

MORFOLOŠKA ANALIZA NASTANKA I DIFERENCIJACIJE NEURONA U STANIČNOJ KULTURI, TIJEKOM RAZVOJA ZAMETKA I NAKON TRANSPLANTACIJE U MOZAK MIŠA UPORABOM MATIČNIH STANICA DOBIVENIH IZ MIŠJEG SOJA THY1 YFP-16

Alič, Ivan

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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:178:710004>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-26**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Ivan Alić

**MORFOLOŠKA ANALIZA NASTANKA I DIFERENCIJACIJE
NEURONA U STANIČNOJ KULTURI, TIJEKOM RAZVOJA
ZAMETKA I NAKON TRANSPLANTACIJE U MOZAK MIŠA
UPORABOM MATIČNIH STANICA DOBIVENIH IZ MIŠJEG
SOJA THY1 YFP-16**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2015.



University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Ivan Alić

**MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF DEVELOPMENT AND
DIFFERENTIATION OF NEURONS IN CELL CULTURE,
DURING EMBRYONIC DEVELOPMENT AND AFTER
TRANSPLANTATION INTO MOUSE BRAIN USING STEM
CELLS DERIVED FROM MOUSE STRAIN THY1 YFP-16**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2015



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Ivan Alić

**MORFOLOŠKA ANALIZA NASTANKA I DIFERENCIJACIJE
NEURONA U STANIČNOJ KULTURI, TIJEKOM RAZVOJA
ZAMETKA I NAKON TRANSPLANTACIJE U MOZAK MIŠA
UPORABOM MATIČNIH STANICA DOBIVENIH IZ MIŠJEG
SOJA THY1 YFP-16**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Doc. dr. sc. Dinko Mitrečić

Prof. dr. sc. Vesna Gjurčević Kantura

Zagreb, 2015.



University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Ivan Alić

**MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF DEVELOPMENT AND
DIFFERENTIATION OF NEURONS IN CELL CULTURE,
DURING EMBRYONIC DEVELOPMENT AND AFTER
TRANSPLANTATION INTO MOUSE BRAIN USING STEM
CELLS DERIVED FROM MOUSE STRAIN THY1 YFP-16**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Assist. Prof. Dinko Mitrečić
Prof. Vesna Gjurčević Kantura

Zagreb, 2015

Zahvaljujem se svima koji na bilo koji način sudjelovali u izradi ovoga rada.....

Prije svega zahvaljujem se mentoru doc. dr. sc. Dinku Mitrečiću na idejama, potpori i strpljivosti tijekom izvođenja ovoga rada. Vaše znanje, smirenost i ljubav prema znanosti bile su veliki poticaj od našeg prvog susreta.

Dragoj prijateljici Nini Kosi zahvaljujem na svemu što smo prošli kroz ove tri godine rada, a prije svega na prijateljstvu koje smo gradili dok smo provodili dane i noći na institutu.

Zahvaljujem svim djelatnicima Laboratorija za neurogenetiku i razvojnu genetiku Hrvatskog instituta za istraživanje mozga te Katedre za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta na čelu s prof. dr. sc. Srećkom Gajovićem na svim savjetima i pomoći koju ste mi pružili, a posebno doc. dr. sc. Mariji Ćurlin i dr. sc. Katarini Kapuralin.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Nataši Jovanov Milošević na brojnim savjetima oko laboratorijskih životinja, rada sa životinjama, te izrade rada u završnoj fazi.

Veliko hvala Valenti i Nataši na brizi o životinjama i ispunjavanju brojnih zahtjeva koji su ponekad bili gotovo neizvedivi.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Tajani Trbojević Vukičević, doc. dr. sc. Snježani Kužir i doc. dr. sc. Martini Đuras na prevelikoj i nesebičnoj podršci koju mi pružate još od studentskih dana.

Zahvaljujem se i mojim dragim studentima koji su uvijek uz mene i moj najveći poticaj za rad na fakultetu.

Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima na strpljenju.....

Posebno se zahvaljujem prof. dr. sc. Vesni Gjurčević Kantura na svemu. Vaše znanje i ljubav prema anatomiji i radu sa studentima imali su najveći utjecaj na sve što radim. Bila mi je čast i velika privilegija biti Vaš znanstveni novak i upravo Vama posvećujem ovaj dio svoga rada.....

.....i na kraju, Bogu hvala!

SAŽETAK

MORFOLOŠKA ANALIZA NASTANKA I DIFERENCIJACIJE NEURONA U STANIČNOJ KULTURI, TIJEKOM RAZVOJA ZAMETKA I NAKON TRANSPLANTACIJE U MOZAK MIŠA UPORABOM MATIČNIH STANICA DOBIVENIH IZ MIŠJEG SOJA THY1 YFP-16

Ishemijski moždani udar je najčešći uzrok trajnog invaliditeta u ljudi i drugi uzrok smrti u razvijenim zemljama. Novu nadu u liječenje ove teške bolesti donose matične stanice koje predstavljaju nediferenciranu populaciju stanica pomoću kojih se potencijalno mogu obnoviti oštećeni neuroni. U ovom istraživanju je upotrijebljen mišji soj koji pod kontrolom promotora *Thy1* gena izražava žutu fluorescentnu bjelančevinu u cijelim neuronima, uključujući jezgru, tijelo živčane stanice, akson, dendrite, te njihove trnove – spine. Koristeći izražaj bjelančevine YFP praćen je nastanak i diferencijacija živčanih stanica u staničnoj kulturi i tijekom razvoja živčanog sustava THY1 – YFP zametka, te su opažena zbivanja uspoređena s onima nakon transplantacije živčanih matičnih stanica u mozak životinje kojoj je prethodno izazvan moždani udar. Rezultati ovoga istraživanja su pokazali da je broj THY1 – YFP pozitivnih stanica tijekom diferencijacije *in vitro* stalan, te se radi o 21,3–22,5% neurona prepoznatih pomoću biljega MAP2, β 3-tubulin i NeuN. Tijekom embrionalnog razvoja THY1 – YFP pozitivne stanice se pojavljuju 12,5. dana razvoja zametka i njihov broj se povećava do kraja graviditeta u središnjem, ali i u perifernom živčanom sustavu. Nakon transplantacije u mozak životinje, THY1 – YFP stanice su se diferencirale, povezale sa stanicama domaćina i stvorile mreže u ozlijeđenom tkivu. U kontrolnim životinjama stanice su se zadržale na mjestu transplantacije. Ovo istraživanje je pokazalo da stanice koje izražavaju THY1 – YFP mogu biti korištene kao jedna od metoda izbora u praćenju sudbine transplantiranih matičnih stanica, posebno u istraživanjima koja zahtijevaju precizno praćenje stanične morfologije.

Ključne riječi: ishemijski moždani udar, matične stanice, diferencijacijski potencijal, THY1, YFP

EXTENDED ABSTRACT

MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF DEVELOPMENT AND DIFFERENTIATION OF NEURONS IN CELL CULTURE, DURING EMBRYONIC DEVELOPMENT AND AFTER TRANSPLANTATION INTO MOUSE BRAIN USING STEM CELLS DERIVED FROM MOUSE STRAIN THY1 YFP-16

INTRODUCTION

Ischemic stroke is the most common cause of permanent disability and the second leading cause of death in developed countries. A new hope for treatment of this disease is brought by stem cells which represent a specific cell population which can be potentially used to regenerate damaged neurons. In this study we used the mouse strain which under the control of *Thy1* gene promoter expresses yellow fluorescent protein in all parts of neurons, including nucleus, perikaryon, axon, dendrites and spines. By using a visible signal of YFP we described emergence and differentiation of neurons in cell culture and during embryonic development. These observations have been compared to processes taking place after stem cells were transplanted into the brain of experimental animal affected by stroke.

MATERIAL AND METHODS

In this study mice embryo and adult mice from two mice strains, B6.Cg-Tg (Thy1-YFP) 16Jrs/J (YFP-16) and C57BL/6NCrl, were used. For neural stem cell isolation pregnant females were sacrificed on the 14.5th day of pregnancy, embryos were isolated and parts of the telencephalic wall were dissociated and cells were placed in a specific proliferation medium. After formation of neurospheres and their growth, they have been dissociated and placed on special substrates containing poly-D-lysine and laminin to enable differentiation of neurons. After fixation immunocytochemical staining was performed. Pregnant females were sacrificed for embryo isolation from 9.5th to 17.5th day of pregnancy. Isolated embryos were fixed, cryosected and prepared for immunohistochemical staining. Ischemic brain injury was induced by transient left middle cerebral artery occlusion (MCAO) in adult C57Bl/6 mice. One day after MCAO, stereotaxic transplantation was performed. Brains were isolated, cryosected and prepared for

immunohistochemical staining. Sections were analyzed and recorded using confocal microscope Zeiss LSM 510 META.

RESULTS

Results of this study showed that the number of THY1 – YFP positive cells during differentiation *in vitro* was constant and it was in the range from 21.3 to 22.5% of the total cell count. THY1 – YFP positive cells were positive for SOX2 and all tested neuronal markers (MAP2, β 3-tubulin and NeuN). During embryonic development THY1 – YFP positive cells were observed from E12.5 and their number has been constantly increasing in the central (spinal cord, rhomencephalon and telencephalon) as well as in the peripheral (spinal nerves, cranial nerves and retina) nervous system. THY1 - YFP positive cells during embryonic development were positive for the same markers as during *in vitro* differentiation. In stroke affected mouse brain transplanted THY1 – YFP cells differentiated and incorporated into the injured tissue. In control animals the cells at the site of transplantation.

CONCLUSION

Results of this study showed that mature neurons as well as neuronal progenitor cells express THY1 – YFP construct in *in vitro* conditions, during embryonic development and after transplantation into the MCAO brain. This suggests that in addition to analyses of neuronal differentiation in B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J mouse, neural stem cells isolated from this strain can be successfully used in studies where tracing of cells with neuronal fate is needed.

Key words: ischemic stroke, stem cells, differentiation potential, THY1, YFP

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA	5
2.1.	Bolesti živčanog sustava	6
2.1.1.	Moždani udar	6
2.1.2.	Životinjski model moždanog udara	7
2.2.	Matične stanice u liječenju bolesti živčanog sustava	8
2.2.1.	Transplantacija matičnih stanica	10
2.2.1.1.	Izvori stanica za terapijsku primjenu	10
2.2.1.2.	Načini transplantacije stanica	11
2.2.2.	Načini obilježavanja stanica	14
2.3.	THY1	15
3.	OBRAZLOŽENJE TEME	18
4.	MATERIJAL I METODE	20
4.1.	Pokusne životinje	21
4.2.	Postupci sa životinjama	21
4.2.1.	Uzgoj i smještaj životinja	21
4.2.2.	Razmnožavanje životinja	21
4.2.3.	Žrtvovanje životinja	22
4.2.4.	Određivanje dobi zametka	22
4.2.5.	Operativni zahvati na životinjama	23
4.2.5.1.	Izazivanje ishemijskog moždanog udara	23
4.2.5.2.	Stereotaksijska transplantacija živčanih matičnih stanica	24
4.3.	Postupci sa stanicama	26
4.3.1.	Izolacija živčanih matičnih stanica	26
4.3.2.	Uzgoj neurosfera	26
4.3.3.	Priprema stanica za pokuse <i>in vitro</i>	27
4.3.3.1.	Disocijacija stanica	27
4.3.3.2.	Priprema podloga za diferencijaciju stanica	27
4.3.3.3.	Diferencijacija stanica	27
4.3.3.4.	Fiksacija diferenciranih stanica	28
4.3.3.5.	Imunocitokemija	28

4.3.4.	Priprema stanica za pokuse <i>in vivo</i>	29
4.3.4.1.	Obilježavanje stanica fluorescentnom bojom	29
4.4.	Postupci s tkivima	29
4.4.1.	Izolacija i fiksacija tkiva	29
4.4.2.	Priprema histoloških preparata	30
4.4.3.	Bojenje prema Nisslu	30
4.4.4.	Bojenje s trifeniltetrazolium kloridom	30
4.4.5.	Imunohistokemija	31
5.	REZULTATI	33
5.1.	Izražaj THY1 – YFP tijekom diferencijacije živčanih stanica <i>in vitro</i>	34
5.1.1.	Izražaj THY1 – YFP tijekom 1. dana diferencijacije stanica	34
5.1.2.	Izražaj THY1 – YFP tijekom 3. dana diferencijacije stanica	35
5.1.3.	Izražaj THY1 – YFP tijekom 5. dana diferencijacije stanica	36
5.1.4.	Izražaj THY1 – YFP tijekom 7. dana diferencijacije stanica	36
5.1.5.	Diferencijacija stanica obilježenih fluorescentnom bojom PKH26	46
5.2.	Izražaj fluorescencije THY1 – YFP tijekom embrionalnog razvoja miša	47
5.2.1.	Izražaj THY1 – YFP tijekom 12,5. dana embrionalnog razvoja	47
5.2.2.	Izražaj THY1 – YFP tijekom 13,5. dana embrionalnog razvoja	48
5.2.3.	Izražaj THY1 – YFP tijekom 14,5. dana embrionalnog razvoja	48
5.2.4.	Izražaj THY1 – YFP tijekom 15,5. dana embrionalnog razvoja	49
5.2.5.	Izražaj THY1 – YFP tijekom 16,5. dana embrionalnog razvoja	49

5.2.6. Izražaj THY1 – YFP tijekom 17,5. dana embrionalnog razvoja	50
5.2.7. Izražaj THY1 – YFP u novorođenog miša	50
5.2.8. Izražaj THY1 – YFP u miša starog tjedan dana	51
5.2.9. Izražaj THY1 – YFP u miša starog mjesec dana	51
5.3. Izražaj fluorescencije THY1 – YFP nakon transplantacije u mozak	63
5.3.1. Izražaj THY1 – YFP dva tjedna nakon transplantacije	65
5.3.2. Izražaj THY1 – YFP četiri tjedna nakon transplantacije	65
5.3.3. Izražaj THY1 – YFP osam tjedana nakon transplantacije	68
5.3.4. Izražaj THY1 – YFP četrnaest tjedana nakon transplantacije	69
6. RASPRAVA	70
6.1. Izražaj THY1 – YFP <i>in vitro</i>	71
6.2. Izražaj THY1 – YFP <i>in vivo</i>	72
6.3. Izražaj THY1 – YFP nakon transplantacije u mozak miša	74
6.4. Korištenje THY1 – YFP u drugim istraživanjima	75
7. ZAKLJUČCI	77
8. POPIS LITERATURE	81
9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH RADOVA	91

POPIS KRATICA

BrdU (*engl.* 5-Bromo-2'-deoxyuridine), 5-bromo-2'-deoksiuridin

CFP (*engl.* cyan fluorescent protein, CFP), zeleno-plava fluorescentna bjelančevina

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), fluorescentna boja koja boji jezgre

E12,5 (*engl.* embryonic day), zametak u starosti 12,5 dana

E13,5 (*engl.* embryonic day), zametak u starosti 13,5 dana

E14,5 (*engl.* embryonic day), zametak u starosti 14,5 dana

E15,5 (*engl.* embryonic day), zametak u starosti 15,5 dana

E16,5 (*engl.* embryonic day), zametak u starosti 16,5 dana

E17,5 (*engl.* embryonic day), zametak u starosti 17,5 dana

EGF (*engl.* epidermal growth factor), epidermalni čimbenik rasta

FGF (*engl.* fibroblast growth factor), fibroblastni čimbenik rasta

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

MCAO (*engl.* Middle Cerebral Artery Occlusion), začepljenje srednje moždane arterije

NeuN (*engl.* neuronal nuclei), jezgre neurona

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]

TH (*engl.* tyrosine hydroxylase), tirozin hidroksilaza

THY1 (*engl.* thymus cell antigen 1), antigen timusnih stanica

TTC (2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride), trifeniltetrazolium klorid

YFP (*engl.* yellow fluorescent protein), žuta fluorescentna bjelančevina

POPIS SLIKA, TABLICA I GRAFIKONA

Slika 1. Shematski prikaz diferencijacije stanica od živčane matične stanice do diferenciranih oblika – neuron, astrocit i oligodendrocit.

Slika 2. Položaj Thy1 gena na 9. kromosomu. Preuzeto i prilagođeno s: <http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:98747>

Slika 3. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i nestina (crveni signal) tijekom diferencijacije stanica *in vitro*. Na slikama (A-C) vidi se izražaj THY1 – YFP i nestina tijekom 1. dana diferencijacije. Progenitorne stanice su nestin pozitivne (C), dok zreliji oblici THY1 – YFP stanica nisu. Na slikama (D-F) prikazane su stanice tijekom 3. dana, na slikama (G-I) tijekom 5. dana i na slikama (J-L) tijekom 7. dana diferencijacije.

Slika 4. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i SOX2 (crveni signal) tijekom diferencijacije stanica *in vitro*. Na slikama (A-C) vidi se izražaj THY1 – YFP i SOX2 tijekom 1. dana diferencijacije. Na slikama (D-F) prikazane su stanice tijekom 3. dana, na slikama (G-I) tijekom 5. dana i na slikama (J-L) tijekom 7. dana diferencijacije. Tijekom diferencijacije vidljiva je kolokalizacija THY1 – YFP i SOX2 u zrelim i nezrelim oblicima stanica.

Slika 5. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i MAP2 (crveni signal) tijekom diferencijacije stanica *in vitro*. Na slikama (A-C) vidi se izražaj THY1 – YFP i MAP2 tijekom 1. dana diferencijacije. Na slikama (D-F) prikazane su stanice tijekom 3. dana, na slikama (G-I) tijekom 5. dana i na slikama (J-L) tijekom 7. dana diferencijacije. Tijekom diferencijacije vidljiva je kolokalizacija THY1 – YFP i MAP2 u zrelim i nezrelim oblicima stanica perinuklearno i u nastavcima.

Slika 6. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i β 3-tubulina (crveni signal) tijekom diferencijacije stanica *in vitro*. Na slikama (A-C) vidi se izražaj THY1 – YFP i β 3-tubulina tijekom 1. dana diferencijacije. Na slikama (D-F) prikazane su stanice tijekom 3. dana, na slikama (G-I) tijekom 5. dana i na slikama (J-L) tijekom 7. dana diferencijacije. Tijekom diferencijacije vidljiva je kolokalizacija THY1 – YFP i β 3-tubulina u zrelim i nezrelim oblicima stanica perinuklearno i u nastavcima.

Slika 7. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i NeuN-a (crveni signal) tijekom diferencijacije stanica *in vitro*. Na slikama (A-C) vidi se izražaj THY1 – YFP i NeuN-a tijekom 1. dana diferencijacije. Na slikama (D-F) prikazane su stanice tijekom 3. dana, na slikama (G-I) tijekom 5. dana i na slikama (J-L) tijekom 7. dana diferencijacije. Tijekom diferencijacije vidljiva je izrazita pozitivnost NeuN-a u nastavcima, koja postaje sve jača sazrijevanjem stanica.

Slika 8. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i GFAP-a (crveni signal) tijekom diferencijacije stanica *in vitro*. Na slikama (A-C) vidi se izražaj THY1 – YFP i GFAP-a tijekom 5. dana diferencijacije. Budući da GFAP boji astrocite nema kolokalizacije između THY1 – YFP i GFAP pozitivnih stanica. Na slikama (D-F) prikazane su stanice tijekom 7. dana diferencijacije. Na slikama (G-I) prikazane su THY1 – YFP stanice tijekom 7. dana diferencijacije koje

predstavljaju negativne kontrole bojanja, pri čemu se jasno vidi da na slici (H) nema signala jer nije stavljeno primarno protutijelo.

Slika 9. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal), MAP2 (crveni signal, B), β 3-tubulina (plavi signal) i GFAP-a (crveni signal, F) tijekom 7. dana diferencijacije stanica *in vitro*. Na slikama (A-D) vidi se kolokalizacija između THY1 – YFP stanica, MAP2 i β 3-tubulina. Na slikama (F i H) vidi se da nema kolokalizacije između THY1 – YFP stanica i GFAP pozitivne stanice, kao ni između β 3-tubulina i GFAP pozitivne stanice, ali se vidi kolokalizacija između THY1 – YFP stanice i β 3-tubulina.

Slika 10. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal), MAP2 (crveni signal) i DAPI (plavi signal) tijekom 7. dana diferencijacije stanica *in vitro*. Na stopljenoj slici (D) vidi se kolokalizacija između THY1 – YFP, MAP2 i DAPI koja boji jezgre svih stanica. Mjerka = 50 μ m.

Slika 11. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) tijekom 5. dana diferencijacije *in vitro* u stanica obilježenih fluorescentnom PKH26 bojom (crveni signal) (A-C). Fluorescentna boja zadržava se u progenitornim stanicama i nerazvijenijim oblicima stanica (B). Na slici (C) vidi se da nema kolokalizacije THY1 – YFP stanica i PKH26 pozitivnih stanica. Na slikama (D-F) prikazane su negativne kontrole diferencijacije odnosno stanice koje nisu obilježene PKH26 bojom.

Slika 12. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i nestina (crveni signal) u ventralnom rogu kralježnične moždine tijekom embrionalnog razvoja miša. Na slici (A-C) se vidi izražaj THY1 – YFP i nestina tijekom 12,5. dana, (D-F) tijekom 14,5. dana i (G-I) tijekom 16,5. dana embrionalnog razvoja. Slika (J-L) jest negativna kontrola, na slici (K i L) vidi se bojanje s nestinom, dok na slici (J) nema signala jer tkivo pripada embriju C57Bl/6NCrl soja tijekom 14,5. dana embrionalnog razvoja.

Slika 13. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i SOX2 (crveni signal) u ventralnom rogu kralježnične moždine tijekom embrionalnog razvoja miša. Na slici (A-C) vidi se izražaj THY1 – YFP i SOX2 tijekom 12,5. dana, (D-F) tijekom 14,5. dana i (G-I) tijekom 16,5. dana embrionalnog razvoja. Slika (J-L) jest negativna kontrola, na slici (K i L) vidi se bojanje sa SOX2, dok na slici (J) nema signala jer tkivo pripada embriju C57Bl/6NCrl soja tijekom 14,5. dana embrionalnog razvoja.

Slika 14. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i MAP2 (crveni signal) u ventralnom rogu kralježnične moždine tijekom embrionalnog razvoja miša. Na slici (A-C) vidi se izražaj THY1 – YFP i MAP2 tijekom 12,5. dana, (D-F) tijekom 14,5. dana i (G-I) tijekom 16,5. dana embrionalnog razvoja. Slika (J-L) jest negativna kontrola, na slici (K i L) vidi se bojanje s MAP2, dok na slici (J) nema signala jer tkivo pripada embriju C57Bl/6NCrl soja tijekom 14,5. dana embrionalnog razvoja.

Slika 15. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i β 3-tubulina (crveni signal) u ventralnom rogu kralježnične moždine tijekom embrionalnog razvoja miša. Na slici (A-C) vidi se izražaj THY1 – YFP i β 3-tubulina tijekom 12,5. dana, (D-F) tijekom 14,5. dana i (G-I) tijekom 16,5. dana embrionalnog razvoja. Slika (J-L) jest negativna kontrola, na slici (K i L) vidi se bojanje β 3-tubulinom, dok na slici (J) nema signala jer tkivo pripada embriju C57Bl/6NCrl soja tijekom 14,5. dana embrionalnog razvoja.

Slika 16. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i nestina (crveni signal) u rombencefalonu tijekom embrionalnog razvoja miša. Na slici (A-C) vidi se izražaj THY1 – YFP i nestina tijekom 12,5. dana, (D-F) tijekom 14,5. dana i (G-I) tijekom 16,5. dana embrionalnog razvoja. Slika (J-L) jest negativna kontrola, na slici (K i L) vidi se bojanje s nestinom, dok na slici (J) nema signala jer tkivo pripada embriju C57Bl/6NCrl soja tijekom 14,5. dana embrionalnog razvoja.

Slika 17. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i SOX2 (crveni signal) u rombencefalonu tijekom embrionalnog razvoja miša. Na slici (A-C) vidi se izražaj THY1 – YFP i SOX2 tijekom 12,5. dana, (D-F) tijekom 14,5. dana i (G-I) tijekom 16,5. dana embrionalnog razvoja. Slika (J-L) jest negativna kontrola, na slici (K i L) vidi se bojanje sa SOX2, dok na slici (J) nema signala jer tkivo pripada embriju C57Bl/6NCrl soja tijekom 14,5. dana embrionalnog razvoja.

Slika 18. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i MAP2 (crveni signal) u rombencefalonu tijekom embrionalnog razvoja miša. Na slici (A-C) vidi se izražaj THY1 – YFP i MAP2 tijekom 12,5. dana, (D-F) tijekom 14,5. dana i (G-I) tijekom 16,5. dana embrionalnog razvoja. Slika (J-L) jest negativna kontrola, na slici (K i L) vidi se bojanje s MAP2, dok na slici (J) nema signala jer tkivo pripada embriju C57Bl/6NCrl soja tijekom 14,5. dana embrionalnog razvoja.

Slika 19. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i β 3-tubulina (crveni signal) u rombencefalonu tijekom embrionalnog razvoja miša. Na slici (A-C) vidi se izražaj THY1 – YFP i β 3-tubulina tijekom 12,5. dana, (D-F) tijekom 14,5. dana i (G-I) tijekom 16,5. dana embrionalnog razvoja. Slika (J-L) jest negativna kontrola, na slici (K i L) vidi se bojanje s β 3-tubulinom, dok na slici (J) nema signala jer tkivo pripada embriju C57Bl/6NCrl soja tijekom 14,5. dana embrionalnog razvoja.

Slika 20. Kralježnični živac bojan s β 3-tubulinom (crveni signal) (A-C) u zametka starog 12,5 dana. Na slikama (D-F) vidi se završetak kralježnične moždine (conus medullaris) bojan s nestinom u zametka starog 16,5 dana.

Slika 21. Na slici (A) vidi se njušna lukovica u zametka starog 15,5 dana; (B) lateralni presjek kralježnične moždine u zametka starog 15,5 dana, vide se spine – trnovi na nastavcima; (C) hipokampus u zametka starog 17,5 dana, vide se pozitivne stanice u CA1 području; (D) mrežnica u zametka starog 17,5 dana; (E) mrežnica i (F) korteks u novorođenog miša.

