u izolaciji živčanih matičnih stanica za uzgoj neurona (KOSI i sur., 2015.; ALIĆ i sur., 2016.; KOSI i sur., 2018.). U ovom istraživanju izolacija progenitora oligodendrocita napravljena je iz novorođenih miševa. Tijekom analize rezultata zabilježeno je nekoliko vrlo bitnih činjenica po čemu se ovo istraživanje razlikuje od originalnog protokola (CHEN i sur., 2007.). Prema originalnom protokolu stanice nakon tjedan dana diferencijacije *in vitro* izražavaju a2b5 i o4, ali ne o1 i mbp. Iz ovoga se jasno vidi da stanice u originalnom istraživanju izražavaju biljege progenitora oligodendrocita (a2b5) i pro-oligodendrocita (o4), ali ne i oligodendrocita (o1) ili mijelinirajućih oligodendrocita (mbp). U ovom istraživanju kao biljeg progenitora oligodendrocita korišten je olig2 čiji se izražaj podudara s izražajem a2b5 (ZHANG, 2001.). Rezultati ovoga istraživanja pokazuju da je prvog dana diferencijacije preko 90% stanica olig2 pozitivno, a sazrijevanjem stanica razina olig2 se znatno smanjuje, da bi sedmog dana diferencijacije iznosila svega 8%. Druga vrlo bitna razlika u odnosu na originalni protokol jest izražaj o4 i o1. Kako je vidljivo u rezultatima, stanice su pozitivne na oba biljega tijekom čitavog razdoblja diferencijacije i to u vrlo visokom postotku od gotovo 90%. Zanimljivo je da prema CHEN i sur. (2007.) stanice čak niti nakon sedam dana uzgoja nisu o1 pozitivne, odnosno nisu dosegnule stadij oligodendrocita. S druge strane ZHANG (2001.) navodi da se izražaj o4 dobrim dijelom preklapa s izražajem biljega progenitora oligodendrocita, kao što su olig2 i a2b5, ali isto tako i u istoj mjeri izražaj o4 se preklapa s izražajem o1, odnosno zrelim oligodendrocitima. Rezultati ovog istraživanja u potpunosti se podudaraju s istraživanjem ZHANG-a (2001.) jer oba biljega, o4 i o1, pozitivni su vrlo rano i kolokaliziraju s olig2 tijekom prva tri dana diferencijacije. Isto tako sva tri biljega kolokaliziraju s gfapom koji je tipični biljeg astrocita, iako je ovim načinom uzgoja u kulturi prisutno svega 10% astrocita. Mali postotak astrocita, kao niti jedna stanica mikroglije, očekivan je nalaz budući da je priprema i način izolacije usmjeren isključivo prema progenitorima oligodendrocita. Konačno, treća velika razlika jesu mijelinirajuće stanice. Iako su stanice diferencirane prema protokolu, rezultati ovog istraživanja pokazuju da se mijelinirajuće stanice

pojavljaju u kulturi već petog dana diferencijacije i to u značajnom postotku. Prema stadiju sazrijevanja, mbp i plp pozitivne stanice, se pojavljuju u isto vrijeme što je slučaj i u ovom istraživanju, ali zanimljivo je da je znatno manji udio mbp pozitivnih stanica, koji iznosi nešto više od 10% ukupnog broja stanica, u odnosu na udio plp pozitivnih stanica koji je gotovo 80%. Na temelju ovoga proizlazi zaključak da petog dana diferencijacije, od ukupnog broja mijelinirajućih stanica, svega 12% stanica izražava oba mijelinirajuća biljega. Sedmog dana taj omjer se povećava u korist mbp pozitivnih stanica. Na temelju svega je vidljivo da su i u završnoj fazi diferencijacije stanice u potpunosti pratile diferencijacijski put opisan u ZHANG (2001.).