Slika 22. Na slikama A-C prikazan je mozak u miša starog tjedan dana; (A) njušne lukovice, (B) hipokampus i (C) korteks. Na slikama D-F prikazan je mozak u miša starog mjesec dana; (D) njušne lukovice, (E) hipokampus i (F) korteks.

Slika 23. Razvoj zuba. Tijekom 14,5. dana embrionalnog razvoja zub se nalazi u stadiju kape.

Slika 24. Rostralni pogled. Na slici (A i B) prikazano je bojenje prema Nisslu; (A) zdrava životinja (kontrola), (B) ozlijeđena životinja, 4 tjedna nakon ozljede, vidi se oštećenje lijevog epitalamusa i talamusa, kao i potpuno propadanje lijevog hipokampusa. Na slici (B) prikazano

je TTC bojanje s pomoću kojega se 24 sata nakon MCAO prema intenzitetu boje razlikuje oštećeno tkivo (blijedo) od neoštećenoga (ružičasto).

Slika 25. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i PKH26 (crveni signal) mozgu miša 2 tjedna nakon transplantacije. Slike A-C prikazuju ozlijeđenu životinju dok je na slikama D-F zdrava kontrola. U ozlijeđene životinje vidi se THY1 – YFP pozitivne stanice koje se iz corpusa callosum ugrađuju u hipokampus (A i C), dok se u kontrolnim životinjama stanice zadržavaju na mjestu uboda.

Slika 26. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i PKH26 (crveni signal) mozgu miša 4 tjedna nakon transplantacije. Slike A-C prikazuju ozlijeđenu životinju dok je na slikama D-F zdrava kontrola. U ozlijeđene životinje vidi se THY1 – YFP pozitivne stanice koje se iz corpusa callosum ugrađuju u hipokampus, jasno su vidljive pojedinačne stanice koje se ugrađuju u tkivo. U kontrolnim životinja stanice se zadržavaju na mjestu uboda i tvore kompaktnu nakupinu.

Slika 27. Osam tjedana nakon transplantacije živčanih matičnih stanica u tkivo miša s moždanim udarom. U hipokampusu se vide THY1 – YFP (zeleni signal) pozitivne stanice u CA1 području. Stanice su se ugradile u tkivo domaćina. Na slici (B) vide se PKH26 (crveni signal) pozitivne stanice koje se nisu diferencirale već su ostale u nediferenciranom odliku.

Slika 28. Četrnaest tjedana nakon transplantacije živčanih matičnih stanica u tkivo miša s moždanim udarom. U hipokampusu vide se THY1 – YFP pozitivne stanice u CA1 području. Stanice su se ugradile u tkivo domaćina, stvorile su gustu mrežu nastavaka na kojima se vide trnovi – spine.

Tablica 1. Uzorak izražaja u 9 THY1 – YFP sojeva. Uzorak izražaja određen je na dvije do pet odraslih životinja po soju. Legenda: „svi“ izražaj u >80% (uglavnom 100%) neurona, „mnogi“ izražaj u 10–80% neurona, „nekoliko“ izražaj u <10% neurona, „–“ nema izražaja. Brojevi u stupcu korteks označavaju slojeve u kojem se nalaze pozitivni neuroni. „A“ amakrine stanice, „B“ bipolarne stanice, „INL“ (*engl.* inner nuclear layer of retina) unutrašnji sloj jezgara mrežnice, „M“ Mullerove stanice, „mossy“ vlakna unutrašnjeg zrnatog sloja, „pre“ pregagnlijska vlakna, „post“ postganglijska vlakna, „purk“ Purkinijeve stanice, „molec“ interneuroni molekularnog sloja, „RGC“ (*engl.* retinal ganglion cells) ganglijske stanice mrežnice. Preuzeto i prilagođeno od FENG i sur. (2000.).

Tablica 2. Stereotaksijske koordinate, mjesto transplantacije i volumen suspenzije stanica.

Tablica 3. Primarna protutijela upotrijebljena za imunohistokemiju i imunocitokemiju.

Tablica 4. Sekundarna protutijela upotrijebljena za imunohistokemiju i imunocitokemiju.

Tablica 5. Prikaz izražaja signala THY1 – YFP tijekom embrionalnog razvoja. Legenda: „–“ nema signala, „+/-“ slab signal, „+“ signal, „++“ jak signal, „+++“ izrazito jak signal.

Grafikon 1. Udio THY1 – YFP stanica u ukupnom broju neurona. U ukupnom broju MAP2 i β 3-tubulin pozitivnih stanica udio THY1 – YFP pozitivnih stanica tijekom sedam dana diferencijacije stanica *in vitro* je bio konstantan i iznosio je između 21,3 i 22,5%.

1. UVOD

Bolesti živčanog sustava obuhvaćaju široki raspon akutnih i kroničnih stanja u kojima propadaju neuroni i glija-stanice u mozgu i kralježničnoj moždini. Ishemijski moždani udar akutno je stanje u kojem dolazi do propadanja neurona i glija-stanica zahvaćenog područja u kratkom vremenu (LINDVALL i KOKAIA, 2010.). Za razliku od većine drugih organskih sustava gdje se tkivo može uspješno obnoviti, obnova živčanog tkiva je zbivanje s vrlo ograničenim mogućnostima. Upravo je to jedan od osnovnih razloga zašto je moždani udar uvjerljivo najčešći uzrok trajnog invaliditeta u ljudi, te zašto bolesti živčanog sustava donose najveće opterećenje zdravstvenim sustavima diljem svijeta.

Regenerativna neuroznanost, kao nova biomedicinska disciplina, se intenzivno razvija u posljednjih petnaestak godina, za što je zaslužan velik napredak u postupcima s matičnim stanicama. Matične stanice (*engl.* stem cells) su nediferencirane stanice koje se kontroliranom diferencijacijom mogu usmjeriti u bilo koju vrstu stanica. Razlikujemo pluripotentne matične stanice kao što su embrionalne matične stanice, izolirane iz embrioblasta blastociste, iz kojih se mogu razviti sve stanice tijela i multipotentne matične stanice, kao što su živčane matične stanice, koje se mogu diferencirati u stanice nekog organskog sustava. Živčane matične stanice se mogu izolirati iz fetalnog i odraslog mozga te imaju sposobnost diferencijacije u stanice živčanog sustava (neurone i gliju). U mozgu odraslog miša i u manjoj mjeri čovjeka, matične stanice se nalaze u subventrikularnoj zoni i u zrnatom sloju hipokampusa (GAGE, 2000.; MITREČIĆ i sur., 2009.).

Dva su osnovna pristupa u terapiji neurodegenerativnih bolesti matičnim stanicama: transplantacija egzogenih stanica i poticanje endogenih matičnih stanica u središnjem živčanom sustavu na diferencijaciju u živčane stanice i glija-stanice (LINDVALL i KOKAIA, 2010.). Budući da je samoobnavljanje moždanog tkiva ograničeno, transplantacija stanica predstavlja veliki izazov u terapiji moždanog udara. Za transplantaciju se najčešće koriste: embrionalne matične stanice, živčane matične stanice, matične stanice koštane srži i pupkovine te inducirane matične stanice (BACIGALUPPI i sur., 2008.; TAKAHASHI i sur., 2008.). Stanice priređene za transplantaciju trebale bi biti u prvom redu sigurne za domaćina i imati terapijski učinak. Iako embrionalne matične stanice imaju povoljan terapijski učinak, postavljaju se brojna etička i sigurnosna pitanja. Nasuprot tome živčane matične stanice imaju povoljan terapijski učinak kod nekoliko neurodegenerativnih bolesti bez uzrokovanja težih nuspojava.

Mogućnost dobivanja željene subpopulacije matičnih stanica i kontrola njihove diferencijacije je otvorila put pokusima kojima je cilj uspostaviti protokol transplantacije matičnih stanica u tkivo zahvaćeno bolešću ili ozljedom. Jedan od specifičnih zahtjeva koji se javlja kako u eksperimentalnoj – pretkliničkoj, u ranoj kliničkoj fazi testiranja, ali i kasnije, u

fazi primjene takvog terapijskog postupka je potreba za pouzdanim praćenjem tih stanica nakon transplantacije. Kako bismo mogli vršiti preciznu analizu što se događa sa stanicama nakon transplantacije, kuda migriraju, kako se diferenciraju, u kojoj mjeri pružaju nastavke (akson i dendrite) i u kojoj mjeri su ta zbivanja poželjna, potrebni su dobri stanični označivači koji omogućuju razlikovanje transplantiranih stanica od stanica domaćina.

Dva su osnovna načina na koji možemo pratiti neku stanicu: označavanjem stanica bojom koja se veže za neke stanične elemente (jezgru, citoplazmu ili membranu) ili genetskom modifikacijom stanice koja dovodi do proizvodnje bjelančevine koja omogućuje prepoznavanje te stanice (fluorescencijom, bioluminiscencijom ili enzimatskom reakcijom). Iako je označavanje stanica bojom koja se veže za stanicu razmjerno jednostavan postupak kojim se može sa velikom pouzdanošću pratiti cjelokupna označena populacija stanica, ovaj pristup ima i neke nedostatke: stanične diobe smanjuju jačinu signala, a boja može označiti okolne stanice domaćina. Stoga su u posljednjih nekoliko godina razvijene stanične linije koje proizvode fluorescentni signal.

FENG i sur. (2000.) su razvili miša koji u svojim živčanim stanicama izražava zelenu fluorescentnu bjelančevinu (*engl.* green fluorescent protein, GFP) ili jednu od njezinih spektralnih varijanti (zelena, žuta, crvena i zeleno-plava) pod utjecajem neuron-specifičnog promotora *Thy1* gena. Bjelančevina THY1 nalazi se na površini nekih stanica (T-stanice, timociti, neuroni, endotelne stanice i fibroblasti), a sudjeluje u brojnim staničnim procesima (međustanične interakcije, apoptoza i adhezija). Odlično svojstvo ovog označavanja jest da je izražaj YFP vidljiv i u jezgri, ali i u citoplazmi neurona što omogućuje vizualiziranje čitave stanice (BANNERMAN i sur., 2005.).

Iako soj miša THY1 – YFP postoji petnaestak godina, uzorak fluorescencije do danas nije precizno opisan (WANG i sur., 2006.). Osim grubog opisa izražaja tijekom nekih stadija razvoja zametka, do sada u literaturi nema podataka o preciznom izražaju THY1 – YFP tijekom diferencijacije stanica, niti u *in vitro*, niti u *in vivo* uvjetima. Iz svega navedenog je razvidno da potencijal ovog transgeničnog soja, kako u pogledu analize diferencijacije neurona tijekom embrionalnog razvoja, tako i diferencijacije i sudbine matičnih stanica nakon transplantacije nisu iskorištene. Stoga je jedna od osnovnih hipotezi ovog doktorskog rada bila da postojana i dobro vidljiva fluorescencija koja označava svaki dio živčane stanice može poslužiti kao nova metoda u analizi nastanka i diferencijacije neurona iz matičnih stanica. Nadalje, to isto zbivanje se nakon analize u staničnoj kulturi može usporediti sa zbivanjima nakon transplantacije stanica u mozak eksperimentalne životinje, kao i sa zbivanjem koje se događa tijekom normalnog embrionalnog razvoja. U literaturi u potpunosti nedostaju radovi koji bi temeljem postojanja

THY1 soja opisali način i brzinu nastanka novih neurona tijekom diferencijacije mozga, kao i način diferencijacije matičnih stanica nakon transplantacije u mozak zahvaćen moždanim udarom.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Bolesti živčanog sustava

Bolesti živčanog sustava se primarno dijele na neurovaskularne i neurodegenerativne. Neurodegenerativne bolesti predstavljaju nasljedna ili sporadična stanja za koja je karakteristična postupna disfunkcija živčanog sustava uzrokovana propadanjem nekih neurona i/ili glija stanica. Najčešće neurodegenerativne bolesti su Alzheimerova bolest i druge demencije, Parkinsonova bolest, multipla skleroza, amiotrofična lateralna skleroza i Huntingtonova bolest (RAMANAN i SAYKIN, 2013.). Neurovaskularne bolesti su uzrokovane začepljenjem krvnih žila u mozgu koja dovodi do ishemije i akutnog propadanja tkiva. Ponekad je to patološko zbivanje uzrokovano i krvarenjem. Oba patološka zbivanja, ishemija i krvarenje u mozgu dovode do najznačajnije bolesti mozga, a time i jedne od najznačajnijih bolesti čovječanstva – moždanog udara.

2.1.1. Moždani udar

Moždani udar je drugi najčešći uzrok smrti širom svijeta i najčešći uzrok trajnog invaliditeta u ljudi. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije („World Health Organization“) iz 2012. procjenjuje se da je od ukupnog broja smrtnih slučajeva koji iznosi 17,5 milijuna, njih čak 7,4 milijuna umrlo od posljedica srčanog udara, a 6,7 milijuna od posljedica moždanog udara (WHO, 2014.). Osim zdravstvenog problema, moždani udar je i veliki socijalno-ekonomski problem jer su oporavak i njega bolesnika dugotrajni i skupi.

Prema uzroku nastanka, moždani udar se može podijeliti na: hemoragijski moždani udar i ishemijski moždani udar. Hemoragijski moždani udar javlja se u svega 13% slučajeva, a nastaje kao posljedica pucanja oslabljene stijenke krvnih žila. Dva su osnovna tipa hemoragijskog moždanog udara, ovisno na kojem mjestu dođe do pucanja krvne žile. Ukoliko dođe do pucanja žile u tkivu radi se o intracerebralnom tipu, a ukoliko dođe do pucanja krvne žile na površini mozga onda se radi o subarahnoidalnom tipu odnosno o hemoragiji. Za razliku od hemoragijskog, ishemijski moždani udar javlja se u 87% slučajeva, a nastaje kao posljedica začepjenja krvne žile u mozgu. Budući da nema protoka krvi u području opskrbe začepljene krvne žile, naglo dolazi do tkivne ishemije i propadanja tkiva kojega izgrađuju različiti tipovi neurona, astrociti, oligodendrociti kao i endotelne stanice (ANDERSEN i sur., 2009.; YUTAKA i sur., 2013.).

2.1.2. Životinjski model moždanog udara

Kako bi se bolesti mozga mogle proučavati na životinjama, razvijeni su brojni modeli za pojedine bolesti. Iako su opisane brojne metode izazivanja moždanog udara u laboratorijskih životinja, idealna ne postoji, pa stoga treba voditi računa o važnim čimbenicima. Budući da je moždani udar u ljudi kompleksno stanje, ne postoji jedan, idealni model moždanog udara koji bi se u potpunosti mogao preslikati na čovjeka. Slijedeći kriteriji pomažu u odabiru „idealnog“ modela (DURUKAN, A. i T. TATLISUMAK, 2007.):

1. ishemija i patofiziološki odgovor trebali bi odgovarati onima u ljudi
2. veličina lezije trebala bi biti ponovljiva
3. tehnika, odnosno sama operacija trebala bi biti što jednostavnija i minimalno invazivna
4. patofiziološko stanje treba biti monitorirano i održavano unutar dozvoljenih granica
5. uzorci tkiva trebaju biti dostupni za histopatološku, biokemijsku i molekularno-biološku analizu
6. troškovi moraju biti u prihvatljivim granicama

Iako je u literaturi opisano trajno začepljenje krvne žile (*engl.* permanent occlusion), učestalije se koristi model prolaznog začepljenja krvne žile (*engl.* transient occlusion) jer je poznato da vrijeme začepljena krvne žile znatno utječe na veličinu same ozljede. Osim toga, u ljudi dolazi do ponovnog uspostavljanja protoka krvi, što u slučaju trajnog začepljenja nije moguće.

U literaturi je opisano nekoliko načina izazivanja moždanog udara u životinja. Prema osnovnoj podjeli, modeli se mogu podijeliti u dvije skupine: modeli bez kraniektomije i modeli koji uključuju kraniektomiju. U prvu skupinu ubrajaju se embolijski model, intraluminalni modeli, model koji uključuje fototrombozu i model pomoću endothelina-1.

Tromboembolijska ishemija se najčešće izaziva injiciranjem autolognog tromba u arterije što koje se nastavljaju u intrakranijalne arterije, najčešće u vanjsku karotidnu arteriju (BUSH i sur., 1997.).

Fototromboza uzrokuje kortikalno oštećenje intravaskularnom aplikacijom fotoaktivne boje u kombinaciji sa zračenjem određene valne duljine (WATSON i sur., 1985.).

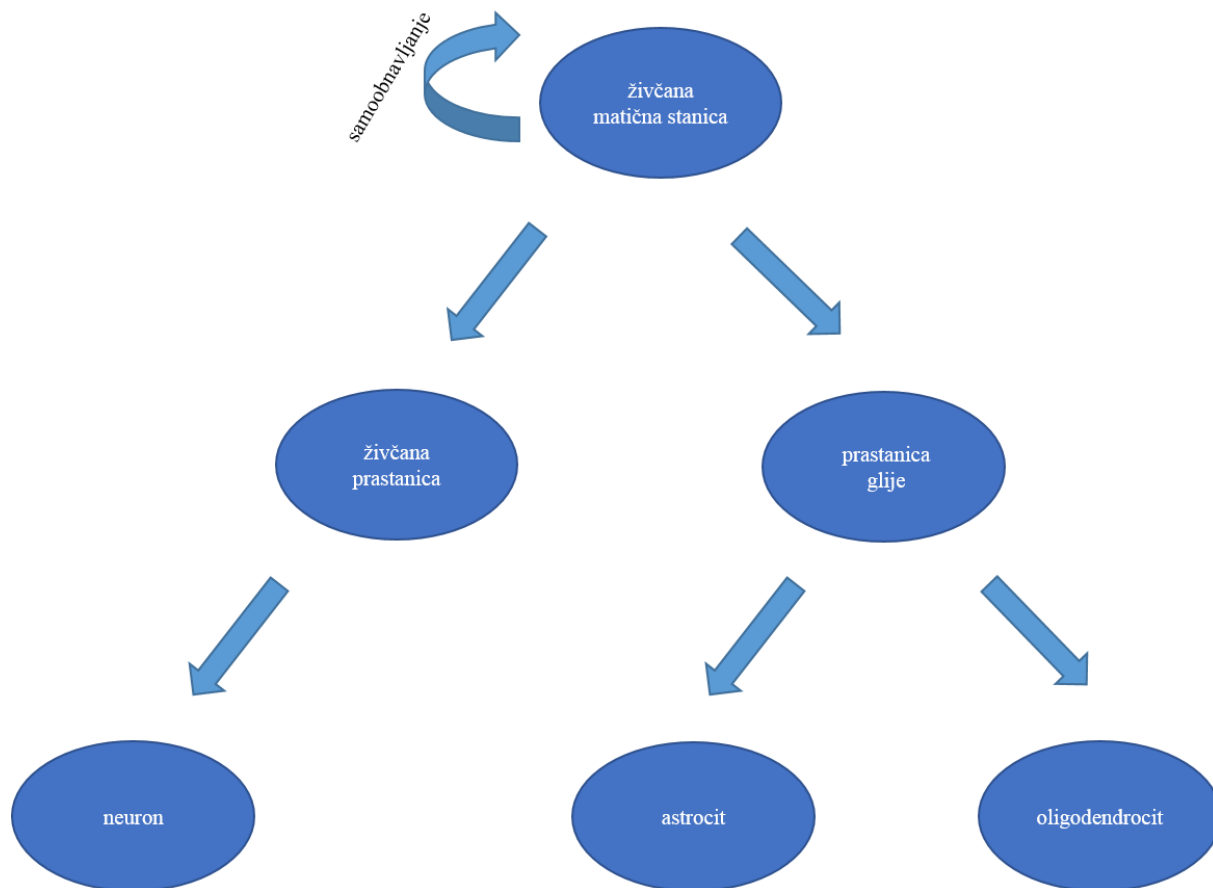
Endothelin-1 djeluje kao vazokonstriktor koji može lokalno injicirati ili u krvnu žilu (ROBINSON i sur., 1990.), u područje u blizini krvne žile (SHARKEY i sur., 1997.) ili na površinu mozga (FUXE i sur., 1997.).

Kao najčešći model moždanog udara u miša i štakora se koristi intraluminalni MCAO (*engl.* Middle Cerebral Artery Occlusion). Od opisanih modela moždanog udara, ovaj model se smatra najboljim jer je najmanje invazivan i relativno je jednostavan za izvođenje. Osim toga uzrokuje oštećenje mozga koje je manje varijabilno u odnosu na prethodno spomenute metode. Iako su poznata dva osnovna načina prema KOIZUMI i sur. (1996.) te prema LONGA i sur. (1989.) do danas je opisano nekoliko izvedenica same metode. Zajedničko obilježje ovim metodama jest to da se uz relativno jednostavan operacijski zahvat filament uvede u krvnu žilu te uzrokuje začepljenje srednje moždane arterije. Osim toga, ovo je reperfuzijski model pa je i na taj način najslabiji zbivanjima u čovjeka tijekom moždanog udara.

U drugu skupinu ubrajaju se metode koje uključuju kraniektomiju, no kod ovih metoda uvijek postoji rizik od mehaničkog oštećenja mozga. Model koji se najviše koristi u ovakvim istraživanjima jest takozvani distalni MCAO kod kojega se odmicanjem temporalnog mišića buši lubanja u području srednje moždane arterije (LLOVERA i sur., 2014.).

2.2. Matične stanice u liječenju bolesti živčanog sustava

Matične stanice (*engl.* stem cells) su nediferencirane stanice koje se kontroliranom diferencijacijom mogu usmjeriti u bilo koju vrstu stanica. Na temelju njihovog diferencijacijskog potencijala, matične stanice se mogu podijeliti na nekoliko osnovnih tipova: totipotentne, pluripotentne i multipotentne matične stanice. Zigota je primjer totipotentne stanice iz koje se razvijaju sve stanice, organi i organski sustavi, uključujući i placentu. Pluripotentne matične stanice nazivaju se i embrionalne matične stanice, a potječu iz embrioblasta blastociste. Od pluripotentnih matičnih stanica razviti će se sve stanice tijela, osim stanica trofoblasta. Najveću skupinu matičnih stanica čine multipotentne matične stanice iz kojih se razvijaju stanice pojedinih organskih sustava, kao što su primjerice živčane matične stanice od kojih se razvijaju sve stanice središnjeg i perifernog živčanog sustava. Živčane matične stanice mogu se izolirati iz fetalnog i odraslog mozga te imaju sposobnost diferencijacije u stanice živčanog sustava (neurone i gliju) (HYTTEL i sur., 2010.; MCGEADY i sur., 2014.) (Slika 1.). U mozgu odraslog miša i manjoj mjeri čovjeka matične stanice nalaze se u subventrikularnoj zoni i u zratom sloju hipokampusa (GAGE, 2000.; MITREČIĆ i sur., 2009.; WATSON i sur., 2012.).



Slika 1. Shematski prikaz diferencijacije stanica od živčane matične stanice do diferenciranih oblika – neuron, astrocit i oligodendrocit.

2.2.1. Transplantacija matičnih stanica

2.2.1.1. Izvori stanica za terapijsku primjenu

Budući da tijekom moždanog udara dolazi do propadanja svih vrsta stanica u tkivu mozga, te budući da aktivacija endogenih matičnih stanica nije zbivanje sa značajnim regenerativnim potencijalom, sve više istraživanja novih pristupa u liječenju moždanog udara se temelji na transplantaciji stanica. U većini istraživanja se koriste slijedeća četiri tipa stanica: embrionalne matične stanice, živčane matične stanice, mezenhimske matične stanice te inducirane pluripotentne matične stanice (HAO i sur., 2014.).

Embrionalne matične stanice se izoliraju iz embrioblasta blastociste i posjeduju neograničenu sposobnost samoobnavljanja i diferencijacije u različite tipove stanica. Tako su WEI i sur. (2005.) transplantirali embrionalne stanice miša u korteks štakora zahvaćen fokalnom ishemijom. Stanice su se diferencirale i bile su pozitivne na biljege neurona, astrocita i oligodendrocita. Osim diferencijacije stanica, autori opisuju i nastanak endotelnih stanica u središtu lezije iz čega zaključuju da transplantirane stanice sudjeluju i u oporavku krvnih žila. Druga skupina istraživača (CHANG i sur., 2013.) je transplantirala ljudske embrionalne stanice u kontralateralni striatum štakora. Osam tjedana nakon transplantacije, autori su pronašli stanice na granici infarkta. Stanice su bile pozitivne za različite biljege neuronske loze kao što su Nestin, Tuj1, NeuN, TH (tyrosine hydroxylase) iz čega autori zaključuju da transplantirane stanice sudjeluju u rekonstrukciji oštećenog živčanog tkiva nakon moždanog udara. JIN i sur. (2011.) su transplantirali ljudske embrionalne matične stanice u korteks štakora 14 dana nakon distalnog MCAO. U navedenom istraživanju autori su opisali pojačanu endogenu neurogenezu u ipsilateralnoj subventrikularnoj zoni kao i u gyrusu dentatus, dok kontralateralno ova zbivanja nisu zabilježena. Pojačanu endogenu neurogenezu dokazali su bojanjem s doublecortinom i BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridine).

Živčane matične stanice se dobivaju iz embrionalnog telencefalona, telencefalona novorođene životinje (MA i sur., 2015.) ili iz odraslog mozga. U *in vitro* uvjetima ove se stanice, uz dodavanje čimbenika rasta mogu diferencirati u neurone, astrocite i oligodendrocite. Temeljeno na ovom opažanju, može se pretpostaviti kako živčane matične stanice mogu zamijeniti oštećeno tkivo kod raznih bolesti mozga, kao što su neurodegenerativne bolesti i moždani udar (GARZON-MUVDI i QUINONES-HINOJOSA, 2010.). Nakon transplantacije stanica u mozak štakora zahvaćen moždanim udarom zabilježeno je veće preživljenje i sposobnost diferencijacije u neurone embrionalnih matičnih stanica u odnosu na odrasle

živčane matične stanice (HAO i sur., 2014.). Skupina autora (MA i sur.,2015.) navodi da transplantacija živčanih matičnih stanica podrijetlom iz novorođenih miševa pomaže funkcionalni opravak i smanjuje veličinu lezije, a četiri tjedna nakon transplantacije, transplantirane stanice su se diferencirale i neurone i u astrocite.

Mezenhimske matične stanice su heterogena populacija stanica koje se mogu izolirati iz gotovo svih tkiva sisavaca, uključujući koštanu srž, krv, pupkovinu, menstrualnu krv, srce, masno tkivo, skeletni mišić, gušteraču i zubnu pulpu. Sposobnost samoobnavljanja i mogućnost diferencijacije u neurone sugerira moguću primjenu ovih stanica u transplatacijskim istraživanjima moždanog udara (HAO i sur., 2014.). Vrlo često se upotrebljavaju matične stanice iz ljudske pupkovine. Stanice iz pupkovine predstavljaju šaroliku skupinu stanica, odraslih i progenitornih stanica hematopoetskog i nehematopotskog podrijetla. Velika prednost transplantacije ovih stanica, kao i svih mezehimskih stanica je da je prema njima slab imunski odgovor primatelja i nema etičnih dilema u manipulaciji s ovim stanicama (SANBERG i sur., 2005.)

Inducirane pluripotentne matične stanice su stanice dobivene iz somatskih stanica pomoću čimbenika koji potiču dediferencijaciju. Inducirane pluripotentne matične stanice prvi puta su opisali TAKAHASHI i YAMANAKA (2006.) koji su ih dobili iz odraslih fibroblasta, pomoću četiri osnovna čimbenika (Oct3/4, Sox2, c-Myc i Klf4). Ove stanice imaju morfologiju i svojstva poput embrionalnih matičnih stanica i pozitivne su na biljege matičnih stanica. Osim toga ove stanice su vrlo zanimljive u transplatacijskim istraživanjima jer se dobivaju izravno od pacijenta te nema etičkih prepreka u radu s njima, za razliku od embrionalnih matičnih stanica. Velika prednost ovih stanica jest i smanjena imunski reakcija budući da se radi o autotransplantatu.

2.2.1.2. Načini transplantacije stanica

Dva su osnovna načina na koji se stanice mogu transplantirati u mozak: intravaskularno i stereotaksijski. Intravaskularna transplantacija se dijeli na intravensku i intraarterijsku transplantaciju. Prednost ovog načina transplantacije jest to što nije invazivna i nema sekundarnog oštećenja tkiva. Osnovni nedostatak ovog načina transplantacije jest što vrlo mali postotak stanica završi u ciljnom organu. CHEN i suradnici (2001.) navode da je u štakora nakon izazivanja moždanog udara u mozgu detektirano svega 1% transplantiranih stanica. Osim malog broja stanica koji se nakuplja u mozgu, nedostatak ovog načina jest i nakupljanje stanica

u drugim unutrašnjim organima. Tako su GAO i suradnici (2001.) opisali nakupljanje radioaktivno obilježenih mezenhimskih stanica u unutrašnjim organima, ponajviše u plućima štakora nakon intraarterijske i intravenske transplantacije. Kompjuterskom tomografijom također je pokazano da se transplantirane stanice nakupljaju u unutrašnjim organima štakora nakon intravenske transplantacije (MÄKINEN i sur., 2006.; LAPPALAINEN i sur., 2008.). Pretpostavlja se da na nakupljanje stanica u unutrašnjim organima više utječe filtracijska sposobnost organa kao što su pluća, jetra i slezena od tipa transplantiranih stanica ili vremena transplantacije (HICKS i JOLKKONEN, 2009.). MITREČIĆ (2011.) navodi da iako manji broj intravaskularno transplantiranih stanica dođe do ciljanog tkiva u odnosu na intraparenhimski transplantirane stanice, njihovo preživljenje i utjecaj na tkivo kompenziraju početno manji broj. Autor navodi pet čimbenika koji znatno utječu na prisutnost intravaskularno transplantiranih stanica u mozgu, a to su: promjer stanica i krvnih žila, svojstva stanične adhezije, priprema stanica prije transplantacije te propusnost barijere krv-mozak. Zaključno, autor smatra da je za uspješnu intravaskularnu transplantaciju potrebno koristiti stanice što manjeg promjera, vazodilatatore, a u postupcima sa stanicama prije transplantacije biti što nježniji.

Drugi način transplantacije stanica jest strotaksijska transplantacija u mozak životinje. Prednost ovog načina transplantacije jest velika preciznost pri transplantaciji stanica te mogućnost unosa velikog broja stanica na željeno mjesto. Samo mjesto transplantacije je pri tom još uvijek predmet istraživanja: tako pojedine istraživačke grupe transplantiraju stanice u središte lezije, drugi izabiru pristup u kojem se stanice transplantiraju u blizini ozljede, a treći način je transplantacija razmjerno udaljena od ozljede, pri čemu važnu ulogu u selekciji stanica tada ima prirodna migracija i dolazak na područje ozljede.

KELLY i suradnici (2004.) opisali su transplantaciju ljudskih fetalnih živčanih matičnih stanica u korteks štakora sedam dana nakon moždanog udara. Prema navedenom istraživanju stanice su preživjele u mozgu štakora četiri tjedna i migrirale su približno 1,2 mm prema mjestu ozljede, dok je migracija u suprotnu stranu znatno manja. U kontrolnih životinja transplantirane stanice su se zadržale na mjestu transplantacije. Veliki broj ljudskih fetalnih živčanih matičnih stanica koje se nalaze u blizini ozljede je β 3-tubulin pozitivan, dok je manji broj stanica GFAP pozitivan.

DARSALIA i sur. (2011.) opisuju transplantaciju živčanih matičnih stanica, podrijetlom iz fetalnog ljudskog striatuma. Stanice su transplantirane u obliku neorosfera i praćena je njihova migracija od mjesta transplantacije i diferencijacija u zrele neurone. Autori su transplantirali stanice u različitom vremenskim točkama od moždanog udara. Četrdeset i osam

sati nakon ozljede veće je preživljenje stanica u odnosu na vremensku točku od šest tjedana, ali odgođena transplantacija nije imala utjecaja na migraciju, diferencijaciju i proliferaciju stanica na mjestu transplantacije.

BÜHNEMANN i suradnici (2006.) opisuju preživljenje embrionalnih matičnih stanica 12 tjedana nakon ozljede. Iako preživljenje nije potpuno, što autori pripisuju imunosnom odgovoru u središtu ozljede, preživjele stanice su izrazito pozitivne na biljege neurona i glija-stanica te su elektrofiziološki aktivne. Osim toga autori su opisali i sinaptičko povezivanje transplantiranih stanica sa tkivom domaćina.

2.2.2. Načini obilježavanja stanica

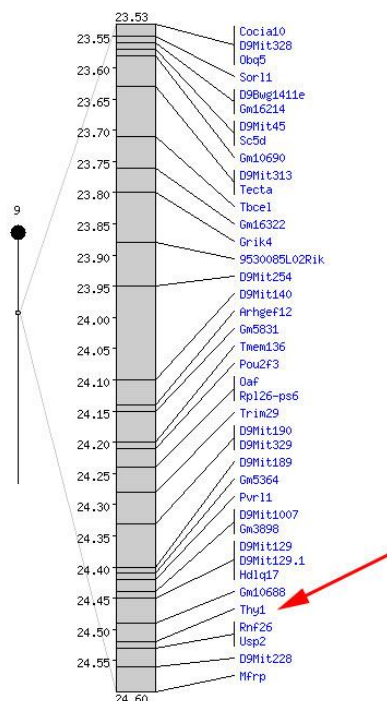
U literaturi su opisani različiti načini obilježavanja stanica koje se koriste u transplantacijskim istraživanjima. Dva su osnovna načina obilježavanja stanica: obilježavanje pomoću egzogene boje ili putem genetske manipulacije, ugrađivanjem fluorescentne bjelančevine koja se izražava u određenim stanicama životinje. Obilježavanje stanica fluorescentnom bojom temelji se na ugrađivanju boje u određeni dio stanice koje se postiže inkubacijom stanica u otopini boje neposredno prije transplantacije. U ovom istraživanju je korištena fluorescentna boja PKH26 - lipofilna boja koja se ugrađuje u membrane stanice (MODO i sur., 2009.).

Obilježavanje stanica genetskom manipulacijom se najčešće temelji na zelenoj fluorescentnoj bjelančevini (*engl.* green fluorescent protein, GFP) ili njenim spektralnim varijantama, opisanim u brojnim istraživanjima (CHALFIE i sur., 1994.; MURRAY i sur., 1998.; KNOBEL i sur., 1999.; RODRIGUEZ i sur., 1999; FENG i sur., 2000.; HIGASHIJIMA i sur., 2000.). Princip takvog označavanja jest postojanje transgenične životinje u kojoj je izražaj nekog gena vezan uz izražaj fluorescentne bjelančevine. Tako je moguće izolirati matične stanice iz takve životinje i pratiti izražaj bjelančevine u uvjetima *in vitro* (CORTI i sur., 2006.), *in vivo* (FENG i sur., 2000.) te nakon transplantacije u domaćina.

Oba pristupa imaju prednosti, ali i nedostatke. Potencijalni nedostatak pristupu u kojem se stanice obilježavaju fluorescentnom bjelančevinom jest veličina bjelančevine koja može utjecati na fiziološke procese životinje (COMLEY i sur., 2011.). S druge strane, neka istraživanja su potvrdila da utjecaj fluorescentnih bjelančevina ne utječe na fiziološke procese stanice (FENG i sur., 2000.; HUANG i sur., 2000.). Nasuprot tome, velika prednost ovog načina obilježavanja je u tome što je relativno jeftino, pod pretpostavkom da imamo životinju s ugrađenom bjelančevinom. Mišji sojevi se međusobno dosta razlikuju prema izražaju fluorescentne bjelančevine, pa možemo razlikovati sojeve koji izražavaju bjelančevinu o određenom postotku stanica i sojeve koji izražavaju bjelančevinu u svim stanicama. Nedostatak obilježavanja stanica egzogenim fluorescentnim bojama jest u tome što sve boje imaju određeni životni vijek, nakon kojega se raspadaju. Osim toga, uzastopnim staničnim diobama boja se raspodjeljuje na više stanica pa intenzitet signala vremenom slabi (MODO i sur., 2009.).

2.3. THY1

Thy1 antigen je mali glikoprotein koji se nalazi na površini stanica mozga i timocita u glodavaca, a znatno manje u drugim tkivima. U miša se pojavljuju dva alotipa, Thy1.1 i Thy1.2, a kodira ih gen koji se nalazi na 9. kromosomu (Slika 2.). Gen *Thy1* je sličan ostalim članovima natporodice imunoglobulina, a njegov promotor ima karakteristike takozvanog „housekeeping“ promotora jer se nalazi u metilacijski slobodnoj nakupini (GIGUERE i sur., 1985.; SPANOPOULOU i sur. 1991.). Izražaj gena *Thy1* je najjači u stanicama živčanog i limfnog sustava. Dok je njegova uloga u oba sustava nejasna, primijećeno je da u živčanom sustavu izražaj gena *Thy1* raste sa stupnjem diferencijacije neurona (FENG i sur., 2000.).



Slika 2. Položaj Thy1 gena na 9. kromosomu. Preuzeto i prilagođeno s: <http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:98747>

FENG i sur. (2000.) su razvili miša koji u svojim živčanim stanicama izražava zelenu fluorescentnu bjelančevinu (*engl.* green fluorescent protein, GFP) ili jednu od njezinih spektralnih varijanti (zelena, žuta, crvena i zeleno-plava) pod utjecajem neuron-specifičnog promotora *Thy1* gena. Bjelančevina Thy1 nalazi se na površini nekih stanica (T-stanice, timociti, neuroni, endotelne stanice i fibroblasti), a sudjeluje u brojnim staničnim procesima (međustanične interakcije, apoptoza i adhezija). Dosadašnjim analizama učinjenim u samo

nekoliko točaka je pokazano da je tijekom ranog embrionalnog razvoja izražaj *Thy1* u neuronima slab, ali se pojačava sazrijevanjem stanica (BARLOW i HUNTLEY, 2000.; REGE i HAGOOD, 2006.). Do danas je razvijeno 25 sojeva miševa koji izražavaju fluorescentne bjelančevine u živčanim stanicama pod utjecajem neuron-specifičnog promotora *Thy1* gena, a svaki soj ima jedinstven način izražaja bjelančevina. Od navedenih 25 sojeva, njih 9 izražava žutu fluorescentnu bjelančevinu (*engl.* yellow fluorescent protein, YFP), 8 ih izražava zelenu fluorescentnu bjelančevinu (*engl.* green fluorescent protein, GFP), a 8 ih izražava zeleno-plavu fluorescentnu bjelančevinu (*engl.* cyan fluorescent protein, CFP). U dvadeset i jednom mišjem soju, svi ili gotovo svi terminalni motorni neuroni su YFP pozitivni, dok su u preostala četiri soja (YFP-H, GFP-S, GFP-M i CFP-S) pozitivni samo određeni neuroni. U Tablici 1. (FENG i sur., 2000.) je prikazan izražaj YFP u nekoliko reprezentativnih područja živčanog sustava odraslih životinja svih devet sojeva. Zahvaljujući pozitivnosti samo određenih neurona, skupina autora (KELLER-PECK i sur., 2001.) napravili su analizu izražaja YFP u motornim neuronima dva soja (YFP-H i GFP-S) tijekom prva dva tjedna postnatalnog života. U najvećem broju istraživanja na ovim sojevima koristio se soj YFP-H, na kojem su CARTER i suradnici (2008.) opisali degenerativne promjene i oporavak koji se zbivaju nakon ozljede kralježnične moždine. Osim u istraživanjima živčanog sustava, ovi mišji sojevi upotrebljavaju se i u istraživanjima tumora, upalama kao i u cijeljenju rana (JOSVAY i sur., 2014.). Također je objavljena studija gdje je ovaj soj korišten u analizi međustaničnog transporta, kao i održavanju volumena stanične tekućine (BATTI i sur., 2013.).

Ovo istraživanje provedeno je na soju B6.Cg-Tg(*Thy1*-YFP)16Jrs/J (YFP-16). Velika prednost transgeničnih životinja s izražajem ove bjelančevine jest činjenica da je YFP izražen u svim dijelovima stanice (jezgra, tijelo živčane stanice i nastavci, uključujući i trnove – spine) što omogućuje vizualiziranje čitave stanice (BANNERMAN i sur., 2005.).

Tablica 1. Uzorak izražaja u devet sojeva koji izražavaju žutu fluorescentnu bjelančevinu (THY1 – YFP). Uzorak izražaja određen je na dvije do pet odraslih životinja po soju. Legenda: „svi“ izražaj u >80% (uglavnom 100%) neurona, „mnogi“ izražaj u 10–80% neurona, „nekoliko“ izražaj u <10% neurona „–“ nema izražaja. Brojevi u stupcu korteks označavaju slojeve u kojem se nalaze pozitivni neuroni. „A“ amakrine stanice, „B“ bipolarne stanice, „INL“ (*engl.* inner nuclear layer of retina) unutrašnji sloj jezgara mrežnice, „M“ Mullerove stanice, „mossy“ vlakna unutrašnjeg zrnatog sloja, „pre“ preganglijska vlakna, „post“ postganglijska vlakna, „purk“ Purkinijeve stanice, „molec“ interneuroni molekularnog sloja, „RGC“ (*engl.* retinal ganglion cells) ganglijske stanice mrežnice. Preuzeto i prilagođeno od FENG i sur. (2000.).

soj YFP	motorni aksoni	mrežnica		vratni ganglij		spinalni ganglij	korteks	mali mozak		
		RGC	INL	pre	post			mossy	purk	molec
-12	svi	mnogi	A	–	–	mnogi	5,6	svi	mnogi	nekoliko
-16	svi	svi	A+B	svi	nekoliko	Svi	2–6	svi	–	nekoliko
-21	svi	svi	A	svi	mnogi	Svi	2–6	svi	svi	–
-A	mnogi	mnogi	A	mnogi	–	mnogi	2–6	svi	mnogi	nekoliko
-C	svi	svi	A+B+M	svi	nekoliko	Svi	2–6	svi	–	–
-D	svi	svi	A	svi	–	Svi	2–6	svi	–	nekoliko
-F	svi	mnogi	A	mnogi	–	Svi	2–6	svi	nekoliko	nekoliko
-G	svi	mnogi	A	svi	nekoliko	Svi	2–6	svi	–	–
-H	nekoliko	nekoliko	–	nekoliko	nekoliko	mnogi	5	mnogi	–	–

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Budući da moždani udar, zbog svojih razornih posljedica i nedostatka specifičnog liječenja, predstavlja jedan od najvećih biomedicinskih problema čovječanstva, velika se pozornost pridaje novim terapijskim smjerovima. Temeljem pozitivnih rezultata dobivenih u posljednja dva desetljeća, upotreba matičnih stanica u liječenju moždanog udara predstavlja jedan od pristupa koji najviše obećava. Kako bismo istražili i definirali protokole za liječenje pacijenata, jedno od najvažnijih pitanja na koje moramo imati odgovor jest precizan opis nastanka živčanih stanica iz njihovih transplantiranih prekursora. Ova disertacija je posvećena toj temi, pri čemu važu ulogu imaju transgenične životinje čije stanice se koriste u transplantaciji.

Ovo istraživanje provedeno je na dva visokosrođena mišja soja: B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J (YFP-16) i C57Bl/6NCrl. Budući da soj YFP-16 pomoću promotora *Thy1* gena izražava žutu fluorescentnu bjelančevinu u nekim neuronima, moguće je pratiti nastanak i sva zbivanja s tim stanicama u *in vitro* uvjetima, tijekom embrionalnog razvoja te nakon transplantacije.

Hipoteza ovog istraživanja jest da će matične stanice podrijetla mišjeg soja YFP-16 omogućiti analizu nastanka i diferencijacije živčanih stanica *in vitro*, tijekom normalnog embrionalnog razvoja te usporedbu s odgovarajućim zbivanjima nakon terapijske transplantacije u mozak eksperimentalne životinje. Očekujemo kako se neuroni koji nastaju iz matičnih stanica transplantiranih u mozak životinje zahvaćen moždanim udarom morfološki neće razlikovati od onih koji nastaju tijekom normalnog embrionalnog razvoja.

Kako bi se testirala hipoteza, postavljeni su slijedeći ciljevi disertacije:

1. Opisati nastanak neurona tijekom *in vitro* diferencijacije njihovih staničnih prekursora. Za to će se koristiti izražaj fluorescencije YFP živčanih matičnih stanica dobivenih iz mišjeg soja YFP-16.
2. Opisati nastanak neurona tijekom embrionalnog razvoja miša, koristeći fluorescenciju mišjeg soja YFP-16.
3. Usporediti zbivanja tijekom nastanka neurona iz stereotaksijski transplantiranih matičnih stanica u mozak miša zahvaćen moždanim udarom s njegovom zdravom kontrolom i rezultatima dobivenima tijekom analize embrionalnog razvoja i *in vitro* diferencijacije stanica. Za to će se koristiti fluorescencija mišjeg soja YFP-16.

4. MATERIЈAL I METODE

4.1. Pokusne životinje

U ovom istraživanju upotrijebljeni su mišji zameci i odrasli miševi dva visokosrodna mišja soja: B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J (YFP-16) i C57Bl/6NCrl. Za potrebe istraživanja upotrijebljene su gravidne ženke i njihovi zameci soja YFP-16, dok su odrasli mužjaci iz soja C57Bl/6. U istraživanju je upotrijebljeno 60 miševa: 15 gravidnih ženki za izolaciju zametaka, 5 gravidnih ženki za izolaciju živčanih matičnih stanica, 20 mužjaka za izazivanje moždanog udara i transplantaciju stanica (4 skupine po 5 životinja) te 20 mužjaka kojima su transplantirane stanice (zdrave kontrole). Svi postupci sa životinjama provedeni su skladu s Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13) te imaju dozvolu etičkog povjerenstva Medicinskog (Ur. broj: 04-77/2010-238) i Veterinarskog fakulteta (klasa: 640-01/12-17/33; Ur. broj: 251/61-01/139-13-4).

4.2. Postupci sa životinjama

4.2.1. Uzgoj i smještaj životinja

Životinje su smještene u nastambi Hrvatskog instituta za istraživanje mozga, Medicinski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu. Uvjeti smještaja i držanja laboratorijskih i pokusnih životinja propisani su Pravilnikom o zaštiti životinja (NN 47/2001) i Zakonom o zaštiti životinja (NN 135/2006); svjetlosni ciklus je 12 sati svjetlo i 12 sati mrak, hrana i svježa voda su *ad libitum*, temperatura u objektu je 22 ± 2 °C, relativna vlaga $55\% \pm 10\%$, dok je osvjetljenje 300 luksa.

4.2.2. Razmnožavanje životinja

Kako bi dobili zametke odgovarajućeg stadija u kavez s jednim mužjakom stavljene su dvije ženke. Svako jutro ženkama je pregledavana rodnica kako bi se utvrdila prisutnost sjemene tekućine u obliku vaginalnog čepa (*engl.* vaginal plug). Nalaz vaginalnog čepa odgovara početku graviditeta. Budući da se miševi pare tijekom noći, dan kada je nađen vaginalni čep se označava kao 0,5 dan starosti zametaka. Nakon uočavanja vaginalnog čepa, ženke su premještene u nove kaveze i držane su do ulaska u pokus, a mužjaku je u kavez pridružena nova ženka.

4.2.3. Žrtvovanje životinja

Životinje su žrtvovane na dva načina, ovisno u vrsti pokusa za koji su bile namijenjene. Gravidne ženke koje su predviđene za izolaciju živčanih matičnih stanica kao i zametaka u određenim stadijima razvoja, žrtvovane su cervikalnom dislokacijom. Cervikalna dislokacija jest postupak koji u životinja izaziva trenutnu smrt i minimalnu bol. Životinja se fiksira u kaudalnom području glave te uz istovremeno povlačenje repa dolazi do prekida kralježnične moždine u području vrata i trenutne smrti. Nakon žrtvovanja životinja je položena na leđa i očišćena 70% alkoholom. Nakon otvaranja trbušne šupljine izolirani su rogovi maternice sa zametcima i premješteni u sterilnu peterijevu posudu napunjenu HBSS puferom (Hanks Balanced Salt Solution, Gibco by life Technologies, 14175095). Zametci predviđeni za određivanje razvoja živčanih stanica tijekom embrionalnog razvoja, odvojeni su od ovojnice i nekoliko minuta ostavljeni u puferu kako bi se riješili što više krvi. Nakon toga premješteni su u 4% PFA (paraformaldehid). Nasuprot tome, rogovi maternice čiji su zametci predviđeni za izolaciju živčanih matičnih stanica prenijeti su u sterilnim uvjetima u staničnu kulturu. Postupak izolacije živčanih matičnih stanica opisan je u poglavlju 4.3.1.

Mužjacima kojima su transplantirane stanice rađena je transkardijalna perfuzija. Neposredno prije žrtvovanja životinje su intraperitonealno anestetizirane pojačanom dozom avertina (2,2,2-Tribromoethanol, T48402-5G, SIGMA). Nakon toga životinje su položene na leđa, očišćene su 70% alkoholom te im je kirurškim škalicama otvorena trbušna i prsna šupljina. Opisanim načinom također dolazi do brze i bezbolne smrti. Kirurškim škalicama prerezana je desna aurikula srca, a u lijevu klijetku srca polagano je injicirano do 30 mL PBS-a (*engl.* phosphate buffered saline) kako bi se isprala sva krv iz životinje. Nakon pufera, na isto mjesto injicirano je do 30 mL 4% PFA.

4.2.4. Određivanje dobi zametka

Dob zametaka određena je praćenjem vaginalnih čepova, pri čemu se nalaz vaginalnog čepa označava kao 0,5 dan razvoja. Starost zametaka je dodatno potvrđena promatranjem vanjskih obilježja zametka, brojanjem somita te usporedbom s razvojnim stadijima opisanim u literaturi (ROBERTS, 1968.; THEILER, 1989.; ANONYMOUS, 2015.).

4.2.5. Operativni zahvati na životinjama

4.2.5.1. Izazivanje ishemijskog moždanog udara

Ishemijski moždani udar u miša izazvan je pomoću privremenog jednostranog začepjenja srednje moždane arterije (*engl.* Middle Cerebral Artery Occlusion, MCAO) u trajanju od 60 minuta. Metoda je standardizirana i opisana u brojnim istraživanjima (BELAYEV i sur. 1999.; BEAULIEU i sur. 2002.) kao najprihvatljiviji model ishemijskog oštećenja mozga u miša. Operacija je izvedena pod inhalacijskom anestezijom, mješavinom 2% izoflurana u 100% kisiku. Tjelesna temperatura životinje održavana je grijanom podlogom kako bi uklonili eventualni utjecaj varijacija temperature tijela na veličinu ozljede (MIYAZAWA i sur. 2003.). Nakon uspavljivanja, životinja je položena i fiksirana na leđa. Neposredno prije operacije ventralna površina vrata očišćena je 70% alkoholom. Kirurškim škarcama načinjen je medijani rez na vratu, razmaknuto je vezivno tkivo i žlijezde slinovnice te je ispreparirana zajednička karotidna arterija (a. carotis communis) zajedno s njezinim granama. Tijekom prepariranja posebna pozornost je pridana živcima (n. vagus i n. laryngeus recurrens) kako ne bi došlo do njihovog oštećenja. Nakon prepariranja krvnih žila, na zajedničku karotidnu arteriju postavljen je prvi privremeni čvor. Drugi, trajni čvor, postavljen je na vanjskoj karotidnoj arteriji, što je kranijalnije moguće. Treći labavi čvor postavljen je također na vanjskoj karotidnoj arteriji, kaudalnije od drugog čvora, a kranijalno od račvanja zajedničke karotidne arterije. Nakon postavljanja čvorova, protok u unutrašnjoj karotidnoj arteriji privremeno je zaustavljen postavljanjem samozatvarajuće pincete. Između drugog i trećeg čvora, malim kirurškim škarcama, učinjen je rez kroz koji je u vanjsku karotidnu arteriju uveden filament odgovarajuće veličine (Doccol company). Filament je uveden iz vanjske karotidne arterije u zajedničku karotidnu arteriju. Tijekom uvođenja filameta, treći čvor se blago pritegne kako bi što više približio stijenke žile filamentu. Nakon toga vanjska karotidna arterija je u potpunosti prerezana kako bi se omogućilo što lakše uvođenje filameta u unutrašnju karotidnu arteriju. Blagim pritiskom, uklonjena je samozatvarajuća pinceta s unutrašnje karotidne arterije, a filament se polaganim izvlačenjem i okretanjem uvodi u unutrašnju karotidnu arteriju. Laganim uvođenjem filameta u kranijalnom smjeru, filament polagano ulazi na bazi lubanje u Willisov krug (circulus arteriosus cerebri). Filament se uvodi sve dok se, tijekom uvođenja, nije osjetio otpor. Kada je filament uveden na takav način onemogućio je protok krvi kroz srednju moždanu arteriju (a. cerebri media) i dovodi do ishemije područja njezine opskrbe. Smatra se da je filament na dobrom mjestu ako je uveden 10 mm od račvanja zajedničke karotidne arterije.