Progenitori oligodendrocita izolirani su iz novorođenih Thy1 miševa. Ovaj transgenični soj miša napravljen je od grupe autora FENG i sur. (2000.). Soj je karakterističan po tome što pod utjecajem promotora *Thy1* gena u određenim stanicama izražava zelenu fluorescentnu bjelančevinu. Izražaj bjelančevine je karakterističan za neurone i nikada se ne pojavljuje u niti jednoj drugoj vrsti stanica. Na ovom soju napravljena su brojna morfološka istraživanja *in vitro* (FENG i sur., 2000.; CORTI i sur., 2006.; ALIĆ i sur., 2016.), ali i istraživanje izražaja gena tijekom *in vitro* diferencijacije (STOJANAC, 2016.). Iako je u navedenim istraživanjima način uzgoja stanica bio usmjeren prema neuronima, svega 3-5% stanica jesu glija-stanice koje nikada nisu izražavale zelenu fluorescentnu bjelančevinu. U istraživanju MIRIĆ i sur. (2017.) od istog soja napravljena je primarna kultura neurona, čija je izolacija i početni način uzgoja sličan uzgoju oligodendrocita, ali ni u ovom istraživanju nisu zabilježeni oligodendrociti, a prisutni astrociti također nisu bili Thy1 pozitivni. Rezultati ovoga istraživanja, napravljeni na isključivo glija-stanicama, potvrđuju da je izražaj zelene fluorescentne bjelančevine u Thy1 miševima specifičan isključivo za neuronsku lozu jer niti jedna stanica u ovom istraživanju nije bila Thy1 pozitivna.

Laboratorijske životinje, u prvom redu miševi, zbog relativno jeftinog načina uzgoja, ali i brzog reproduktivnog ciklusa, smatraju se idealnim pokusnim životinjama za proučavanje različitih fizioloških i patoloških stanja u ljudi. Međutim tijekom fiziološkog, embrionalnog, fetalnog i postnatalnog razvoja glija-stanica postoji velika razlika u pojavi i sazrijevanju istih u ove dvije vrste. Naime u miša tijekom embrionalnog razvoja ne dolazi do razvoja glija-stanica, odnosno nema njihovih progenitora, bilo da se radi o progenitorima oligodendrocita ili astrocita (ALIĆ, 2015.). S druge strane, u čovjeka, progenitori glija-stanica pojavljuju se rano tijekom embrionalnog razvoja, već sredinom gestacije i to u diencefalonu odakle kreću u migraciju

(JAKOVCEVSKI i ZECEVIC, 2005a.; JAKOVCEVSKI i sur., 2009.). Isto tako velika razlika u odnosu na miša se odnosi u izražaju biljega olig1 olig2, pri čemu je opisano da u čovjeka, osim što boji progenitore oligodendrocita, boji i specifičnu subpopulaciju neurona te utječe na stanice neuronske loze (JAKOVCEVSKI i ZECEVIC, 2005b.). Drugim riječima, ovaj nalaz upućuje na blisku povezanost između neuronske i glija loze stanica, što zapravo i nije neobično budući da obje populacije kreću od iste živčane matične stanice, a kasnije se opredjeljuju i usmjeravaju prema određenoj populaciji stanica (MCGEADY i sur., 2014.).

U brojnim istraživanjima patoloških stanja vrlo često se u prvi plan stavljaju neuroni i njihova patologija. Međutim glija-stanice imaju posebno važnu ulogu jer svojom potpornom funkcijom podržavaju neurone. Važnost glija-stanica vidljiva je u snažnoj obrani nakon moždanog udara gdje se glija-stanice organiziraju i migriraju na mjesto ozljede i tvore snažnu granicu između zdravog i bolesnog tkiva (KOSI i sur., 2018.). Iako su u ovakvim reakcijama najzaslužniji astrociti, prvenstveno reaktivni astrociti, osim njih javljaju se i oligodendrociti kao i stanice mikroglije i na taj način sprječavaju daljnje propadanje tkiva. U modelu demijelinacijske ozljede kralježnične moždine i mozga, dolazi do propadanja mijelina, što je idealan model za proučavanje multiple skleroze u čovjeka. U ovom modelu autori su opisali aktivaciju „novorođenih“ progenitora oligodendrocita korištenjem transgeničnih životinja (FANCY i sur., 2009.; FANCY i sur., 2011.). Prema navedenom istraživanju aktiviraju se olig2 pozitivne stanice koje dolaze na mjesto ozljede te se diferenciraju prema zrelim oblicima oligodendrocita. Zaključno, rezultati ovoga istraživanja, podudaraju se s *in vivo* istraživanjima (FANCY i sur., 2009.; FANCY i sur., 2011.) i još jednom ukazuju na važnost *in vitro* rezultata i mogućnosti usporedbe s istraživanjima na *in vivo* modelima, ali isto tako i pružaju nove spoznaje koje nas usmjeravaju prema kliničkim istraživanjima.

6. ZAKLJUČCI

Diferencijacija progenitora oligodendrocita napravljena je po prvi put u Laboratoriju za matične stanice na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga te su na temelju analize dobivenih rezultata proizašli sljedeći zaključci:

1. Tijekom sedam dana uzgoja, stanice su se potpuno diferencirale od progenitornih stanica do zrelih, mijelinirajućih, oligodendrocita
2. Udio olig2 pozitivnih stanica smanjuje se od 99%, prvog dana diferencijacije na svega 8% sedmog dana diferencijacije
3. Tijekom cijelog razdoblja diferencijacije gotovo 90% stanica je o4 i o1 pozitivno, dok je s svega 10% stanica gfap pozitivno
4. Zreli, mijelinirajući oligodendrociti pojavljuju se petog dana diferencijacije, a svega 12% tih stanica je pozitivno na oba biljega mijelinirajućih oligodendrocita
5. Sedmog dana diferencijacije udio mbp pozitivnih stanica porastao je na $13\pm 2\%$ dok je udio plp pozitivnih stanica porastao na $84\pm 3\%$ pozitivnih stanica
6. Sedmog dana diferencijacije zabilježena je i funkcionalna razvijenost mbp pozitivnih stanica, odnosno njihova mijelinacija

7. POPIS LITERATURE

ALAJBEG I, I. ALIĆ, A. ANDABAK ROGULJ, V. BRAILO, D. MITREČIĆ (2018): Human and mouse – derived neurons can be simultaneously obtained by co-cultures of human oral mucosal stem cells and mouse neural stem cells. *Oral Dis*, DOI: 10.1111/odi.12776.

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 lett* 634, 32–41.

BIN, J. M., S. N. HARRIS, T. E. KENNEDY (2016): The oligodendrocyte-specific antibody 'CC1' binds Quaking 7. *J. Neurochem* 139, 181-186.

BRADL, M., H. LASSMANN (2010): Oligodendrocytes: biology and pathology, *Acta Neuropathol* 119, 37-53.

CHEN, Y., V. BALASUBRAMANIYAN, J. PENG, E. C. HURLOCK, M. TALLQUIST, J. LI, Q. R. LU (2007): Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells. *Nature Protocols* 2, 1044-1051.

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.

FANCY, S. P. J., S. E. BARANZINI, C. ZHAO, D.-I. YUK, K.-A. IRVINE, S. KAING, N. SANAI, R. J. M. FRANKLIN, D. H. ROWITCH (2009): Dysregulation of the Wnt pathway inhibits timely myelination and remyelination in the mammalian CNS. *Genes Dev* 23, 1571–1585.

FANCY, S. P. J., E. P. HARRINGTON, T. J. YUEN, J. C. SILBEREIS, C. ZHAO, S. E. BARANZINI, C. C. BRUCE, J. J. OTERO, E. J. HUANG, R. NUSSE, R. J. M. FRANKLIN, D. H. ROWITCH (2011): Axin2 as regulatory and therapeutic target in newborn brain injury and remyelination. *Nat Neurosci* 26, 1009–1016.

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.

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.

JAKOVCEVSKI, I., N. ZECEVIC (2005a): Sequence of Oligodendrocyte Development in the Human Fetal Telencephalon, *Glia* 49, 480-491.