Kada je filament namješten, treći čvor se stegne kako ne bi došlo do njegovog izvlačenja. Rana je zatvorena metalnim kopčama, a miš se stavlja u grijani kavez tijekom 60 minuta. Tijekom ovog razdoblja praćeno je ponašanje životinja.

Nakon 60 minuta životinja se ponovno uvodi u inhalacijsku anesteziju, fiksira se na leđa kao i tijekom operacije. Skidaju se metalne kopče te su pažljivo razmaknute žlijezde slinovnice. Treći čvor je potom, lagano otpušten, a filament se polagano izvlači iz žile. Kada je filament izvučen dovoljno kaudalno, na unutrašnju karotidnu arteriju ponovno je stavljena samozatvarajuća pinceta kako bi se spriječilo iskrvarenje, a filament se u potpunosti vadi iz krvnih žila. Nakon vađenja filameta, treći čvor se čvrsto stegne, a samozatvarajuća pinceta otpušta se sa unutrašnje karotidne arterije. Prvi čvor na zajedničkoj karotidnoj arteriji također je otpušten te je ponovno uspostavljen protok krvi. Rana na vratu sašivena je kirurškim koncem, a životinjama je intraperitonealno aplicirano 0,5 mL fiziološke otopine i analgetik buprenorfin (0,03 mg/kg). Životinja je potom vraćena u grijani kavez tijekom 24 sata. Nakon operacije, hrana i voda su *ad libitum*, s time da je hrana prethodno namočena.

Operacija je izvedena pod disekcijskim mikroskopom (Zeiss, Stemi DV4 Spot) s hladnim izvorom svjetla. Instrumenti korišteni tijekom operacije jesu: retraktor, dvije pincete (Dumont 5-Dumoxel-B), dvije pincete (Dumont 7-Dumoxel-H), samozatvarajuća pinceta (FST by Dumont NO), kirurške škariće, male kirurške škariće (FST 15000-02), dva iglodržača, metalne kopče za zatvaranje rane (FST 12032-07), konac (6-0, Silk, 4S). Instrumenti su sterilizirani prije operacije, kao i između pojedinih životinja.

4.2.5.2. Stereotaksijska transplantacija živčanih matičnih stanica

Stereotaksijska transplantacija živčanih matičnih stanica je standardizirana metoda koja se koristi za transplantaciju stanica u mozak miša. Za potrebe ovog istraživanja, stanice su transplantirane dvadeset i četiri sata nakon moždanog udara pomoću uređaja Kopf (model 900LS) i Hamilton igle volumena 2 μ L (7002KH, ga25/70mm/pst2). Koordinate su određene prema atlasu (HOF i sur., 2000.).

Stanice su pripremljene u staničnoj kulturi kako je opisano u poglavlju 4.3.4.1.

Prije početka operacije operacijsko polje i svi instrumenti su očišćeni i sterilizirani. Za anesteziju je intraperitonealno aplicirana 2,5% otopina avertina (2,2,2-Tribromoethanol, T48402-5G, SIGMA) u koncentraciji 0,5 g/kg tjelesne težine. Nekoliko minuta nakon aplikacije anestetika životinjama je provjerena budnost, blagim stiskom prstiju stražnjih udova pincetom. Nakon toga miš je smješten u stereotaksijski uređaj, na način da su gornji sjekutići

smješteni, u za njih predviđeni držač te ih se fiksira pomoću držača na nosnom dijelu lubanje. Zatim su namješteni lijevi i desni lateralni držači u sljepoočnom području te je na taj način životinja u potpunosti fiksirana.

Nakon fiksiranja životinje, 70% alkoholom očišćeno je operacijsko polje te je pomoću kirurških škarića na tjemenom području glave napravljen rez na koži dužine 1,5 cm. Razmicanjem kože i potkožnog tkiva identificirana je bregma te su u odnosu na nju određene koordinate. Koordinate, mjesto transplantacije i volumen suspenzije stanica prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Stereotaksijske koordinate, mjesto transplantacije i volumen suspenzije stanica.

Anterio-posteriorna (AP)	Medio-lateralna (ML)	Dorzo-ventralna (DV)	Mjesto transplantacije	Volumen suspenzije stanica
-1,3	+2,0	-1,5	ipsilateralno	1 μ L
-1,3	-2,0	-1,5	kontralateralno	1 μ L

Nakon određivanja mjesta transplantacije, bušilicom je probušen svod lubanje. Hamilton igla smještena je u stereotaksijski uređaj te je u nju navučena suspenzija stanica. Iгла je potom namještena iznad otvora na lubanji te je lagano spuštена kroz ovojnice mozga do mjesta transplantacije. Suspenzija stanica je polako injicirana kroz 5 minuta. Po završetku injiciranja igla je ostavljena 2–3 minute u mozgu kako stanice ne bi iscurile, a zatim je polagano izvučena iz mozga. Životinja je potom izvađena iz stereotaksijskog uređaja, koža je sašivena kirurškim koncem, a životinja je stavljena u grijani kavez do potpunog razbuđivanja iz anestezije.

Po završetku operacije, svi instrumenti su očišćeni alkoholom i sterilizirani, a Hamilton igla očišćena je 25% otopinom za čišćenje igle (Hamilton cleaning solution cocncentrate, 18311) te je isprana sa sterilnom vodom.

4.3. Postupci sa stanicama

4.3.1. Izolacija živčanih matičnih stanica

Za izolaciju živčanih matičnih stanica upotrijebljene su ženke gravidne 14,5 dana. Nakon žrtvovanja i izolacije gravidnih rogova maternice postupak izolacije živčanih matičnih stanica nastavljen je u sterilnim uvjetima, u laminaru u staničnoj kulturi. Rogovi maternice prebačeni su u sterilnu petrijevku posudu s HBSS puferom. Nakon odvajanja zametka od ovojnice, napravljena je dekapitacija te je pažljivo odvojen telencefal. Izdvojeni telencefaloni su mehanički usitnjeni škalicama te su nakon toga premješteni u sterilnu tubu (BD Falcon, 50 mL). Na usitnjeno tkivo dodano je 5 mL akutaze (StemPro®Acutase® Cell Dissociation Reagent, Gibco by life Technologies, A11105-01) kako bi se tkivo proteolitički razgradilo i dobila suspenzija stanica. Usitnjeno tkivo bilo je pod djelovanjem akutaze 20 minuta, na temperaturi od 37 °C. Tijekom tih 20 minuta, tkivo je dodatno usitnjeno mehaničkim provlačenjem kroz nastavak za pipetu. Nakon 20 minuta stanična suspenzija je prebačena u novu tubu i na nju je dodano isto toliko medija kako bi se deaktivirala akutaza te je stavljeno 6 minuta na centrifugu pri brzini od 300 g i temperaturi 21 °C. Nakon centrifugiranja tekući dio je uklonjen, a na talog je dodano 2 mL medija kako bi se stanice međusobno odvojile i oslobodile komadića tkiva koje je zaostalo. U međuvremenu je pripremljen novi medij za uzgoj stanica. U jednu flasku od 75cm² (BD Falcon, 353110) stavljeno je 25 mL medija (DMEM/F-12 (1:1) (1X)+GlutaMAX™-I, Gibco by life Technologies, 31331-028) u koji je dodano 500 µL B-27 (B-27®Supplement (50X), Gibco by life Technologies, 17504-044), 250 µL N-2 (N-2 Supplement (100X), Gibco by life Technologies, 17502-048), 250 µL Pen Strep (Penicillin Streptomycin, Gibco by life Technologies, 15070-063), 50 µL FGFb (Recombinant Mouse Fibroblast Growth Factor-basic, PMG0035) i 50 µL EGF (Recombinant Mouse Epidermal Growth Factor, PMG8041). Stanice u flaskama uzgajane su u inkubatoru na 37 °C i 5% CO₂.

4.3.2. Uzgoj neurosfera

Nakon izolacije, stanice u flaskama stavljene su u inkubator na 37 °C i 5% CO₂. Stanice se u ovim uvjetima uzgajaju do pojave neurosfera. Opisanim načinom uzgoja, uz redovito kontroliranje, stanice se drže dva dana kada iz pojedinačnih stanica, staničnim diobama nastaju neurosfere. Nakon dva dana stanice su ponovno disocirane.

4.3.3. Priprema stanica za pokuse *in vitro*

4.3.3.1. Disocijacija stanica

Uzgojene neurosfere zajedno s medijem premještene su u sterilne tube od 50 mL te su centrifugirane pri brzini od 300 g, 6 minuta na 21 °C. Nakon centrifuge uklonjen je medij, a na stanice su dodana 2 mL akutaze. Stanice su držane pod djelovanjem enzima 10 minuta. Kako bi se razbile veće sfere, suspenzija stanica je desetak puta je promiješana s nastavkom za pipete. Nakon 10 minuta, tekući sadržaj je premješten u novu tubu te mu je dodano 5 mL medija, kako bi se deaktiviralo djelovanje enzima te je stavljeno na centrifugu. Nakon centrifuge, tekući sadržaj je bačen, a stanice su premještene u čiste flaske s medijem, pri čemu je stavljeno pola starog medija, a pola je nadodano novog medija s čimbenicima.

4.3.3.2. Priprema podloga za diferencijaciju stanica

Priprema podloga uključuje pripremu stakala (*engl.* cover slips) promjera 12 mm za diferencijaciju stanica. Stakla su preko noći ostavljena u dušičnoj kiselini, nakon toga su ispirana dva sata sterilnom vodom te su opet preko noći ostavljena u 70% alkoholu. Slijedeći dan su stavljena u sterilizator 12 sati na temperaturi od 250 °C. Na očišćena stakla stavljeno je 130 µL Poly-D-lizina u koncentraciji 500 µg/mL (Poly-D-lysine hydrobromide, SIGMA, P6407-5MG) koji je stajao 24 sata. Nakon ispiranja Poly-D-lizina sterilnom vodom 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) koji je također stajao 24 sata. Laminin je ispran dva puta sa svježim medijem. Na taj način pripremljena stakla spremna su za diferencijaciju stanica.

4.3.3.3. Diferencijacija stanica

Nakon disocijacije, stanice su stavljene u flaske na 5–6 sati do formiranja malih sfera. Nakon toga stanice su centrifugirane i nasadene u koncentraciji 200–250 000 stanica po staklu. Stanice su na diferencijaciju stavljene u novom mediju, bez čimbenika rasta (FGFb i EGF). Na takav način stanice su uzgajane u vremenskim točkama 1, 3, 5 i 7 dana. Nakon 24 sata stanicama je promijenjen medij. Od ukupnog volumena 500 µL medija pipetom je izvučeno 250 µL, a

dodano je 500 μ L novog medija Neurobasal (Neurobasal®Medium (1X), Gibco by life Technologies, 21103-049). Budući da u ovom mediju nema glutamina, dodaje se i antibiotik koji ga sadrži (Pen Strep Glutamine (100X) Gibco by life Technologies, 10370-016).

4.3.3.4. Fiksacija diferenciranih stanica

Nakon određenih vremenskih točaka, stanice su fiksirane s 1 mL 4% PFA kroz 15 minuta. Nakon fiksacije stanice su tri puta isprane PBS-om i ostavljene u frižideru na +4 °C do bojanja s protutijelima.

4.3.3.5. Imunocitokemija

Fiksirane stanice isprane su tri puta po pet minuta PBS-om te im je dodano 500 μ 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 trajalo je 60 minuta, nakon čega je stanicama dodano 85 μ L otopine primarnog protutijela (0,2% triton X-100 u PBS-u + 1% kozjeg seruma + primarno protutijelo) te je ostavljeno u frižideru na +4 °C preko noći. Primarna protutijela, podrijetlo, razrjeđenje i proizvođač, upotrijebljena u ovom istraživanju prikazana su u Tablici 3.

Drugi dan su primarna protutijela isprana PBS-om tri puta po pet minuta. Nakon ispiranja primarnih protutijela na stanice je stavljena otopina sekundarnih protutijela (0,2% triton X-100 u PBS-u + sekundarno protutijelo) te su tako stanice inkubirane dva sata na sobnoj temperaturi u zamračenoj prostoriji. Sekundarna protutijela, podrijetlo, razrjeđenje i proizvođač, upotrijebljena u ovom istraživanju prikazana su u Tablici 4. Nakon dva sata, isprana su sekundarna protutijela, također tri puta po pet minuta te je na stanice stavljena fluorescentna boja za jezgre, DAPI u koncentraciji 1:8000. Nakon deset minuta, DAPI je isprana, također tri puta po pet minuta te su stanice poklopljene medijem za fluorescentno poklapanje (Dako Fluorescent Mounting Medium, S3023). Poklopljeni preparati, ostavljeni su u frižideru +4 °C na sušenju do mikroskopiranja na konfokalnom mikroskopu (Zeiss, LSM 510 Meta).

4.3.4. Priprema stanica za pokuse *in vivo*

4.3.4.1. Obilježavanje stanica fluorescentnom bojom

Stanice koje su pripremljene za *in vivo* pokuse, izolirane su, uzgajane i disocirane na identičan način kako je opisano u prethodnim poglavljima (4.3.1, 4.3.2 i 4.3.3.1.). Fluorescentna boja upotrijebljena u ovom istraživanju jest PKH26 (PKH26GL-1KT, PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for general cell membrane labeling, SIGMA, 081M0964). To je lipofilna boja koja boji stanične membrane. Neposredno prije bojanja, boja je pomiješana s otopinom na bazi etanola prateći upute proizvođača, na 1 mL otopine dodaje se 4 μ L boje. Stanice su držane u otopini za bojanje 5 minuta uz povremeno miješanje nastavkom za pipete. Nakon toga je na suspenziju stanica dodana jednaka količina goveđeg seruma kako bi se blokirao učinak boje te je sve zajedno inkubirano jednu minutu. Kako bismo se riješili boje, stanice su ispirane medijem i centrifugirane tri puta. Nakon zadnjeg centrifugiranja stanice su resuspendirane do koncentracije 10^5 po 1 μ L, te su na ledu prenijete do prostora za stereotaksijsku transplantaciju.

4.4. Postupci s tkivima

4.4.1. Izolacija i fiksacija tkiva

Nakon izolacije i odvajanja ovojnice zameci su isprani u PBS-u, a nakon toga su stavljeni u 4% PFA na 24 sata. Životinjama kojima je rađena transkardijalna perfuzija izoliran je mozak. Životinje su dekapitirane pomoću škarića, zatim je razrezana koža na glavi, a kosti glave medijano su prerezane škarićama. Kada su razmaknute kosti glave, mozak je izvađen iz lubanje pomoću metalne špatule i ostavljen u 4% PFA na 24 sata. Drugi dan tkiva su isprana u PBS-u te su premještena u 10% otopinu saharoze na 24 sata, a potom u 30% otopinu saharoze. Tkiva u 30% otopini saharoze plutaju na površini, nakon tri dana potonu na dno tube i mogu se rezati pomoću kriorezača. Uloga saharoze jest izvući višak tekućine iz tkiva kako se tijekom smrzavanja ne bi stvorili kristali koji bi mogli oštetiti tkivo tijekom rezanja.

4.4.2. Priprema histoloških preparata

Nakon fiksacije i krioprotekcije pomoću saharoze tkiva su uronjena u tekućinu za smrzavanje (Tissue-Tek, OCT Compound Containing 125 mL, 1231400013) te su naglo smrznuta na -80 °C. Uklopljeni blok tkiva zalijepljen je na nosač te je ostavljen na -20 °C kroz sat vremena kako bi se temperirao na temperaturu rezanja. Sva tkiva rezana su pomoću kriorezača (Leica, CM 1850) na rezove debljine 20 µm, a rezovi su postavljeni na pozitivno nabijena stakla (Menzel-Gläser, Superfrost, Thermo Scientific). Narezana tkiva su, do uporabe, pohranjena u frižideru na -20 °C.

4.4.3. Bojenje prema Nisslu

Kako bismo vizualizirali područje mozga oštećeno moždanim udarom, nekoliko stakala s rezovima obojana su prema Nisslu (krezil-violet) (ALVAREZ-BUYLLA i sur., 1990.). Prije samog bojanja preparati su temperirani na sobnoj temperaturi i isprani u PBS-u. Preparati se najprije po dvije minute provedeni kroz silazni niz alkohola (apsolutni alkohol, 96% alkohol i 70% alkohol) i stavljeni u otopinu krezil-violeta kroz dvije minute. Nakon bojanja preparati su isprani u destiliranoj vodi i provedeni kroz uzlazni niz alkohola (70% alkohol, 96% alkohol i apsolutni alkohol). Nakon uzlaznog niza alkohola preparati su prosvijetljeni u ksilenu. Preparati su potom poklopljeni pomoću medija za poklapanje (histomount, National diagnostics), pokriveni pokrovnim stakalcem i ostavljeni na sušenju na sobnoj temperaturi. Nakon sušenja preparati su skenirani običnim skenerom.

4.4.4. Bojenje s trifeniltetrazolium kloridom

Kako bismo oslikali područje oštećeno moždanim udarom mozgovi su bojani s trifeniltetrazolium kloridom (*engl.* TTC staining) (2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride, SIGMA, T8877-5G). Dvadeset i četiri sata nakon MCAO, životinje su žrtvovane cervikalnom dislokacijom. Životinjama kojima je izoliran mozak, stavljen je u nosač predviđen na rezanje te je stavljen na -80 °C na pet minuta kako bi se omogućilo pravilno rezanje. Nakon toga mozak je pomoću odgovarajućih nožića narezan na rezove debljine 1–2 mm. Rezovi su potom premješteni u petrijevu posudu s 2% otopinom trifenoltetrazolium klorida na 37 °C kroz 30 minuta. Nakon bojanja, rezovi su fiksirani 4% PFA i skenirani pomoću običnog skenera.

4.4.5. Imunohistokemija

Stakla s rezovima tkiva su prije postupka imunohistokemije sat vremena držana u eksikatoru kako se prilikom postupka ne bi odljepljivali sa stakala. Rezovi su potom isprani s PBS-om četiri puta po petnaest minuta. Nakon ispiranja je na rezove stavljena otopina za permeabilizaciju i blokiranje nespecifičnog vezanja sekundarnog protutijela (0,2% triton X-100 u PBS-u + 3% kozjeg seruma) tijekom 60 minuta. Inkubacija primarnim protutijelima (0,2% triton X-100 u PBS-u + 2% kozjeg seruma + primarno protutijelo) se odvijala u frižideru na +4 °C preko noći. Primarna protutijela, podrijetlo, razrjeđenje i proizvođač, upotrijebljena u ovom istraživanju prikazana su u Tablici 3.

Primarna protutijela su isprana PBS-om tri puta po deset minuta. Nakon ispiranja primarnih protutijela na rezove je stavljena otopina sekundarnih protutijela (0,2% triton X-100 u PBS-u + sekundarno protutijelo) koja je inkubirana dva sata na sobnoj temperaturi. Budući da su upotrijebljena sekundarna protutijela fluorescentna, inkubacija se zbivala u zamračenoj prostoriji. Sekundarna protutijela, podrijetlo, razrjeđenje i proizvođač, upotrijebljena u ovom istraživanju prikazana su u Tablici 4. Postupak ispiranja sekundarnih protutijela i poklapanja identičan je kao što je opisano u poglavlju 4.3.3.5.

Tablica 3. Primarna protutijela upotrijebljena za imunohistokemiju i imunocitokemiju.

Protutijelo	Podrijetlo	Razrjeđenje	Proizvođač
GFAP	pile	1:250	Abcam (ab4674)
MAP2	pile	1:1000	Abcam (ab5392)
NeuN	miš	1:200	Millipore (MAB377)
Nestin	miš	1:200	Millipore (MAB353)
Sox2	kunić	1:200	Novus Biologicals (NB110-37235)
β3-tubulin	kunić	1:200	Cell Signaling (D71G9)

Tablica 4. Sekundarna protutijela upotrijebljena za imunohistokemiju i imunocitokemiju.

Protutijelo	Razrjedenje	Proizvođač
Alexa Fluor 546 koza anti - miš IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A11003)
Alexa Fluor 546 koza anti - pile IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A11040)
Alexa Fluor 546 koza anti - kunić IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A11010)
Alexa Fluor 633 koza anti - kunić IgG (H+L)	1:500	Invitrogen (A21070)

5. REZULTATI

5.1. Izražaj THY1 – YFP tijekom diferencijacije živčanih stanica *in vitro*

Kako bi se odredio izražaj THY1 – YFP tijekom diferencijacije, stanice su diferencirane 7 dana, te su fiksirane u vremenskim točkama 1, 3, 5 i 7 dana. Nakon fiksacije, stanice su obojane specifičnim primarnim protutijelima kako bi se opisao nastanak i diferencijacija neurona u staničnoj kulturi te odredio broj THY1 – YFP pozitivnih stanica. Za bojanje stanica upotrijebljena su slijedeća protutijela: za matične stanice (Nestin i SOX2), za neurone (MAP2, β 3-tubulin i NeuN) te za astrocite (GFAP). Nestin je karakterističan za živčane matične stanice, ali je pozitivan i u endotelnim stanicama, dok je izražaj SOX2 [poznat i pod imenom: SRY (sex determining region Y)-box 2] specifičan za embrionalne matične stanice. Izražaj MAP2 (*engl.* microtubule-associated protein 2) i β 3-tubulina specifičan je za citoskelet neurona, posebno izražen u nastavcima, dok je izražaj NeuN-a (*engl.* neuronal nuclei) specifičan za jezgre, a u nekim fazama razvoja i citoplazmu neurona. Za obilježavanje stanica astrocitne loze upotrijebljen je GFAP (*engl.* glial fibrillary acidic protein). Kako bi se provjerila specifičnost primarnih protutijela napravljene su i negativne kontrole u svim vremenskim točkama. Postupak imunocitokemije za dobivanje negativne kontrole je identičan klasičnom bojanju, osim što je na stanice umjesto otopine primarnih protutijela stavljena samo otopina 0,2% triton X-100 u PBS-u + 1% kozjeg seruma. Kako nije bilo primarnog protutijela signal se nije imao na što vezati, pa su stanice ostale ne obojane (Slika 8.G-I). Osim diferencijacije stanica u *in vitro* uvjetima, dio stanica uzgajan je i u proliferacijskom mediju kako bi se vidjelo jesu li stanice THY1 – YFP pozitivne i prije same diferencijacije. U proliferacijskim uvjetima vidljiv je mali postotak THY1 – YFP pozitivnih stanica koje se razlikuju u intenzitetu signala.

5.1.1. Izražaj THY1 – YFP tijekom 1. dana diferencijacije stanica

Tijekom prvog dana diferencijacije u staničnoj kulturi se nalaze različite vrste stanica, od potpuno nezrelih stanica pa sve do zrelijih stanica koje su usmjerene prema neuronima. Nezreli oblici stanica su različita oblika, od sitnih okruglih stanica, preko izduženih (vretenastih) stanica pa sve do stanica koje pružaju male nastavke. Takve stanice su izrazito nestin pozitivne i čine 99% stanica tijekom prvog dana diferencijacije (Slika 3.B i C). Tijekom prvog dana diferencijacije jasno se razlikuju progenitorne THY1 – YFP stanice od zrelijih oblika stanica. Progenitorne stanice su znatno sitnije, okruglastog do vretenastog oblika bez nastavaka i zagasito zelene boje dok zreliji oblici pružaju male nastavke i intenzivne su zelene

boje u svim dijelovima stanice, i u tijelu i u nastavcima. Progenitorne THY1 – YFP stanice su nestin pozitivne, za razliku od zrelijih oblika THY1 – YFP stanica koje nisu nestin pozitivne (Slika 3.A i C). Međutim, obje vrste stanica su izrazito SOX2 pozitivne pri čemu se u zrelijim oblicima stanica SOX2 jasno vidi i čitavom dužinom nastavaka (Slika 4.A-C). Zreliji oblici THY1 – YFP stanica su perinuklearno i u nastavcima MAP2 (Slika 5.A-C) i β 3-tubulin (Slika 6.A-C) pozitivni. Iako oba protutijela boje neurone i pokazuju jasnu kolokalizaciju s THY1 – YFP stanicama, signal β 3-tubulina je od prvog dana intenzivniji od signala MAP2. Od ukupnog broja MAP2 i β 3-tubulin pozitivnih stanica njih 22,5% je THY1 – YFP pozitivno tijekom prvog dana diferencijacije *in vitro* (Grafikon 1.). Za razliku od prethodna dva protutijela, NeuN (Slika 7.A-C) boji jezgre neurona, ali ovakvim načinom uzgoja vidljiva je zrnata pozitivnost NeuN-a u jezgri i u nastavcima.

5.1.2. Izražaj THY1 – YFP tijekom 3. dana diferencijacije stanica

Tijekom trećeg dana diferencijacije stanice su izrazito zrelije u odnosu na prvu vremensku točku. U ovoj fazi diferencijacije sve THY1 – YFP stanice su pružile nastavke, prema kojima se mogu razlikovati dvije vrste stanica: jedne imaju oblik bipolarnih neurona koji imaju dva nastavka na suprotnim polovima stanice dok druge stanice pružaju nastavke u svim smjerovima i jasno se može razlikovati akson od dendrita. Broj nestin pozitivnih stanica se smanjio na 70%, a za razliku od prve vremenske točke, ovdje su gotovo sve nestin pozitivne stanice vretenaste, uske i duge (Slika 3.D-F). Sve THY1 – YFP pozitivne stanice su i SOX2 pozitivne, pri čemu se jasno vidi citoplazmatska pozitivnost, perinuklearno i čitavom dužinom nastavaka. SOX2 pozitivne stanice su različitih oblika, od sitnijih stanica, preko izduženih vretenastih stanica koje su počele pružati nastavke pa sve do stanica koje su pružile duge nastavke, ali nisu THY1 – YFP pozitivne (Slika 4.D-F). Stanice MAP2 i β 3-tubulin su različitog izgleda koji se kreće od stanica koje su pružile dva snažna nastavka, pa sve do stanica koje su već pružile više razgranatih nastavaka. Sve THY1 – YFP pozitivne stanice pozitivne su na MAP2 (Slika 5.D-F) i β 3-tubulin (Slika 6.D-F) do samih vrhova nastavaka. Od ukupnog broja MAP2 i β 3-tubulin pozitivnih stanica njih 21,3% je THY1 – YFP pozitivno tijekom trećeg dana diferencijacije *in vitro* (Grafikon 1.). Uočljiva je i citoplazmatska pozitivnost NeuN-a koja se vidi čitavom dužinom nastavaka, ali postoji razlika u intenzitetu signala. Jezgra i veći dio citoplazme boje se sličnog intenziteta, dok je u perifernim nastavcima vidljiva izrazito jaka, zrnata pozitivnost NeuN-a (Slika 7.D-F). U ovoj vremenskoj točki još uvijek nema astrocita.

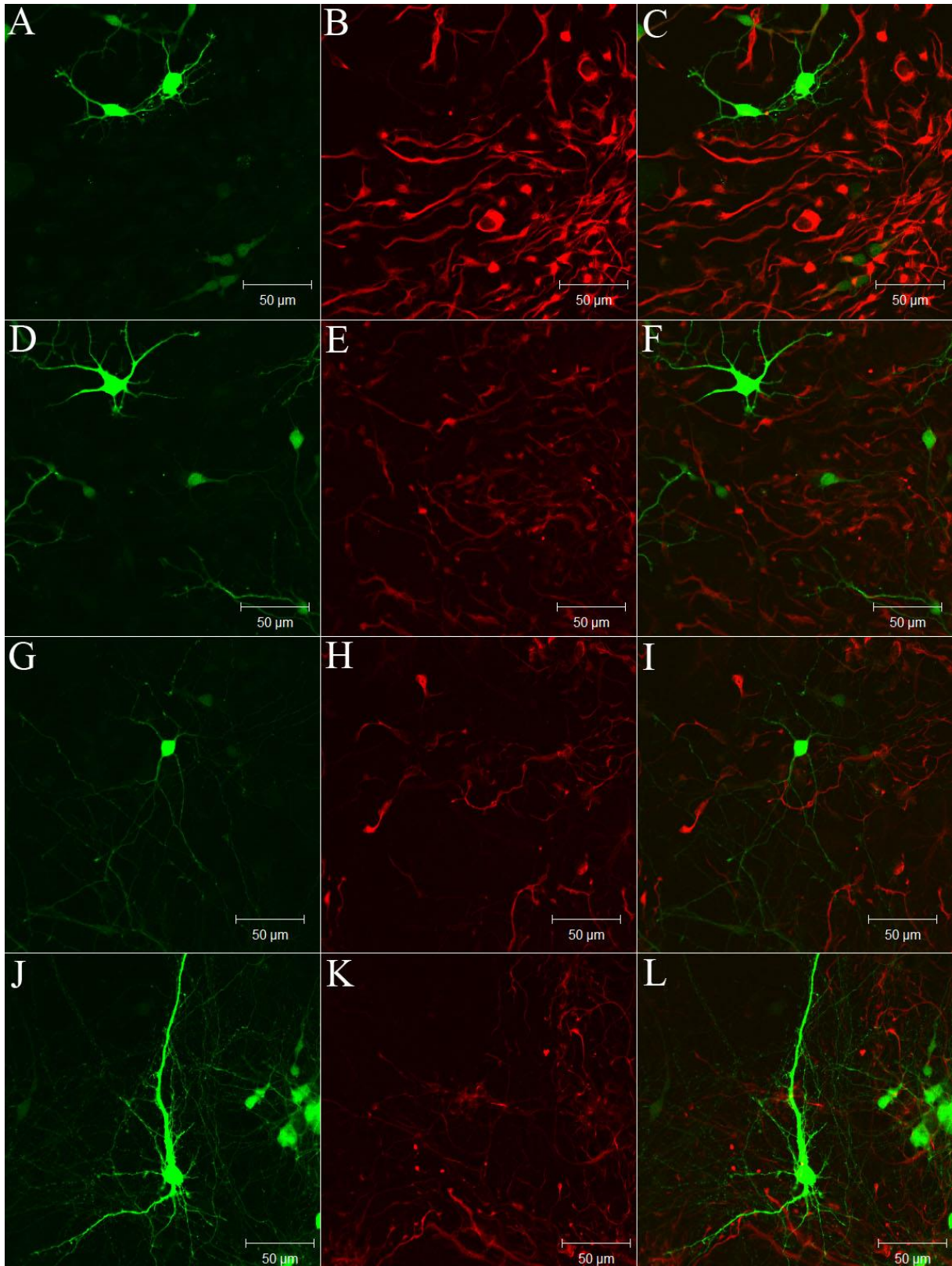
5.1.3. Izražaj THY1 – YFP tijekom 5. dana diferencijacije stanica

Tijekom petog dana diferencijacije stanice su znatno zrelije nego tijekom prethodne vremenske točke. Stanice su pružile velike nastavke i stvorile isprepletene mreže, a na nastavcima THY1 – YFP stanica vide se trnovi – spine. Udio nestin pozitivnih stanica pada na 30%, a izgledaju slično kao i prethodnoj vremenskoj točki (Slika 3.G-I). Stanice pozitivne na biljeg SOX2 imaju različite oblike, slično kao i u prethodnoj vremenskoj točki: od sitnih, okruglastih stanica, pa sve do razgranatih nerurona koji su i THY1 – YFP pozitivni (Slika 4.G-I). Stanice MAP2 (Slika 5.G-I) i β 3-tubulin (Slika 6.G-I) stvorile su guste, međusobno isprepletene mreže, tako da se pojedinačni nastavci ne mogu jasno vidjeti kao na slikama gdje je vizualiziran samo THY1 – YFP signal (Slike 5.G i 6.G). Međutim, budući da se THY1 – YFP izražava u čitavoj stanici, uključujući i jezgru, zahvaljujući protutijelima MAP2 i β 3-tubulinu koji boje citoplazmatske mikrotubule, na stopljenim slikama (Slike 5.I i 6.I) jasno je ograničena jezgra u THY1 – YFP stanica. Od ukupnog broja MAP2 i β 3-tubulin pozitivnih stanica njih 21,9% je THY1 – YFP pozitivno tijekom petog dana diferencijacije *in vitro* (Grafikon 1.). Citoplazmatska pozitivnost NeuN-a toliko je jaka, da se ne mogu jasno razlikovati jezgre od nastavaka koji ih prekrivaju (Slika 7.G-I). Osim stanica pozitivnih na protutijela za matične stanice i za neurone, u ovoj točki diferencijacije pojavljuju se i stanice astrocitne loze koje su GFAP pozitivne. U ovoj vremenskoj točki, astrociti su još uvijek male, slabo razgranate stanice, a od ukupnog boja stanica svega 1% stanica čine astrociti. Kolokalizacija astrocita s THY1 – YFP stanicama nije moguća budući da je izražaj THY1 – YFP specifičan isključivo za neurone (Slika 8.A-C).

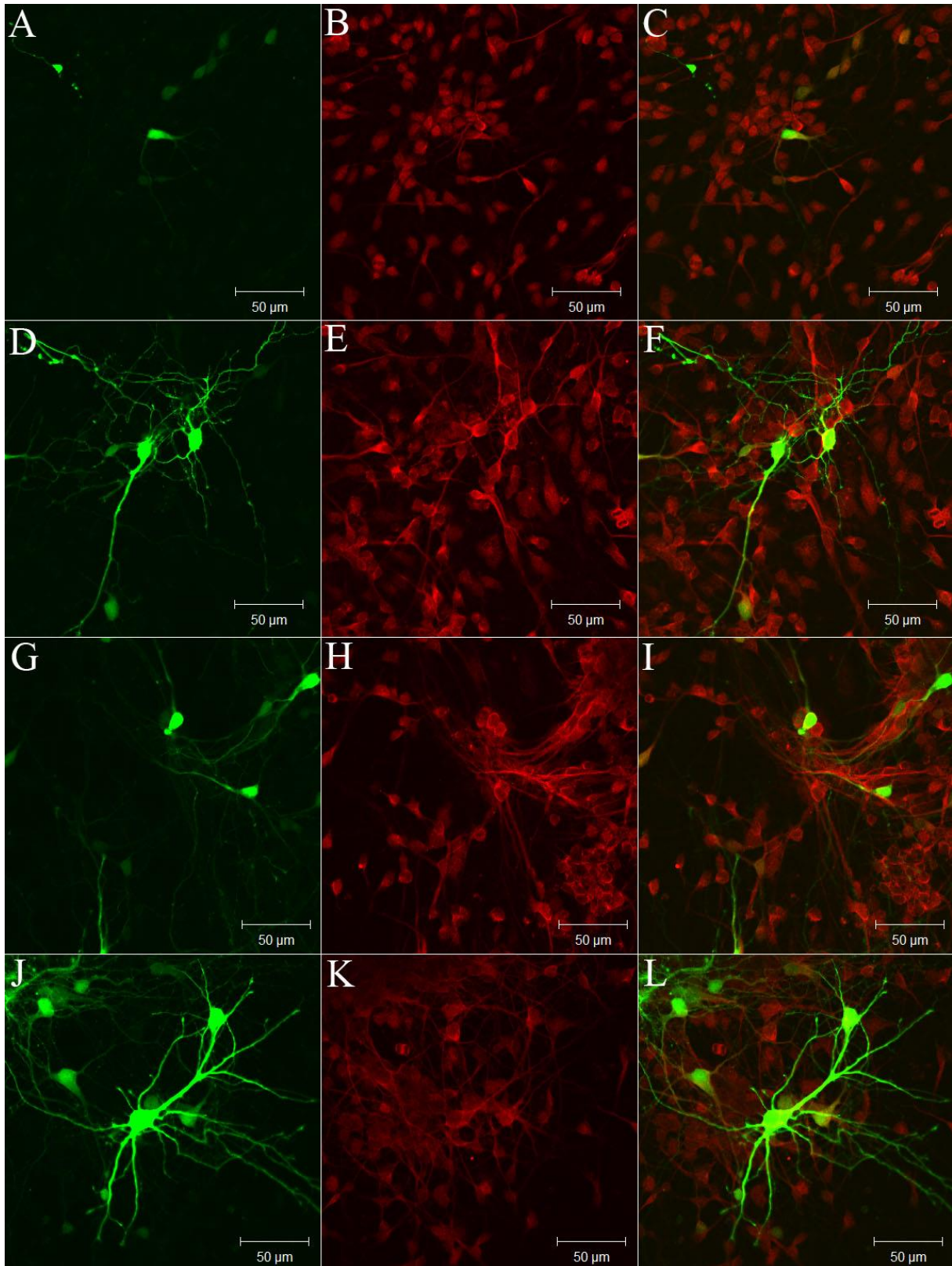
5.1.4. Izražaj THY1 – YFP tijekom 7. dana diferencijacije stanica

Tijekom 7. dana diferencijacije stanice su razvile dugačke nastavke i stvorile guste mreže. Spine – trnovi na THY1 – YFP stanicama razvijenije su nego u prethodnoj vremenskoj točki. Uočljivo je kako 25% stanica tijekom čitavog trajanja diferencijacije ostaje nestin pozitivno i ne razvija se u zrelije oblike stanica već zaostaju vretenastom obliku (Slika 3.J-L) kao što su izgledale od prvog dana diferencijacije. U istom postotku i na isti način ponašaju se SOX2 nezreli oblici stanica, samo za razliku od nestin stanica nisu vretenaste već su okruglaste ili duguljaste s malim nastavcima (Slika 4.J-L). Stanice bojane s MAP2 (Slika 5.J-L) i β 3-tubulinom (Slika 6.J-L) stvorile su još veće mreže koje su se jako ispreplele. Kako bi se označile

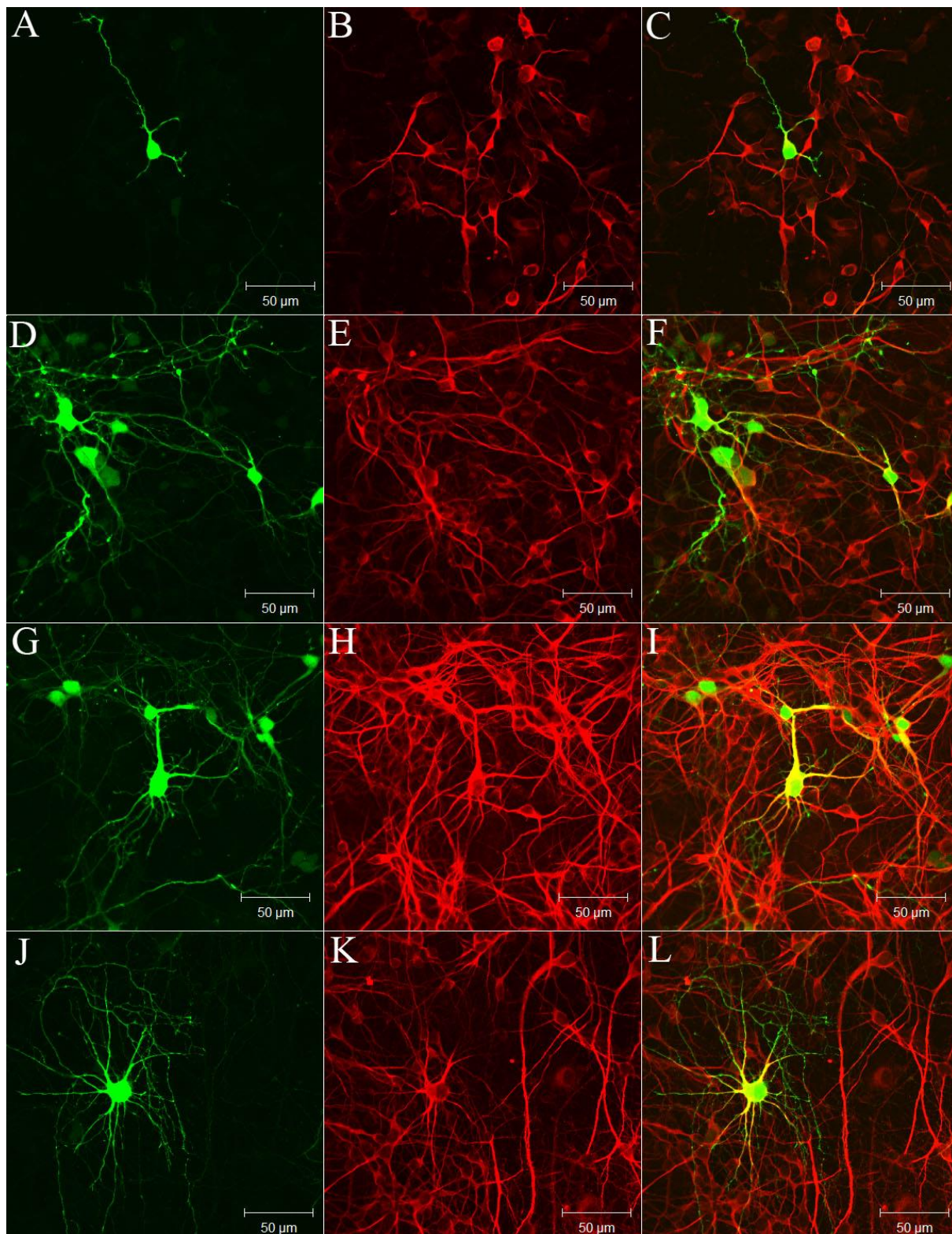
jezgre i pokazala pozitivnost THY1 – YFP u jezgrama stanica, stanice su obojane s DAPI (Slika 10.). Osim pojedinačnog bojanja, napravljeno je i dvostruko bojanje stanica s MAP2 (Slika 9.B) i β 3-tubulinom (Slika 9.C) kako bi se pokazala kolokalizacija oba protutijela s THY1 – YFP stanicama (Slika 9.D). U ovoj točki diferencijacije nema više nezrelih oblika neurona, sve stanice su jako razgranate i međusobno isprepletene. Od ukupnog broja MAP2 i β 3-tubulin pozitivnih stanica njih 21,5% je THY1 – YFP pozitivno tijekom sedmog dana diferencijacije *in vitro* (Grafikon 1.). Citoplazmatska aktivnost NeuN-a još je intenzivnija nego u ranijim vremenskim točkama, a izrazito je naglašena zrnata pozitivnost u nastavcima (Slika 7.J-L). Tijekom 7. dana diferencijacije GFAP pozitivne stanice zrelije su nego u prethodnoj točki diferencijacije, uglavnom su to male košaraste stanice s kratkim nastavcima, a njihov udio porastao je na 3% od ukupnog broja stanica. U ovoj točki diferencijacije još je očitije da nema kolokalizacije između THY1 – YFP i GFAP stanica (Slika 8.D-F). Dvostrukim bojanjem stanica jasno je vidljivo da nema kolokalizacije između THY1 – YFP stanica i GFAP-a (Slika 9.F i H) kao ni između β 3-tubulina (Slika 9.G) i GFAP-a (Slika 9.F-H).



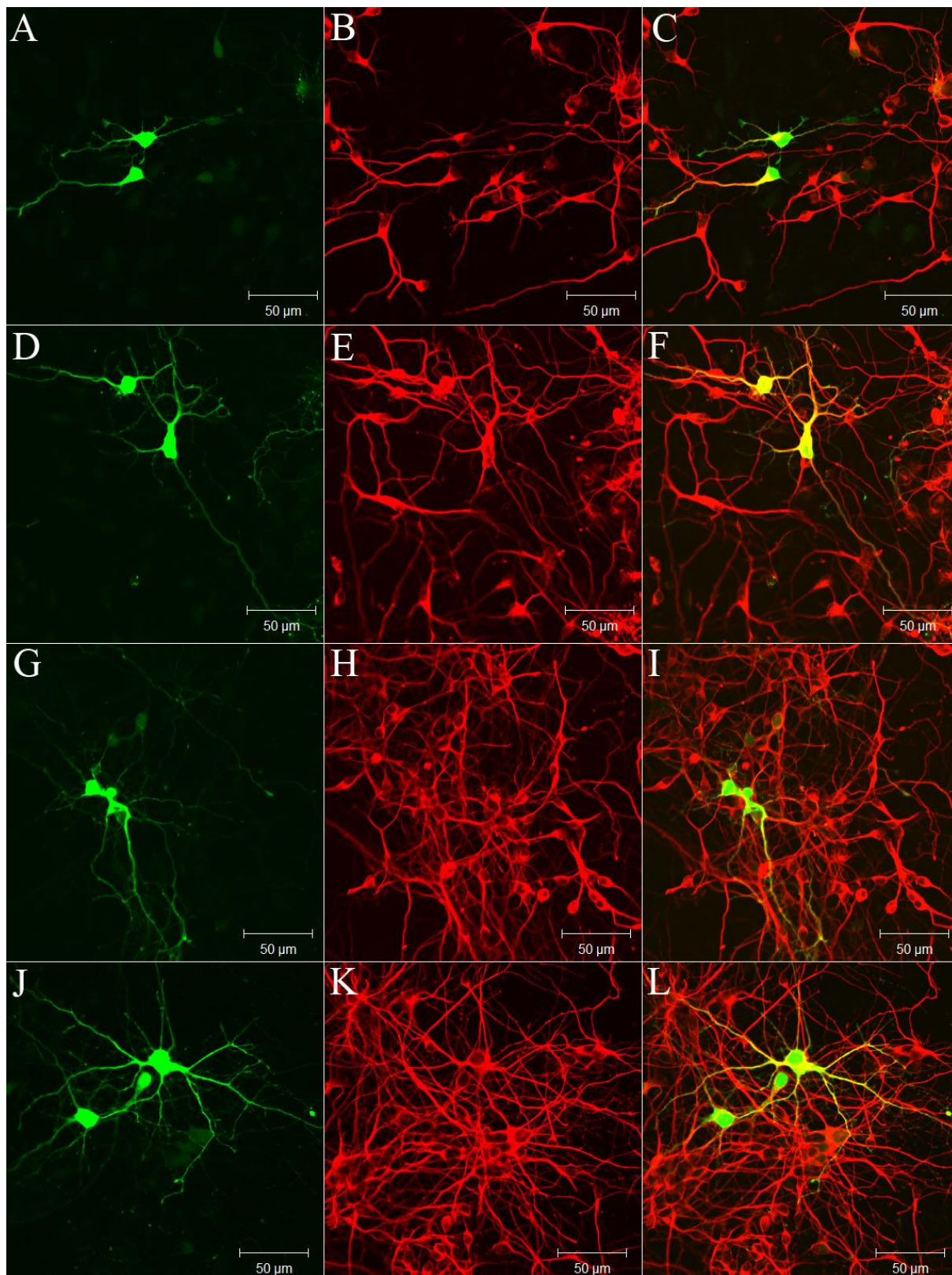
Slika 3. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i nestina (crveni signal) tijekom diferencijacije stanica *in vitro*. Na slikama (A-C) vidi se izražaj THY1 – YFP i nestina tijekom 1. dana diferencijacije. Progenitorne stanice su nestin pozitivne (C), dok zreliji oblici THY1 – YFP stanica nisu. Na slikama (D-F) prikazane su stanice tijekom 3. dana, na slikama (G-I) tijekom 5. dana i na slikama (J-L) tijekom 7. dana diferencijacije.



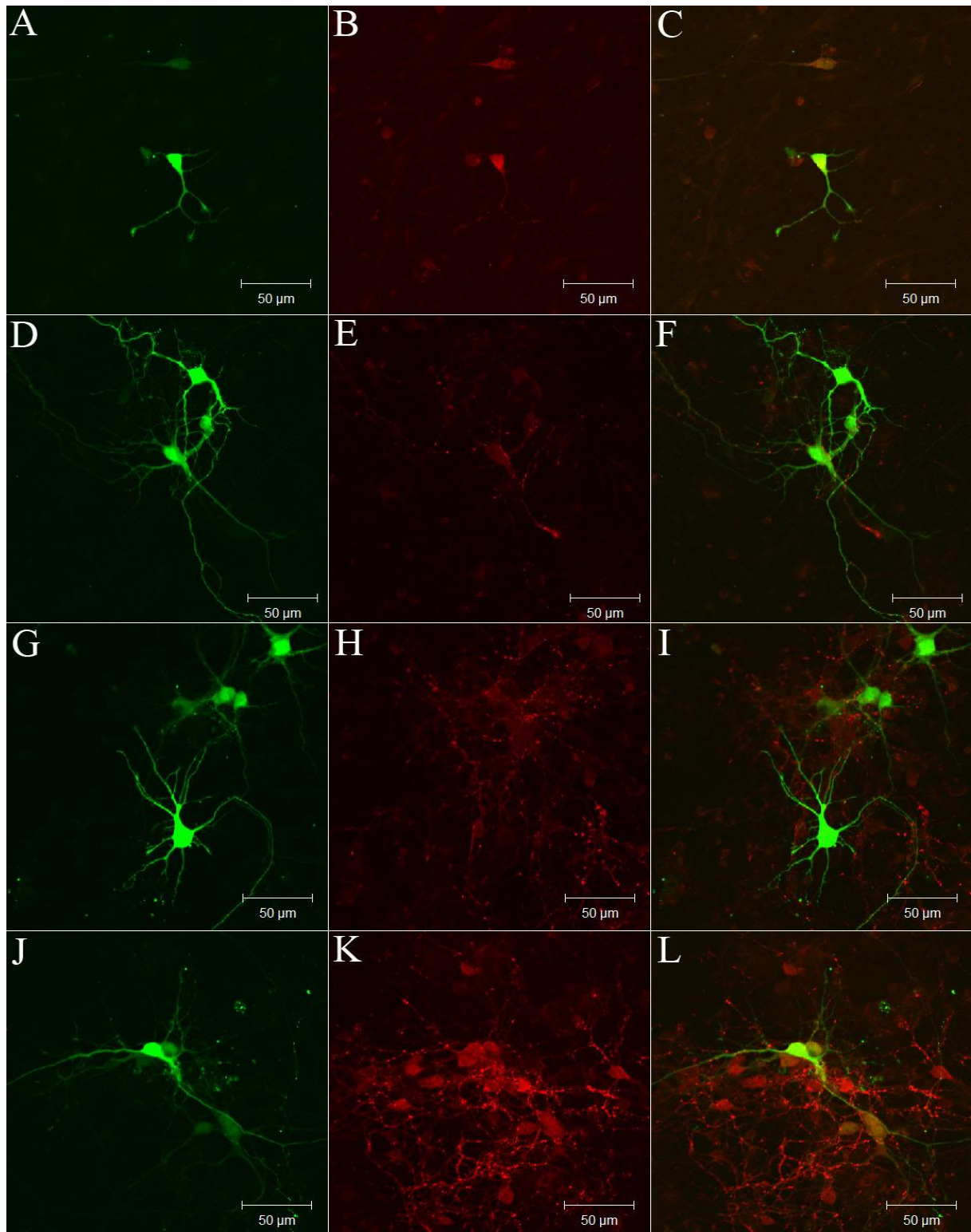
Slika 4. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i SOX2 (crveni signal) tijekom diferencijacije stanica *in vitro*. Na slikama (A-C) vidi se izražaj THY1 – YFP i SOX2 tijekom 1. dana diferencijacije. Na slikama (D-F) prikazane su stanice tijekom 3. dana, na slikama (G-I) tijekom 5. dana i na slikama (J-L) tijekom 7. dana diferencijacije. Tijekom diferencijacije vidljiva je kolokalizacija THY1 – YFP i SOX2 u zrelim i nezrelim oblicima stanica.