JAKOVCEVSKI, I., N. ZECEVIC (2005b): Olig Transcription Factors Are Expressed in Oligodendrocyte and Neuronal Cells in Human Fetal CNS, *J. Neurosci* 25, 10064-10073.

JAKOVCEVSKI, I., R. FILIPOVIC, M. ZHICHENG, S. RAKIC, N. ZECEVIC (2009): Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain, *Front in Neuroanat* 3, 1-15.

KAPURALIN, K., M. ĆURLIN, D. MITREČIĆ, N. KOSI, C. SCHWARZER, G. GLAVAN, S. GAJOVIĆ (2015): STAM2, a member of the endosome-associated complex ESCRT-0 is highly expressed in neurons. *Mol Cell Neurosci* 67, 104–115.

KONIG, N., C. TROLLE, K. KAPURALIN, I. ADAMEYKO, D. MITREČIĆ, H. ALDSKOGIUS, P. J. SHORTLAND, E. N. KOZLOVA (2017): 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*. 11, 129–137.

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 in adult mouse and human brain and is linked to proliferation and differentiation of neural stem cells during brain regeneration. *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.

KOSI, N., I. ALIĆ, I. SALAMON, D. MITREČIĆ (2018): Stroke promotes survival of nearby transplanted neural stem cells but does not influence their differentiation. *Neuroscience letters* 666, 111–119.

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

MIRIĆ, M., S. KUŽIR, I. ALIĆ (2017): Diferencijacija stanica u primarnoj kulturi neurona iz dva soja transgeničnih miševa. *Veterinar: časopis studenata veterinarske medicine Zagreb* 55, (1), 10–20.

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. *Rejuv Res* 5, 1–3.

MITREČIĆ, D., I. ALIĆ, D. GORUP (2017): Stem cells and stroke - how glowing neurons illuminate new paths. *Neurogenesis* 4, DOI:10.1080/23262133.2017.1304847

RAKIC, S., N. ZECEVIC (2003): Early Oligodendrocyte Progenitor Cells in the Human Fetal Telencephalo, *Glia* 41, 117-127.

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

STOJANAC, A., I. ALIĆ (2017): Analiza izražaja gena tijekom in vitro diferencijacije neurona. *Veterinar: časopis studenata veterinarske medicine Zagreb* 55, (2), 2–12.

TIMSIT, S., S. MARTINEZ, B. ALLINQUANT, F. PEYRON, L. PUELLES, B. ZALC (1995): Oligodendrocytes Originate in a Restricted Zone of the Embryonic Ventral Neural Tube Defined by DM-20 mRNA Expression. *The Journal of Neuroscience* 15, 1012-1024.

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.

WILHELMSSON, U., E. A. BUSHONG, D. L. PRICE, B. L. SMARR, V. PHUNG, M. TERADA, M. H. ELLISMAN, M. PENKY (2006): Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *PNAS* 103, 17513-17518.

YAMAZAKI, R., T. ISHIBASHI, H. BABA, Y. YAMAGUCHI (2017): Expression of Unconventional Myosin VI in Oligodendrocytes. *Neurochem Res* 42, 3372-3381.

ZHANG, S-C. (2001): Defining glial cells during CNS development. *Nat rev Neurosci* 2, 840–843.