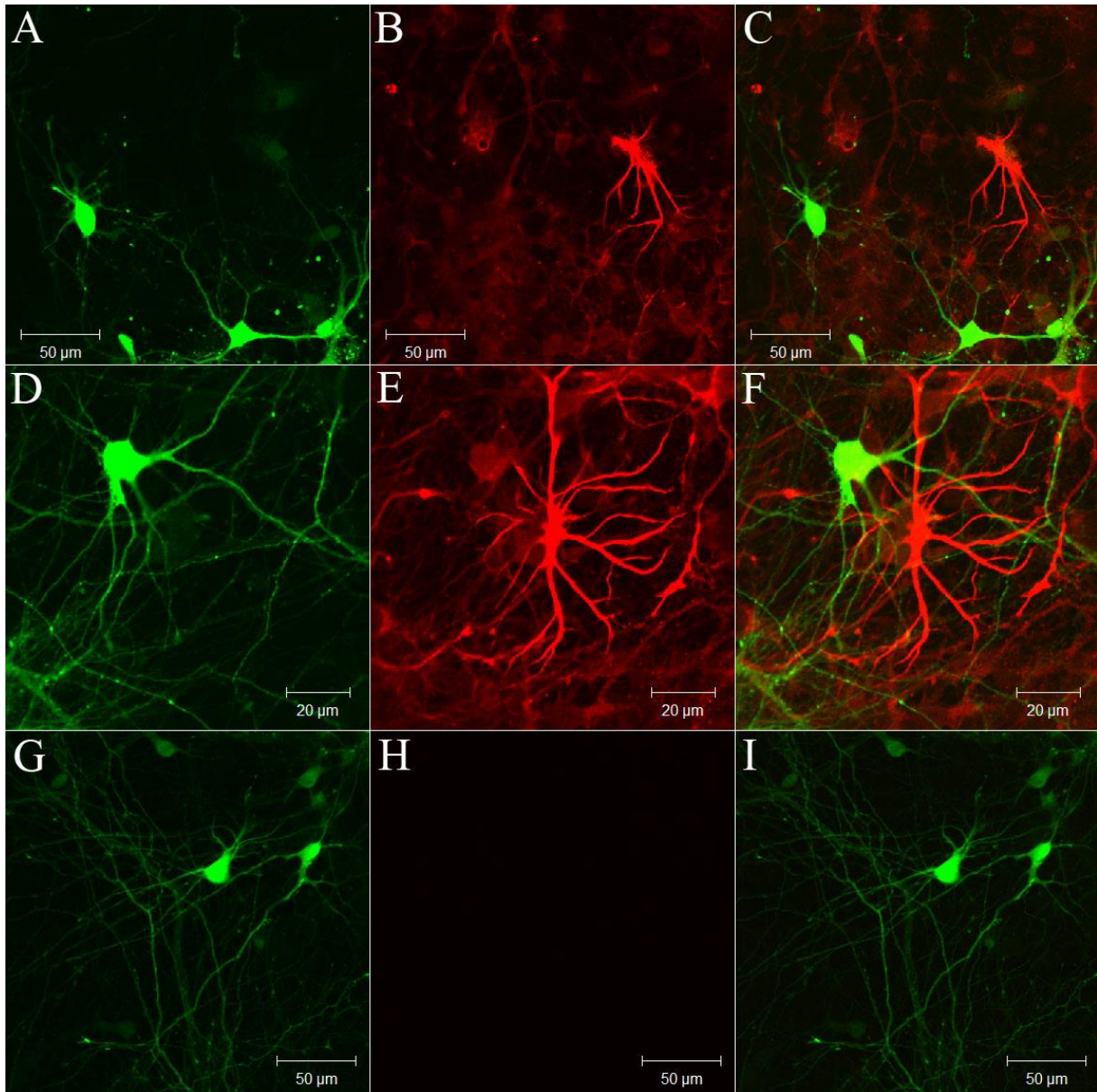
Slika 5. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i MAP2 (crveni signal) tijekom diferencijacije stanica *in vitro*. Na slikama (A-C) vidi se izražaj THY1 – YFP i MAP2 tijekom 1. dana diferencijacije. Na slikama (D-F) prikazane su stanice tijekom 3. dana, na slikama (G-I) tijekom 5. dana i na slikama (J-L) tijekom 7. dana diferencijacije. Tijekom diferencijacije vidljiva je kolokalizacija THY1 – YFP i MAP2 u zrelim i nezrelim oblicima stanica perinuklearno i u nastavcima.



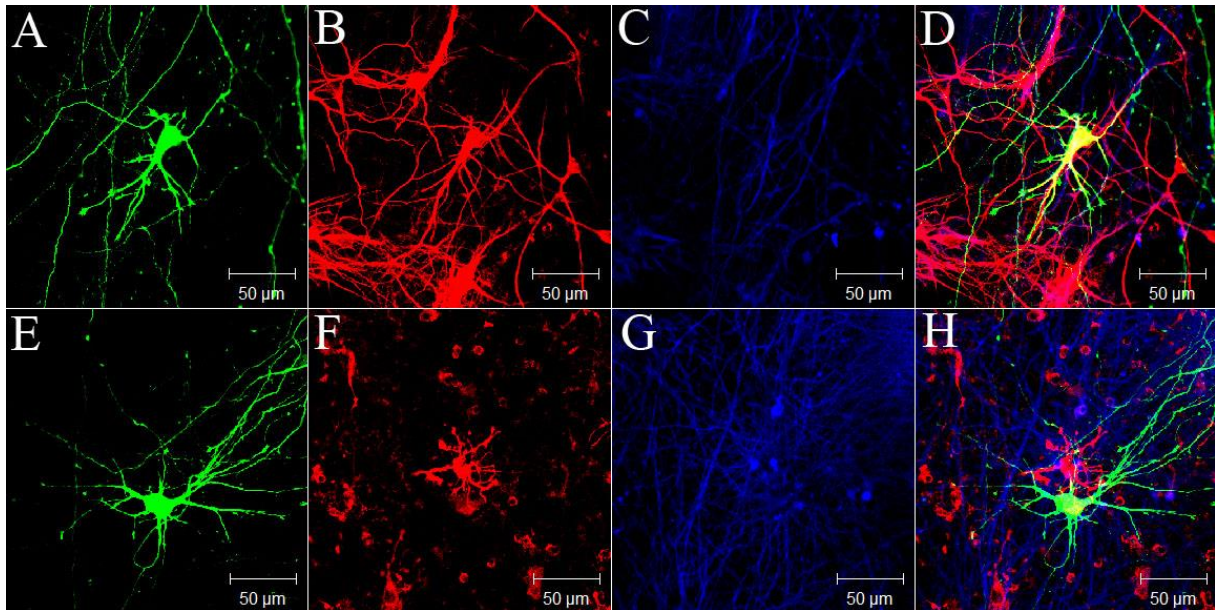
Slika 6. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i β 3-tubulina (crveni signal) tijekom diferencijacije stanica *in vitro*. Na slikama (A-C) vidi se izražaj THY1 – YFP i β 3-tubulina tijekom 1. dana diferencijacije. Na slikama (D-F) prikazane su stanice tijekom 3. dana, na slikama (G-I) tijekom 5. dana i na slikama (J-L) tijekom 7. dana diferencijacije. Tijekom diferencijacije vidljiva je kolokalizacija THY1 – YFP i β 3-tubulina u zrelim i nezrelim oblicima stanica perinuklearno i u nastavcima.



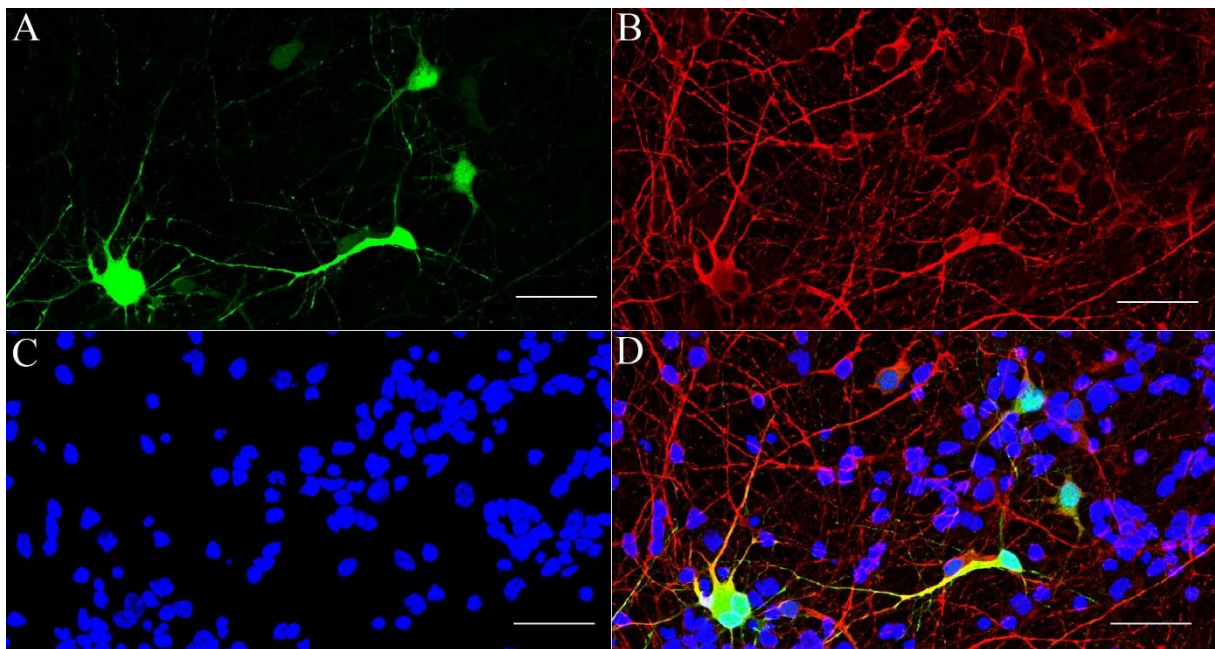
Slika 7. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i NeuN-a (crveni signal) tijekom diferencijacije stanica *in vitro*. Na slikama (A-C) vidi se izražaj THY1 – YFP i NeuN-a tijekom 1. dana diferencijacije. Na slikama (D-F) prikazane su stanice tijekom 3. dana, na slikama (G-I) tijekom 5. dana i na slikama (J-L) tijekom 7. dana diferencijacije. Tijekom diferencijacije vidljiva je izrazita pozitivnost NeuN-a u nastavcima, koja postaje sve jača sazrijevanjem stanica.



Slika 8. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i GFAP-a (crveni signal) tijekom diferencijacije stanica *in vitro*. Na slikama (A-C) vidi se izražaj THY1 – YFP i GFAP-a tijekom 5. dana diferencijacije. Budući da GFAP boji astrocite nema kolokalizacije između THY1 – YFP i GFAP pozitivnih stanica. Na slikama (D-F) prikazane su stanice tijekom 7. dana diferencijacije. Na slikama (G-I) prikazane su THY1 – YFP stanice tijekom 7. dana diferencijacije koje predstavljaju negativne kontrole bojanja, pri čemu se jasno vidi da na slici (H) nema signala jer nije stavljeno primarno protutijelo.

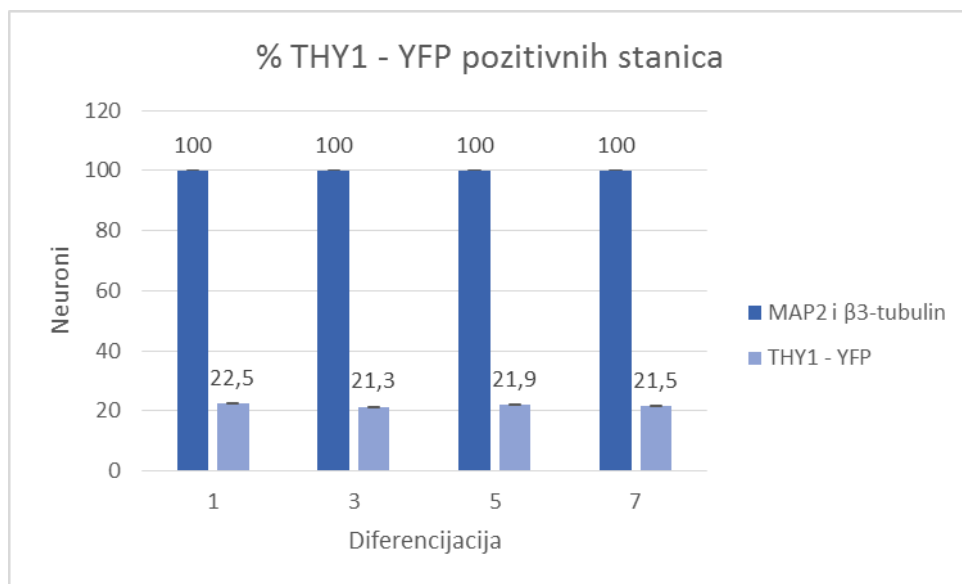


Slika 9. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal), MAP2 (crveni signal, B), β 3-tubulina (plavi signal) i GFAP-a (crveni signal, F) tijekom 7. dana diferencijacije stanica *in vitro*. Na slikama (A-D) vidi se kolokalizacija između THY1 – YFP stanica, MAP2 i β 3-tubulina. Na slikama (F i H) vidi se da nema kolokalizacije između THY1 – YFP stanica i GFAP pozitivne stanice, kao ni između β 3-tubulina i GFAP pozitivne stanice, ali se vidi kolokalizacija između THY1 – YFP stanice i β 3-tubulina.



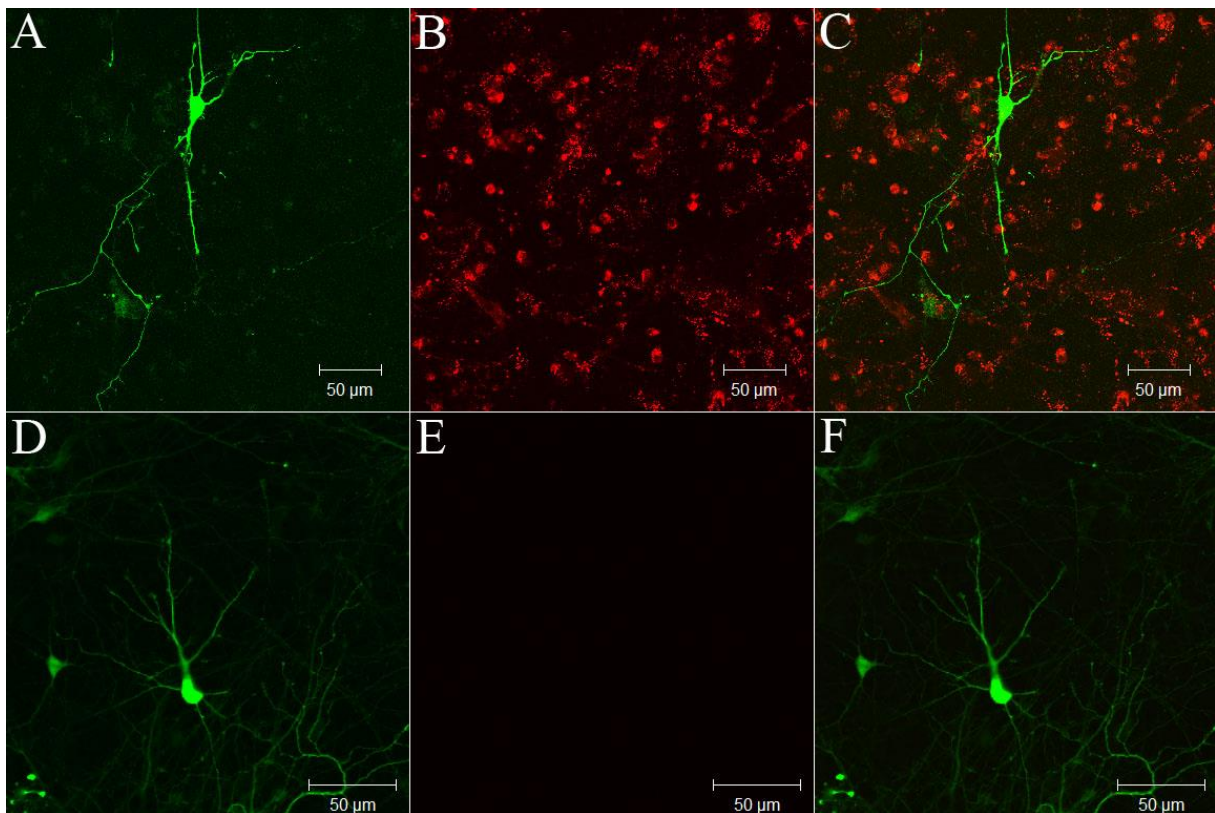
Slika 10. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal), MAP2 (crveni signal) i DAPI (plavi signal) tijekom 7. dana diferencijacije stanica *in vitro*. Na stopljenoj slici (D) vidi se kolokalizacija između THY1 – YFP, MAP2 i DAPI koja boji jezgre svih stanica. Mjerka = 50 μ m.

Grafikon 1. Udio THY1 – YFP stanica u ukupnom broju neurona. U ukupnom broju MAP2 i β 3-tubulin pozitivnih stanica udio THY1 – YFP pozitivnih stanica tijekom sedam dana diferencijacije stanica *in vitro* je bio konstantan i iznosio je između 21,3 i 22,5%.



5.1.5. Diferencijacija stanica obilježenih fluorescentnom bojom PKH26

Budući da su za transplantaciju stanica upotrijebljene stanice obilježene fluorescentnom bojom PKH26, dio stanica je obilježen tom bojom i stavljen na diferencijaciju kao bi se vidjelo utječe li fluorescentna boja na sposobnost diferencijacije stanica. Stanice su uzgajane u istim vremenskim točkama kao i prethodno opisane stanice (1, 3, 5 i 7 dana). U ovom dijelu istraživanja pokazano je da fluorescentna boja ne utječe na sposobnost diferencijacije i da se neuroni obilježeni fluorescentnom bojom (Slika 11.A-C) jednako razvijaju kao i neobilježeni neuroni (Slika 11.D-F) u *in vitro* uvjetima. Progenitorne stanice i nerazvijeniji oblici stanica zadržavaju PKH26 boju (Slika 11.B) tijekom svih vremenskih točaka, dok se u potpuno diferenciranim THY1 – YFP pozitivnim stanicama PKH26 boja ne vidi jer se rastom stanice raspršila u citoplazmi.



Slika 11. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) tijekom 5. dana diferencijacije *in vitro* u stanica obilježenih fluorescentnom PKH26 bojom (crveni signal) (A-C). Fluorescentna boja zadržava se u progenitornim stanicama i nerazvijenijim oblicima stanica (B). Na slici (C) vidi se da nema kolokalizacije THY1 – YFP stanica i PKH26 pozitivnih stanica. Na slikama (D-F) prikazane su negativne kontrole diferencijacije odnosno stanice koje nisu obilježene PKH26 bojom.

5.2. Izražaj THY1 – YFP tijekom embrionalnog razvoja miša

Kako bi se odredio izražaj THY1 – YFP tijekom embrionalnog razvoja miša, žrtvovane su gravidne ženke od 9. do 17. dana graviditeta. Osim zametaka, izražaj THY1 – YFP opisan je i u novorođenih životinja na dan rođenja (P0), u miša starog tjedan dana i miša starog mjesec dana. Izražaj THY1 – YFP opisan je tijekom svakog dana embrionalnog razvoja, a imunohistokemijsko bojanje napravljeno je u tri vremenske točke. Budući da se THY1 – YFP pozitivne stanice pojavljuju kada je zametak star 12,5 dana, to je prvi stadij u kojem je napravljena morfološka analiza i određena kolokalizacija sa specifičnim protutijelima. Osim ove vremenske točke, imunohistokemija je napravljena i 14,5. i 16,5. dana embrionalnog razvoja. Za imunohistokemiju su upotrijebljena slijedeća protutijela: za matične stanice (Nestin i SOX2), za neurone (MAP2 i β 3-tubulin) te za astrocite (GFAP). Kako bi se napravila provjera izražaja THY1 – YFP tijekom embrionalnog razvoja napravljene su i negativne kontrole za koje su upotrijebljeni zameci mišjeg soja C57Bl/6NCr1 jer je to podloga na kojoj je uzgojen YFP-16 soj.

5.2.1. Izražaj THY1 – YFP tijekom 12,5. dana embrionalnog razvoja

Nakon 12,5. dana embrionalnog razvoja THY1 – YFP pozitivne stanice vidljive su u središnjem živčanom sustavu, te znatno slabije u perifernom živčanom sustavu (Tablica 5.). U središnjem živčanom sustavu velik broj THY1 – YFP pozitivnih stanica se nalazi u kralježničnoj moždini, više u ventralnim, nego u dorzalnim rogovima kralježnične moždine. U osnovi mozga, THY1 – YFP stanice pojavljuju se u rombencefalonu, ali je izražaj slabije izražen nego u kralježničnoj moždini.

Rezultati imunohistokemije pokazuju da nestin vrlo intenzivno i u visokom postotku boji duguljaste (vretenaste) stanice u kralježničnoj moždini i u mozgu. Za razliku od stanica uzgajanih *in vitro*, u zamecima na ovom stadiju nije nađena kolokalizacija između THY1 – YFP pozitivnih stanica i nestina (Slike 12.A-C i 17.A-C). Za razliku od nestina, THY1 – YFP pozitivne stanice izrazito su SOX2 pozitivne, primumularno i u nastavcima (Slike 13.A-C i 17.A-C). Osim protutijela za matične stanice, THY1 – YFP pozitivne stanice, izrazito su MAP2 (Slike 14.A-C i 18.A-C) te β 3-tubulin (Slike 15.A-C i 19.A-C) pozitivne, pri čemu se vidi citoplazmatska pozitivnost i u mozgu i u kralježničnoj moždini.

Osim jasno vidljivog signala u rombencefalonu i kralježničnoj moždini, slab signal pojavljuje se i subventrikularno u osnovi telencefalona. Taj signal je dosta slab i javlja se u svega nekoliko stanica.

Osim u središnjem živčanom sustavu, THY1 – YFP pozitivne stanice, odnosno dijelovi stanica vidljivi su i u kralježničnim živcima (Slika 20.A-C).

5.2.2. Izražaj THY1 – YFP tijekom 13,5. dana embrionalnog razvoja

Tijekom 13,5. dana embrionalnog razvoja se povećao broj THY1 – YFP pozitivnih stanica u središnjem živčanom sustavu u odnosu na dan mlađe zametke, što je posebno vidljivo u ventralnim rogovima kralježnične moždine. U dorzalnim rogovima broj pozitivnih stanica je također veći, ali je i dalje njihov broj manji u odnosu na ventralne rogove. U mozgu se također povećava udio pozitivnih stanica, ali samo u rombencefalonu i to u njegovom kranio-ventralnom dijelu iz kojeg će se razviti pons (rombomera 3 i 4), te u kaudalnijem, pontomedularnom dijelu (rombomera 5 i 6) te medularnom dijelu (rombomera 7–11) iz kojeg će se razviti produžena moždina. Osim u rombencefalonu, THY1 – YFP pozitivne stanice su vidljive i u najrostralnijim dijelovima telencefalona, u njušnim lukovicama (bulbus olfactorius). Budući da se THY1 – YFP pozitivne stanice u njušnim lukovicama javljaju u ovom stadiju razvoja, mali broj stanica je pozitivan i signal je slabijeg intenziteta. Osim u njušnim lukovicama, slabiji signal nalazi se i subventrikularnoj zoni, ventralno od budućeg lateralnog ventrikula. U perifernom živčanom sustavu, signal postaje jasniji u kralježničnim živcima.

5.2.3. Izražaj THY1 – YFP tijekom 14,5. dana embrionalnog razvoja

Između 13,5. i 14,5. dana embrionalnog razvoja dolazi do naglog rasta zametka miša te do velikih promjena u razvoju živčanog sustava. U ovom stadiju razvoja smanjuje se udio nestin pozitivnih stanica, a stanice koje su nestin pozitivne su vretenaste kao i u zametka starog 12,5 dana. U živčanom tkivu se nalazi mnogo više THY1 – YFP pozitivnih stanica. Posebno se postotak pozitivnih stanica povećao u ventralnim rogovima kralježnične moždine. Sve THY1 – YFP pozitivne stanice pozitivne su i na SOX2 i u kralježničnoj moždini (Slika 13.D-F) i u mozgu (Slika 17.D-F). Iako THY1 – YFP pozitivne stanice još uvijek nisu zreli neuroni, sve više poprimaju obilježja neurona, što se jasno vidi kolokalizacijom s MAP2 (Slika 14.D-F i

18.D-F) i s β 3-tubulinom (Slika 15.D-F i 19.D-F). Kao negativne kontrole signala u mozgu i kralježničnoj moždini upotrijebljeni su zameci soja C57Bl/6NCrl koji nemaju THY1 – YFP pozitivnih stanica (Slike 12–19.J-L).

Njušne lukovice tijekom 14,5. dana su znato pozitivnije nego dan ranije, a THY1 – YFP pozitivne stanice su raspoređene u pleksiformnom sloju.

U ovom stadiju embrionalnog razvoja, intenzivan je razvoj zuba koji se nalazi u stadiju kape. U medijalnom dijelu gornjih i donjih zuba u ovom stadiju razvoja jasno se vide visokoprizmatične THY1 – YFP pozitivne stanice (Slika 23.).

5.2.4. Izražaj THY1 – YFP tijekom 15,5. dana embrionalnog razvoja

Tijekom 15,5. dana razvoja zametka nastavlja se razvoj živčanog sustava. U dorzalnim rogovima je sve više THY1 – YFP pozitivnih stanica. Stanice su pružile dugačke nastavke koji su pozitivni čitavom dužinom, a u ovom stadiju na nastavcima se počinju uočavati razvijeni trnovi – spine (Slika 21.B). U rombencefalonu je također sve više pozitivnih stanica, koje su znatno zrelije nego u prethodnom stadiju.

U perifernom živčanom sustavu, osim u kralježničnim živcima, u ovom stadiju razvoja THY1 – YFP pozitivne stanice (nastavci) vidljive su i u moždanim živcima; na licu ispod kože je pozitivan sedmi moždani živac (n. facialis), u gornjoj čeljusti (n. maxillaris) i u donjoj čeljusti (n. mandibularis) koji su grane petog moždanog živca. Pozitivnost u ova dva živca, bila je i očekivana budući da iz mozga izlaze lateralno (n. trigeminus) odnosno kaudalno (n. facialis) od ponsa, a THY1 – YFP pozitivne stanice u ovom dijelu osnove mozga prisutne su još od 12,5. dana razvoja.

5.2.5. Izražaj THY1 – YFP tijekom 16,5. dana embrionalnog razvoja

Tijekom 16,5. dana embrionalnog razvoja nema razlike u omjeru pozitivnih stanica u dorzalnom i ventralnom rogu kralježnične moždine. Rogovi su intenzivno THY1 – YFP pozitivni, a broj nestin pozitivnih stanica znatno se smanjio u odnosu na zametak star 14,5 dana. Na završnom dijelu kralježnične moždine (conus medullaris), približavaju se dorzalni i ventralni rog te se THY1 – YFP stanice gotovo sjedinjuju (Slika 20.D-F). Stanice živčanog tkiva više nisu duguljaste već poprimaju izgled zrelih neurona koji su izrazito MAP2 pozitivni

u kralježničnoj moždini (Slika 14.G-I) i u mozgu (Slika 18.G-I). Neke od njih imaju sva morfološka obilježja zrelih neurona. Osim tijela neurona, pozitivni su i nastavci koji formiraju vlakna u bijeloj tvari kralježnične moždine (Slika 13.G-I). Do izrazite promjene u broju THY1 – YFP stanica dolazi u rombencefalonu. Zanimljivo je da su stanice SOX2 (Slike 13.G-I i 17.G-I) pozitivne i vrlo slične onima koje su MAP2 i β 3-tubulin pozitivne (Slike 15.G-I i 19.G-I). Kako osnova mozga u ovoj fazi razvoja intenzivno raste, povećava se ukupni broj neurona, a time i broj THY1 – YFP pozitivnih stanica.

Njušne lukovice u ovom stadiju razvoja postaju vrlo jako izražavaju THY1 – YFP, tako da je teško razlikovati morfologiju pojedinačnih stanica.

U sva tri opisana embrionalna stadija razvoja nije pronađena niti jedna GFAP pozitivna stanica.

5.2.6. Izražaj THY1 – YFP tijekom 17,5. dana embrionalnog razvoja

Tijekom 17,5. dana razvoja zamci su potpuno razvijeni i spremni za porođaj. U ovom stadiju razvoja THY1 – YFP pozitivne stanice se, osim na već opisanim mjestima, prvi put pojavljuju i u mrežnici (Slika 21.D). Budući da do porođaja najčešće dolazi 18. dana razvoja, mozak se gotovo u potpunosti razvio, i na poprečnom presjeku mogu se prepoznati gotovo sve strukture kao i na odraslom mozgu. U ovom stadiju razvoja, hipokampus je u potpunosti razvijen te se posebno dobro uočavaju neuroni u CA1 području (Slika 21.C). Iako ove stanice još uvijek nisu u potpunosti zrele, velike su i izdužene i počinju nalikovati na one u novorođenog miša.

5.2.7. Izražaj THY1 – YFP u novorođenog miša

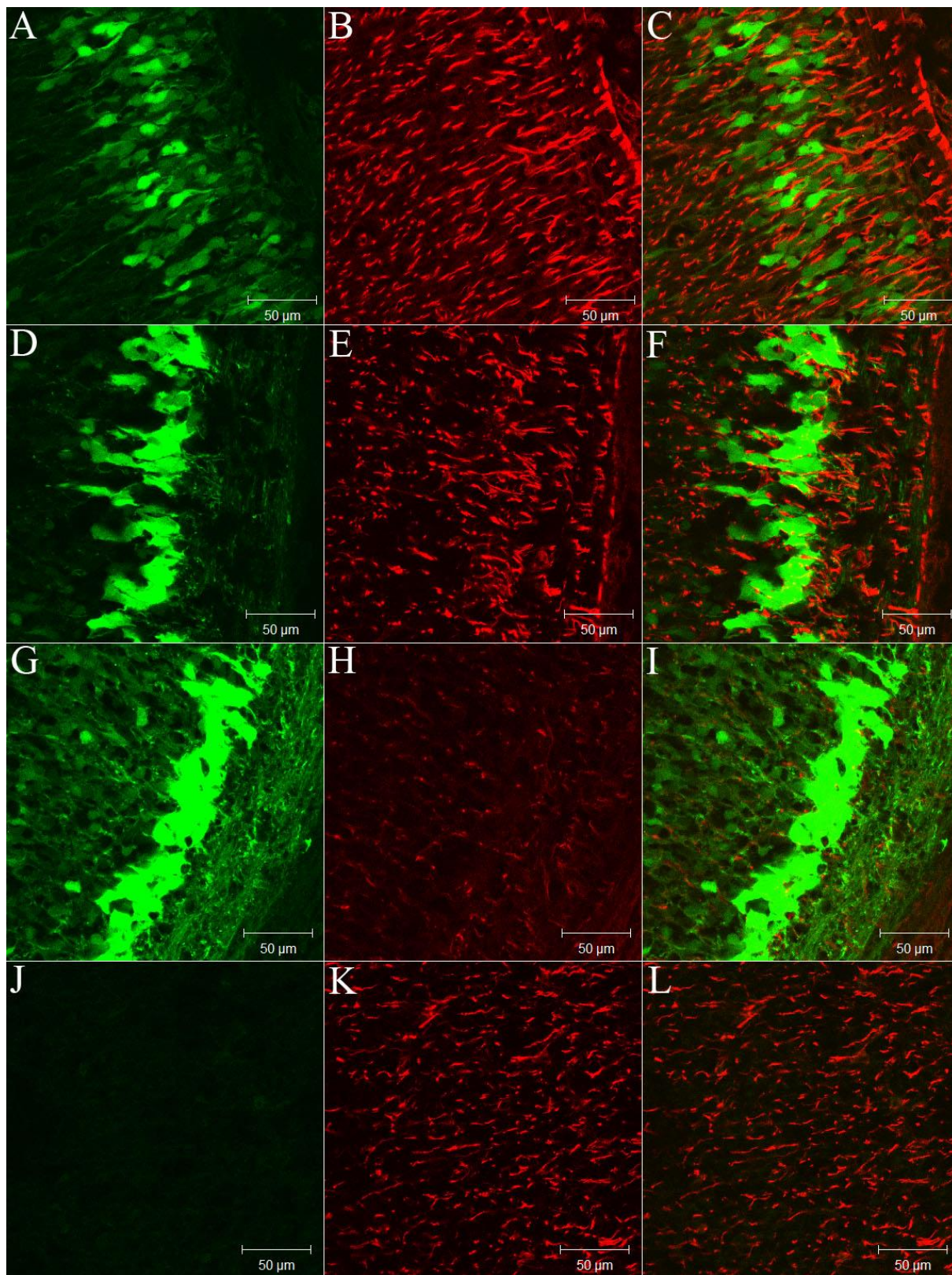
U novorođenog miša, THY1 – YFP pozitivne stanice su znatno razvijenije i zrelije nego tijekom intrauterinog razvoja. Pozitivne stanice vidljive su u moždanom korteksu (Slika 21.F). Iako njihov broj nije velik, one poprimaju izgled stanica kao u zrelom tkivu mozga. Osim u korteksu, velike, gotovo zrele stanice vidljive su u subventrikularnoj zoni. U mrežnici je veći broj THY1 – YFP pozitivnih stanica, a izgledom su vrlo slične onima 17,5. dana razvoja.

5.2.8. Izražaj THY1 – YFP u miša starog tjedan dana

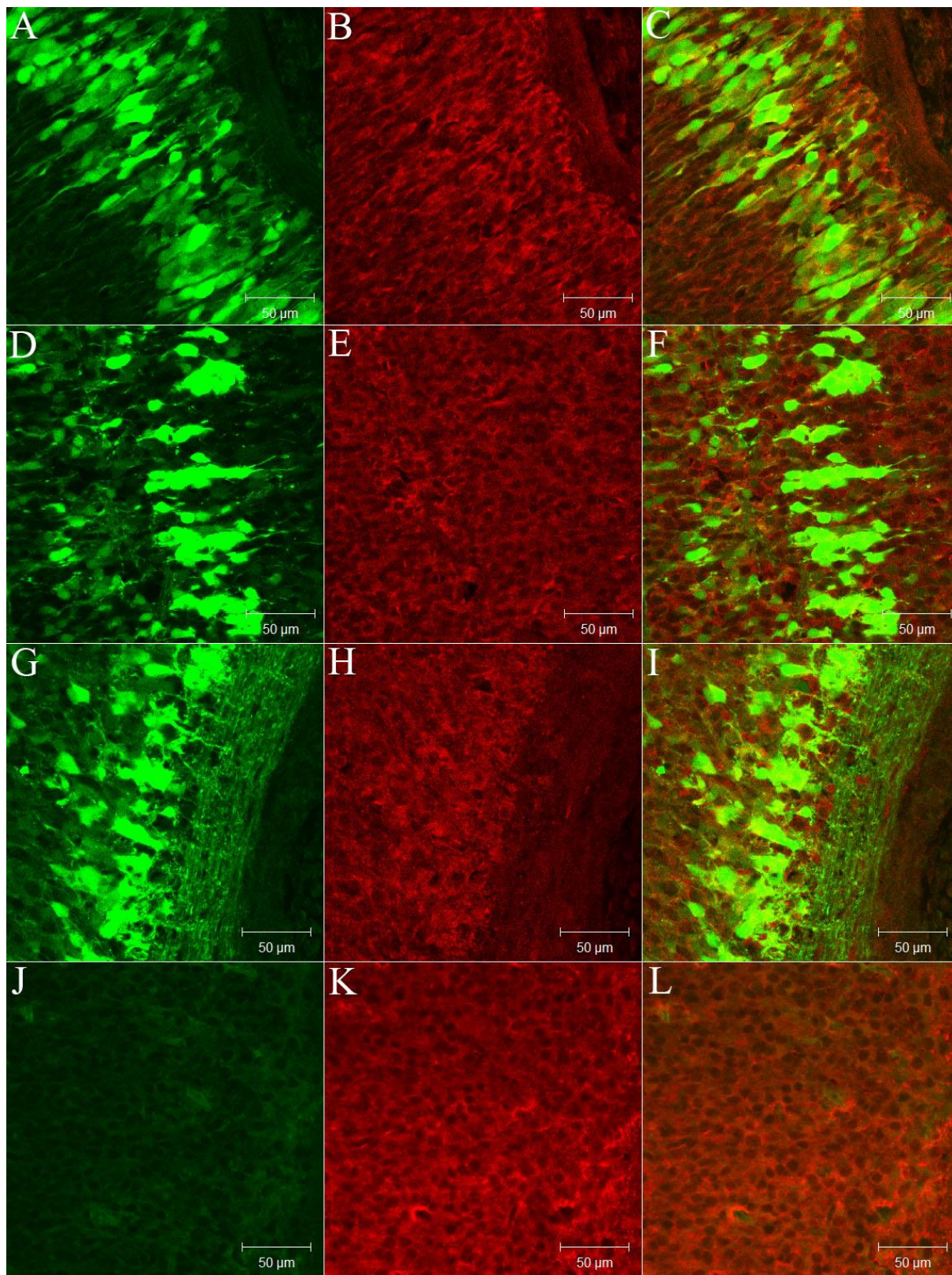
U miša starog tjedan dana mozak je veličinom gotovo identičan mozgu odrasle životinje, ali još uvijek nije u potpunosti razvijen. Njušne lukovice imaju mnogo pozitivnih stanica koje pružaju brojne nastavke (Slika 22.A). U hipokampusu THY1 – YFP pozitivne stanice nalaze se u CA1 području (Slika 22.B). U korteksu se također povećava broj pozitivnih stanica (Slika 22.C). Osim u ovim dijelovima mozga, pozitivne stanice nalaze se u talamusu, a pozitivna su i vlakna corpusa callosum.

5.2.9. Izražaj THY1 – YFP u miša starog mjesec dana

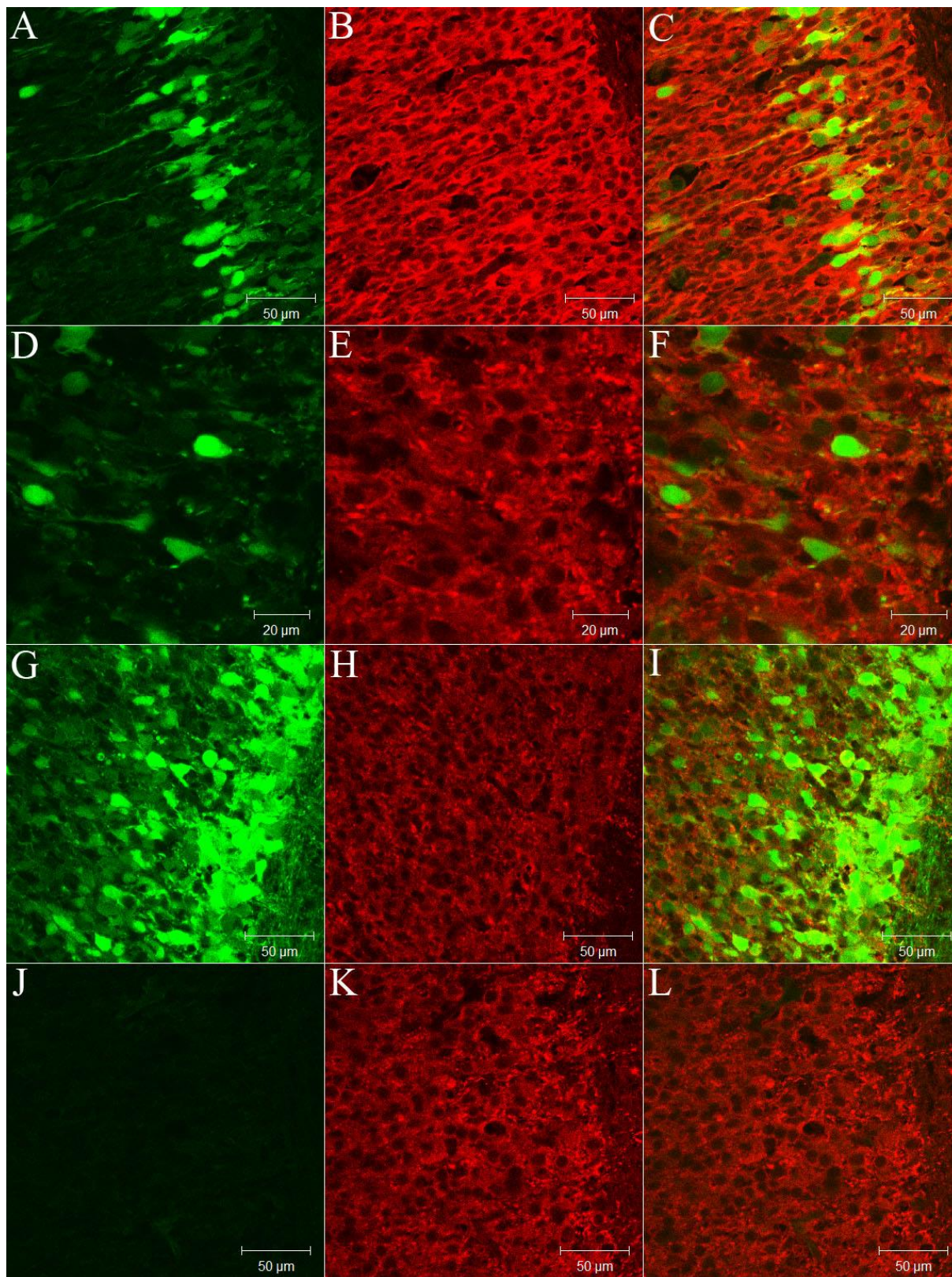
U miša starog mjesec dana, mozak je u potpunosti razvijen. Budući da su se stanice u potpunosti razvile i pružile razgranate nastavke čitavo tkivo je zeleno i teško je vizualizirati pojedinačne stanice, posebice u korteksu. U njušnim lukovicama je znatno više stanica pozitivno u odnosu na miša starog tjedan dana (Slika 22.D). U hipokampusu se također veći broj THY1 – YFP pozitivnih stanica nalazi u CA1 području (Slika 22.E), ali u hipokampusu, za razliku od korteksa, većina stanica nije pozitivna, pa se jasno mogu diferencirati pojedinačne stanice. Osim u CA1 području, pozitivne stanice se nalaze i u CA3 području. Vlakna u corpusu callosum su također intenzivno pozitivna. Korteks je gotovo u potpunosti pozitivan (Slika 22.F). U talamusu su THY1 – YFP pozitivne talamičke jezgre, ali u ovom dijelu tkiva nije moguće diferencirati pojedinačne stanice pod konfokalnim mikroskopom.



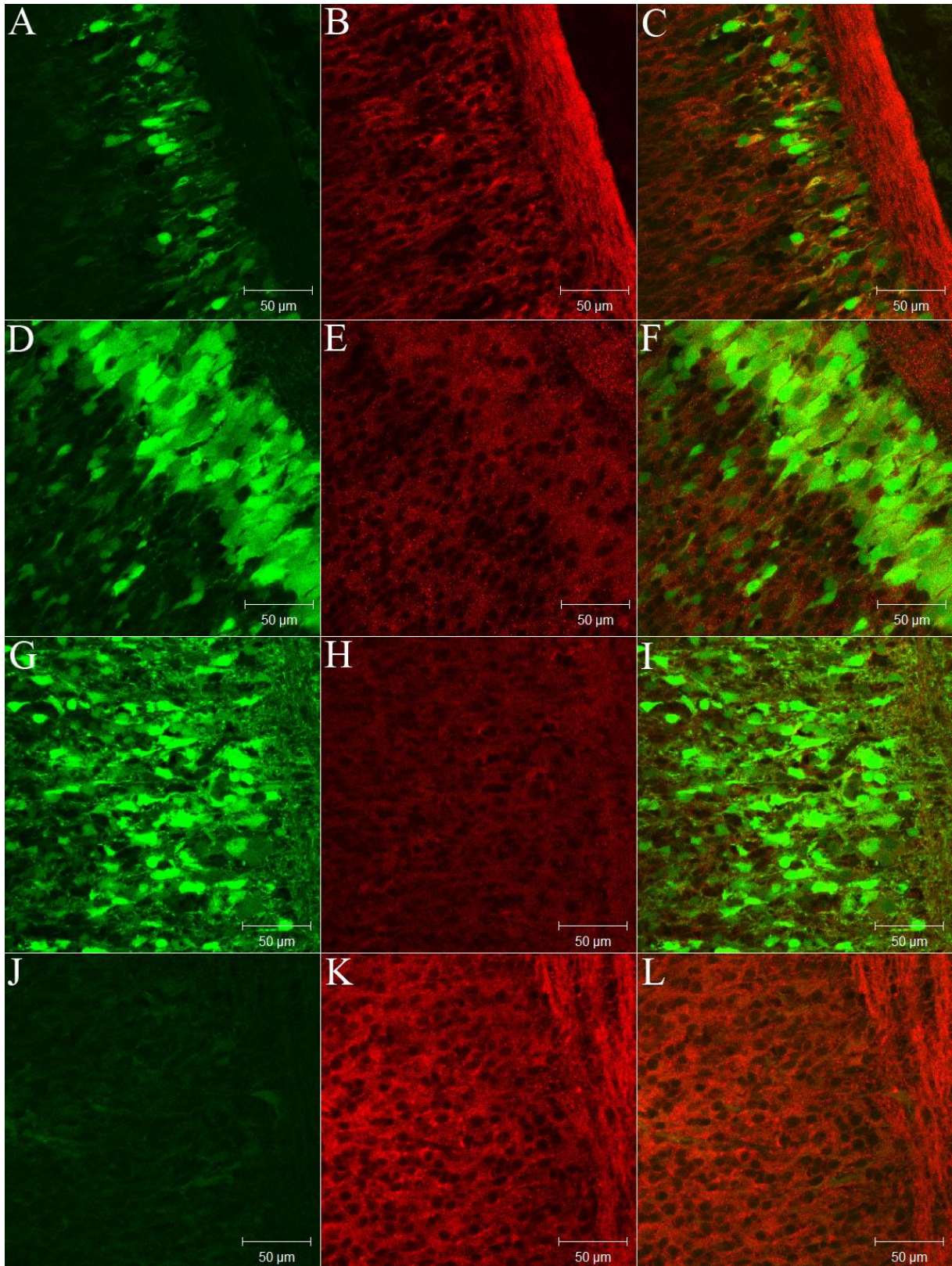
Slika 12. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i nestina (crveni signal) u ventralnom rogu kralježnične moždine tijekom embrionalnog razvoja miša. Na slici (A-C) se vidi izražaj THY1 – YFP i nestina tijekom 12,5. dana, (D-F) tijekom 14,5. dana i (G-I) tijekom 16,5. dana embrionalnog razvoja. Slika (J-L) jest negativna kontrola, na slici (K i L) vidi se bojanje s nestinom, dok na slici (J) nema signala jer tkivo pripada embriju C57Bl/6NCrl soja tijekom 14,5. dana embrionalnog razvoja.



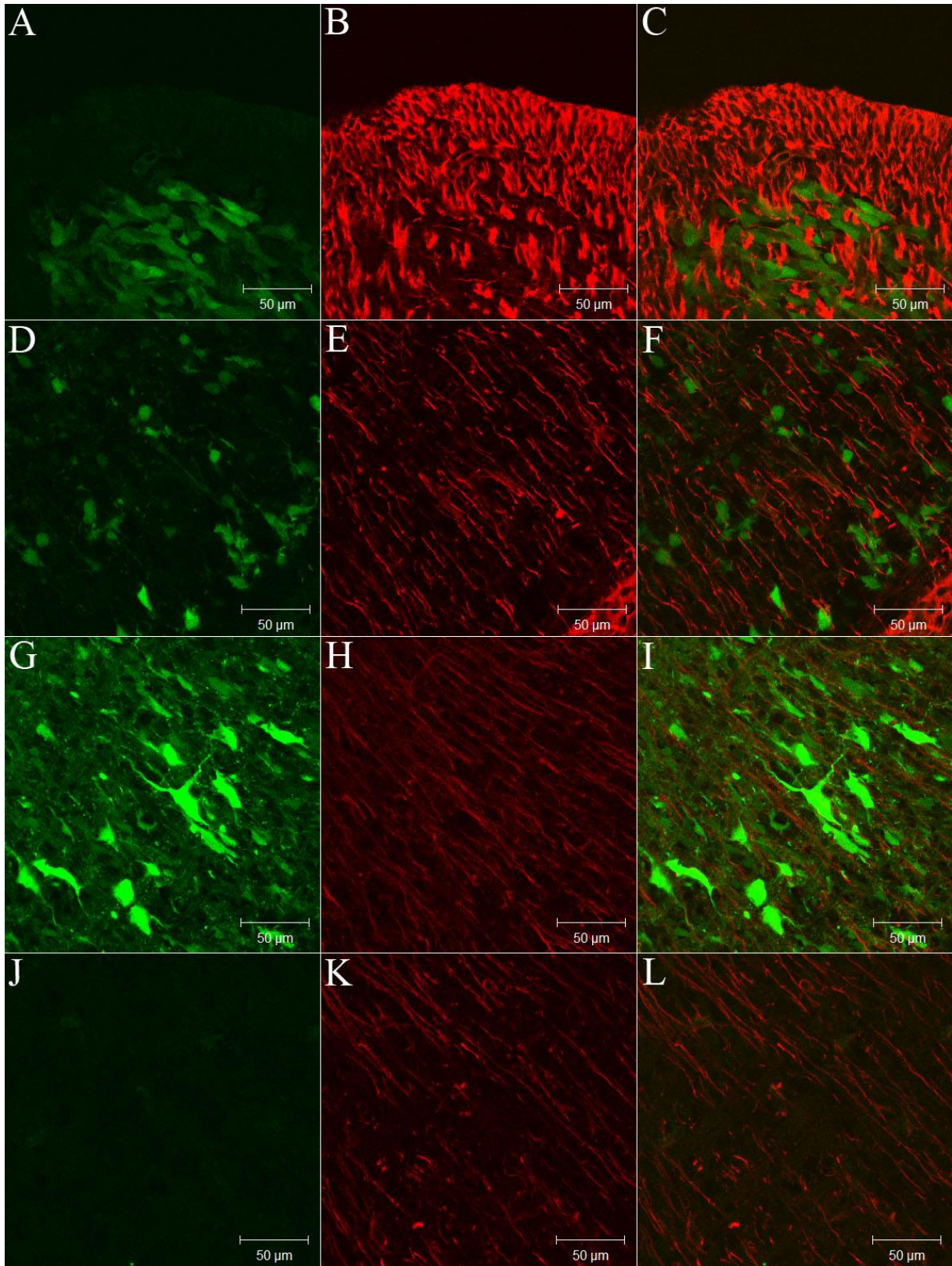
Slika 13. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i SOX2 (crveni signal) u ventralnom rogu kralježnične moždine tijekom embrionalnog razvoja miša. Na slici (A-C) vidi se izražaj THY1 – YFP i SOX2 tijekom 12,5. dana, (D-F) tijekom 14,5. dana i (G-I) tijekom 16,5. dana embrionalnog razvoja. Slika (J-L) jest negativna kontrola, na slici (K i L) vidi se bojanje sa SOX2, dok na slici (J) nema signala jer tkivo pripada embriju C57Bl/6NCrl soja tijekom 14,5. dana embrionalnog razvoja.