8. SAŽETAK

Diferencijacija glija-stanica u *in vitro* uvjetima

Tijekom sedam dana diferencijacije *in vitro* stanice su se u potpunosti diferencirale od progenitora oligodendrocita do potpuno zrelih, mijelinirajućih oligodendrocita. Prvog dana diferencijacije 99% stanica je olig2, sox2 i nestin pozitivno. Već prvog dana diferencijacije 88±2% stanica je o4 i o1 pozitivno, dok je svega 10% stanica gfap pozitivno. Trećeg dana diferencijacije udio olig2 pozitivnih stanica smanjuje se na 86±3% stanica dok se udio o4, o1 i gfap pozitivnih stanica zadržava na istim vrijednostima kao i prvog dana diferencijacije. Petog dana diferencijacije, stanice su potpuno diferencirani oligodendrociti, a udio olig2 pozitivnih stanica iznosi svega 11±2% stanica, dok se udio o4, o1 i gfap pozitivnih stanica zadržava gotovo na istim vrijednostima kao i u ranijim vremenskim točkama. U ovoj vremenskoj točki 10±2% stanica je mbp pozitivno dok je 79±2% stanica plp pozitivno, pri čemu svega 12% mijelinirajućih oligodendrocita je pozitivno na oba biljega. Sedmog dana diferencijacije udio o4 i o1 pozitivnih stanica i dalje iznosi 82±3% stanica dok je udio gfap pozitivnih stanica neznatno porastao i iznosi 11±3% stanica. Udio mbp pozitivnih stanica porastao je na 13±2% stanica dok je udio plp pozitivnih stanica porastao na 84±3% stanica.

Ključne riječi: matične stanice, diferencijacija, glija-stanice

9. SUMMARY

In vitro differentiation of Glia cells

During the seven days of *in vitro* differentiation, cells were completely differentiated from the oligodendrocyte progenitors to the mature, myelinating oligodendrocyte. On the first day of differentiation 99% cells were olig2, sox2 and nestin positive. Moreover, 88±2% cells were o4 and o1 positive, while the only 10% cells were gfap positive. On the third day of differentiation, number of the olig2 positive cells was reduced to 86±3% cells while the o4, o1 and gfap positive cells hold at the same values as on the first day of differentiation. On the fifth day of differentiation, cells were completely differentiated oligodendrocytes and number of olig2 positive cells was reduced to 11±2% of cells, while the proportion of o4, o1 and gfap positive cells holds almost at the same values as in earlier time points. At this time point, 10±2% cells were mbp positive while the 79±2% cells were plp positive. Taken all together only 12% of myelinating oligodendrocyte were positive on both markers. On the seventh day of differentiation, number of o4 and o1 positive cells were 82±3% of cells, while the number of gfap positive cells was slightly increased to 11±3% positive cells. The percentage of mbp positive cells were increased to 13±2% cells, while the percentage of plp positive cells were increased to 84±3% cells.

Key words: stem cells, differentiation, glia cells

10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 7. rujna 1992. godine u Slavonskom Brodu. Pohađao sam Osnovnu školu „Ivan Goran Kovačić“ od 1999. do 2007. godine u Slavonskom Brodu. Nakon završene Osnovne škole, pohađao sam Klasičnu Gimnaziju „fra Marijana Lanosovića“ u Slavonskom Brodu od 2007. do 2011. godine. Nakon završene srednje škole s odličnim uspjehom i uspješno položene državne mature, 2011. godine upisujem Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija sudjelovao sam na nekoliko međunarodnih kongresa vezanih za veterinarsku anatomiju i veterinarsku znanost i struku. Na kongresu „Meeting of the Young generation of Veterinary Anatomist, Leipzig, Germany, 17.7.2013.-20.7.2013“, predstavio sam poster pod nazivom „Persistent left cranial cardiac vein in a dog“. Na sljedećem kongresu „Meeting of the Young generation of Veterinary Anatomist, Poznan, Poland, 15.7.2015.-17.7.2015.“ predstavio sam poster pod nazivom „Comparative archaeozoological analysis from two medieval sites“. Uz navedene kongrese sudjelovao sam i na međunarodnom kongresu „Veterinary science and profession“ Zagreb, Croatia, 1.10.2015.-2.10.2015“ te „Eastern European Veterinary Conference, Belgrade, Serbia, 6.10.2016.-8.10.2016.“. Tijekom rujna 2016. godine volontirao sam u ambulanti „Argus d.o.o. Domaljevac-Šamac (Domaljevac, Bosna i Hercegovina)“ prilikom čega sam aktivno sudjelovao u svim veterinarskim poslovima. Tijekom ožujka i travnja 2017. godine obavljao sam Erasmus+ stručnu praksu u „Clinique Veterinarie des Cateliers“ (Buchy, Francuska) tijekom koje sam obavljao razne veterinarske poslove.