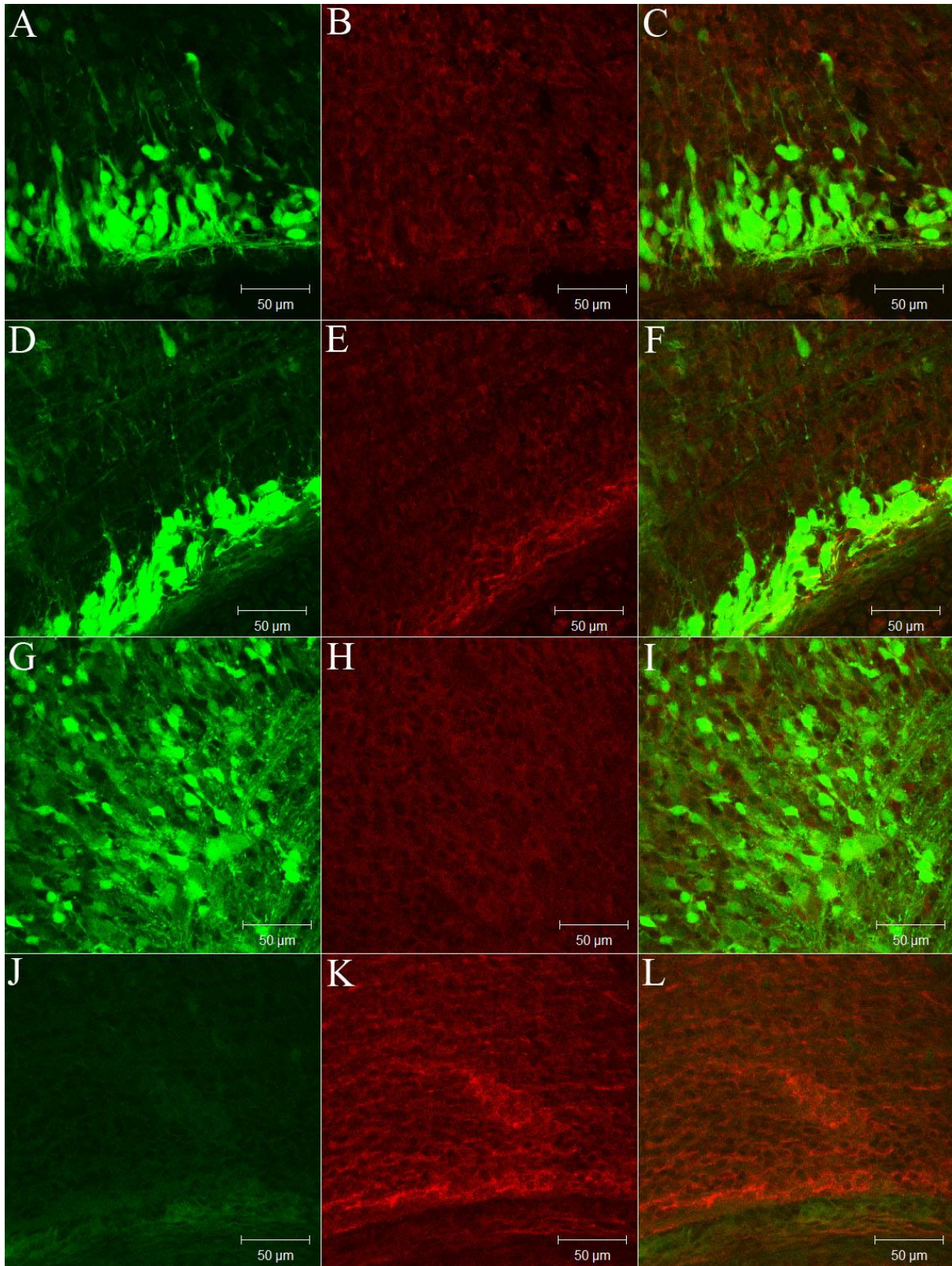
Slika 14. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i MAP2 (crveni signal) u ventralnom rogu kralježnične moždine tijekom embrionalnog razvoja miša. Na slici (A-C) vidi se izražaj THY1 – YFP i MAP2 tijekom 12,5. dana, (D-F) tijekom 14,5. dana i (G-I) tijekom 16,5. dana embrionalnog razvoja. Slika (J-L) jest negativna kontrola, na slici (K i L) vidi se bojanje s MAP2, dok na slici (J) nema signala jer tkivo pripada embriju C57Bl/6NCrl soja tijekom 14,5. dana embrionalnog razvoja.



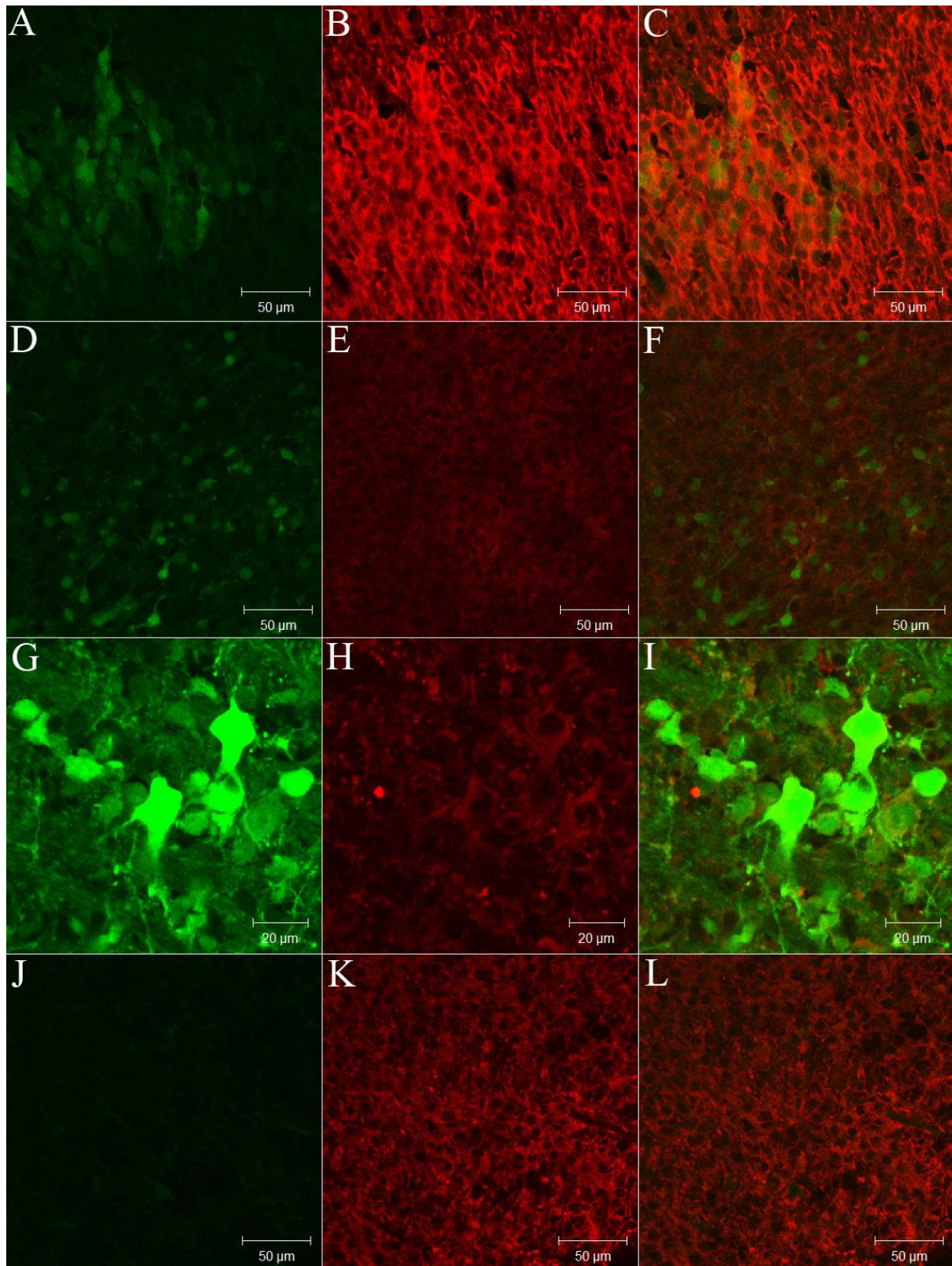
Slika 15. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i β 3-tubulina (crveni signal) u ventralnom rogu kralježnične moždine tijekom embrionalnog razvoja miša. Na slici (A-C) vidi se izražaj THY1 – YFP i β 3-tubulina tijekom 12,5. dana, (D-F) tijekom 14,5. dana i (G-I) tijekom 16,5. dana embrionalnog razvoja. Slika (J-L) jest negativna kontrola, na slici (K i L) vidi se bojanje β 3-tubulinom, dok na slici (J) nema signala jer tkivo pripada embriju C57Bl/6NCrl soja tijekom 14,5. dana embrionalnog razvoja.



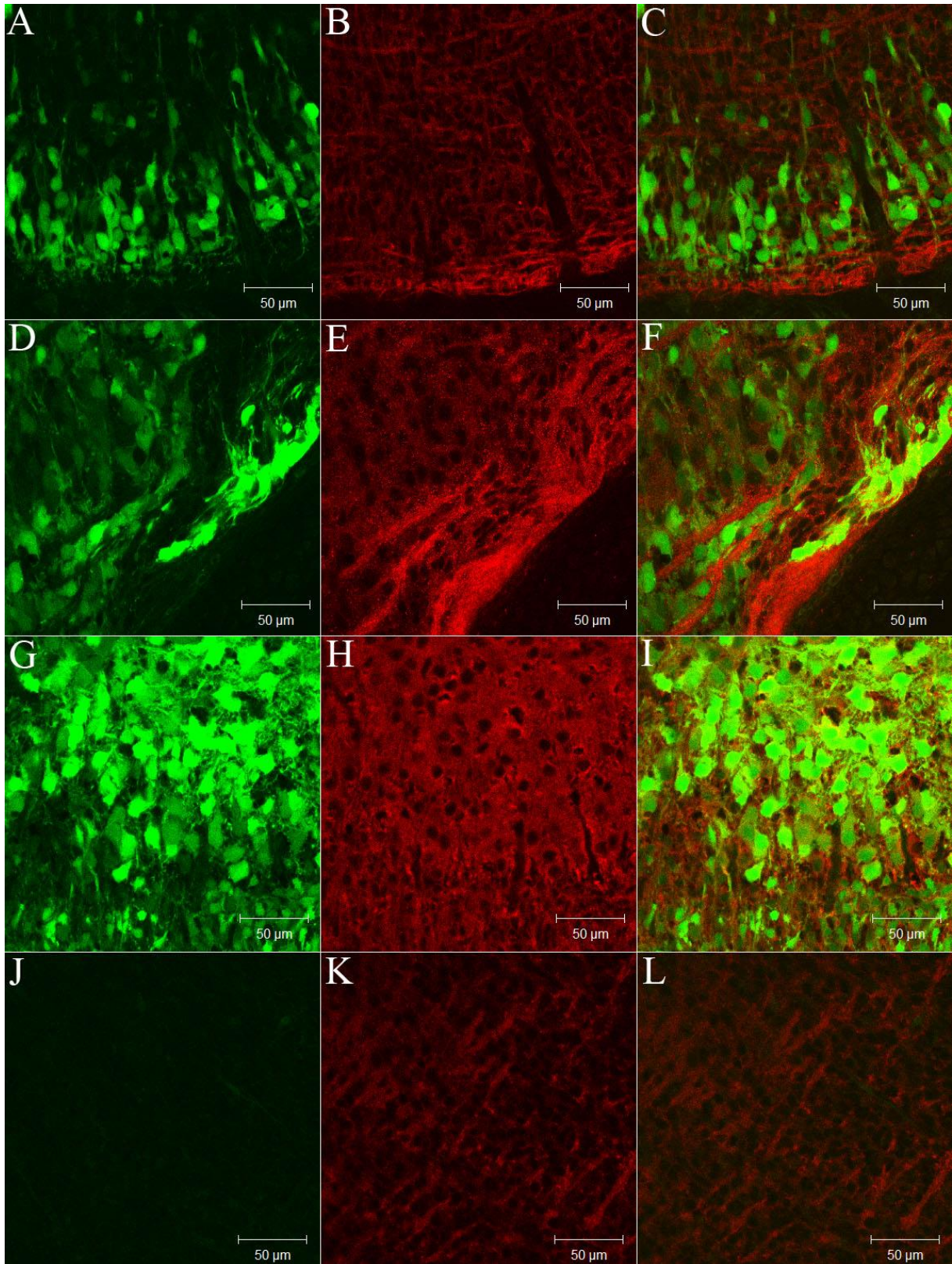
Slika 16. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i nestina (crveni signal) u rombencefalonu tijekom embrionalnog razvoja miša. Na slici (A-C) vidi se izražaj THY1 – YFP i nestina tijekom 12,5. dana, (D-F) tijekom 14,5. dana i (G-I) tijekom 16,5. dana embrionalnog razvoja. Slika (J-L) jest negativna kontrola, na slici (K i L) vidi se bojanje s nestinom, dok na slici (J) nema signala jer tkivo pripada embriju C57Bl/6NCrl soja tijekom 14,5. dana embrionalnog razvoja.



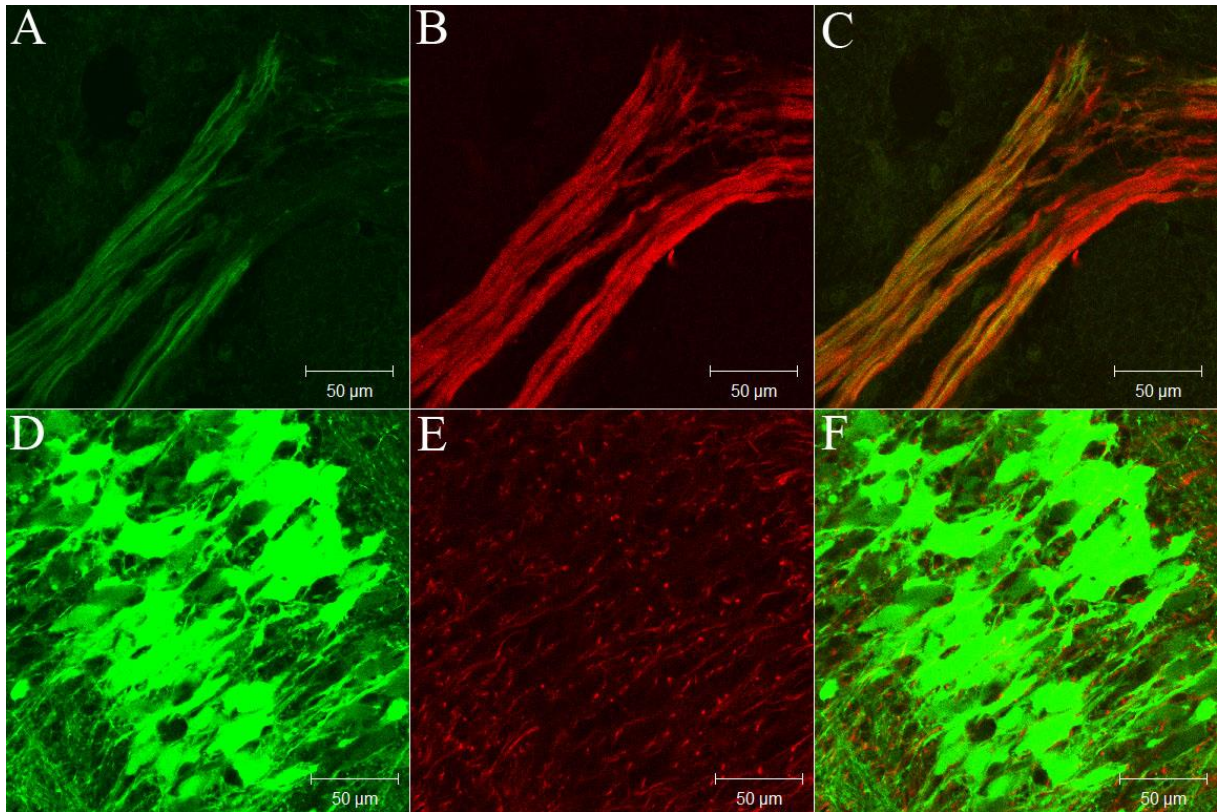
Slika 17. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i SOX2 (crveni signal) u rombencefalonu tijekom embrionalnog razvoja miša. Na slici (A-C) vidi se izražaj THY1 – YFP i SOX2 tijekom 12,5. dana, (D-F) tijekom 14,5. dana i (G-I) tijekom 16,5. dana embrionalnog razvoja. Slika (J-L) jest negativna kontrola, na slici (K i L) vidi se bojanje sa SOX2, dok na slici (J) nema signala jer tkivo pripada embriju C57Bl/6NCrl soja tijekom 14,5. dana embrionalnog razvoja.



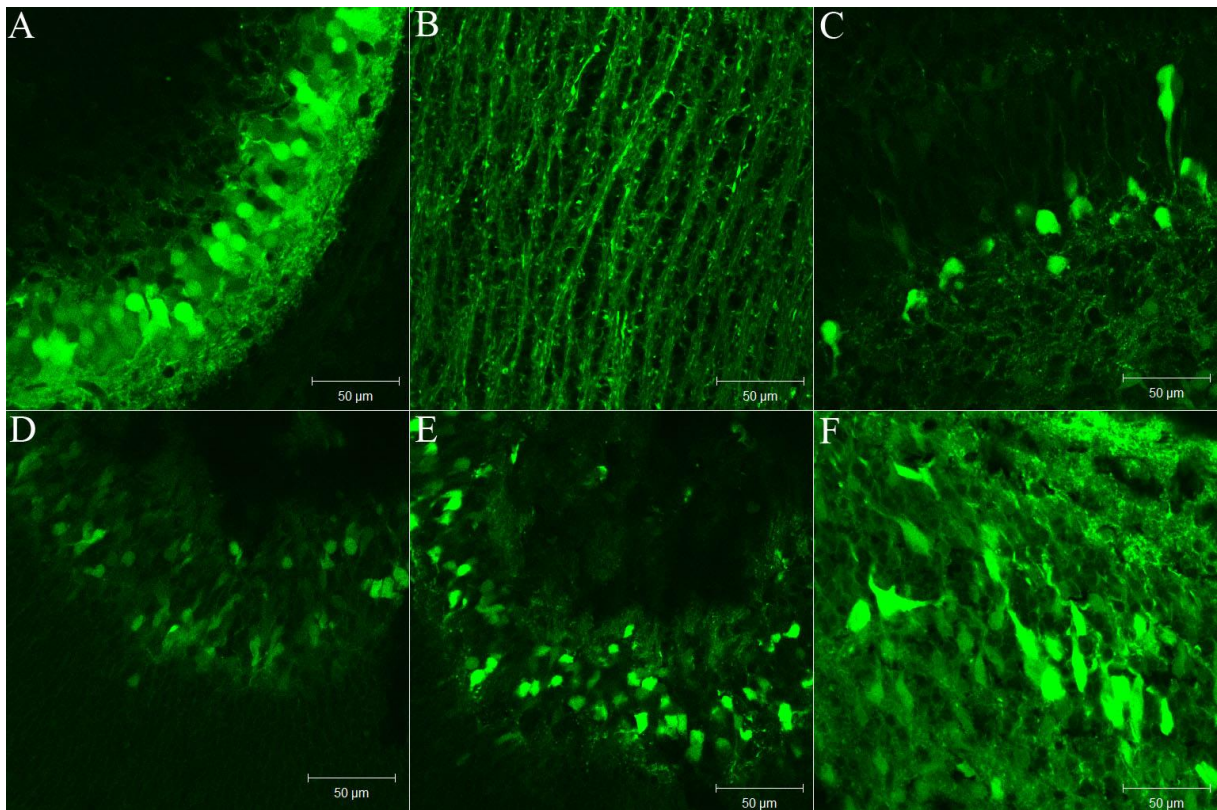
Slika 18. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i MAP2 (crveni signal) u rombencefalonu tijekom embrionalnog razvoja miša. Na slici (A-C) vidi se izražaj THY1 – YFP i MAP2 tijekom 12,5. dana, (D-F) tijekom 14,5. dana i (G-I) tijekom 16,5. dana embrionalnog razvoja. Slika (J-L) jest negativna kontrola, na slici (K i L) vidi se bojanje s MAP2, dok na slici (J) nema signala jer tkivo pripada embriju C57Bl/6NCrl soja tijekom 14,5. dana embrionalnog razvoja.



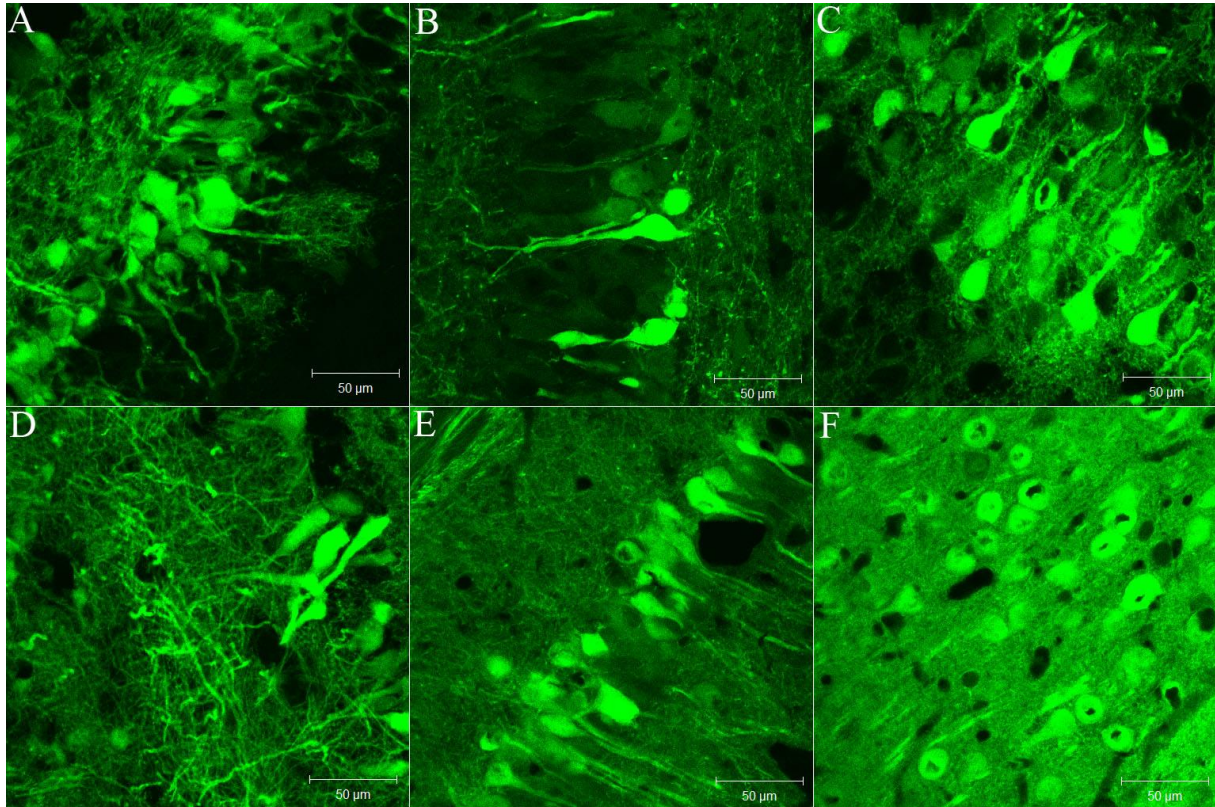
Slika 19. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i β 3-tubulina (crveni signal) u rombencefalonu tijekom embrionalnog razvoja miša. Na slici (A-C) vidi se izražaj THY1 – YFP i β 3-tubulina tijekom 12,5. dana, (D-F) tijekom 14,5. dana i (G-I) tijekom 16,5. dana embrionalnog razvoja. Slika (J-L) jest negativna kontrola, na slici (K i L) vidi se bojanje s β 3-tubulinom, dok na slici (J) nema signala jer tkivo pripada embriju C57Bl/6NCrl soja tijekom 14,5. dana embrionalnog razvoja.



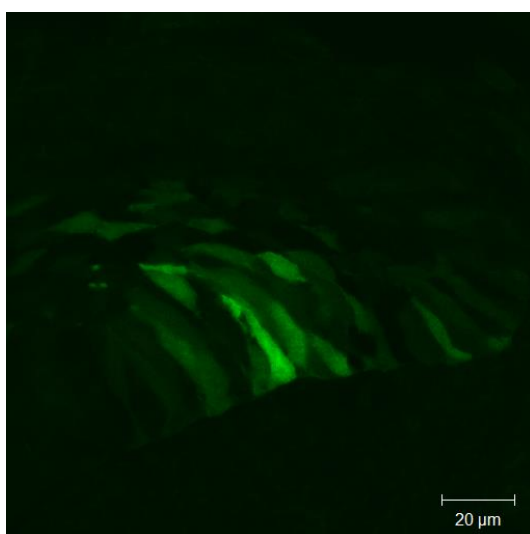
Slika 20. Kralježnični živac bojan s $\beta 3$ -tubulinom (crveni signal) (A-C) u zametka starog 12,5 dana. Na slikama (D-F) vidi se završetak kralježnične moždine (conus medullaris) bojan s nestinom u zametka starog 16,5 dana.



Slika 21. Na slici (A) vidi se njušna lukovica u zametka starog 15,5 dana; (B) lateralni presjek kralježnične moždine u zametka starog 15,5 dana, vide se trnovi – spine na nastavcima; (C) hipokampus u zametka starog 17,5 dana, vide se pozitivne stanice u CA1 području; (D) mrežnica u zametka starog 17,5 dana; (E) mrežnica i (F) korteks u novorođenog miša.



Slika 22. Na slikama A-C prikazan je mozak u miša starog tjedan dana; (A) njušne lukovice, (B) hipokampus i (C) korteks. Na slikama D-F prikazan je mozak u miša starog mjesec dana; (D) njušne lukovice, (E) hipokampus i (F) korteks.



Slika 23. Razvoj zuba. Tijekom 14,5. dana embrionalnog razvoja zub se nalazi u stadiju kape.

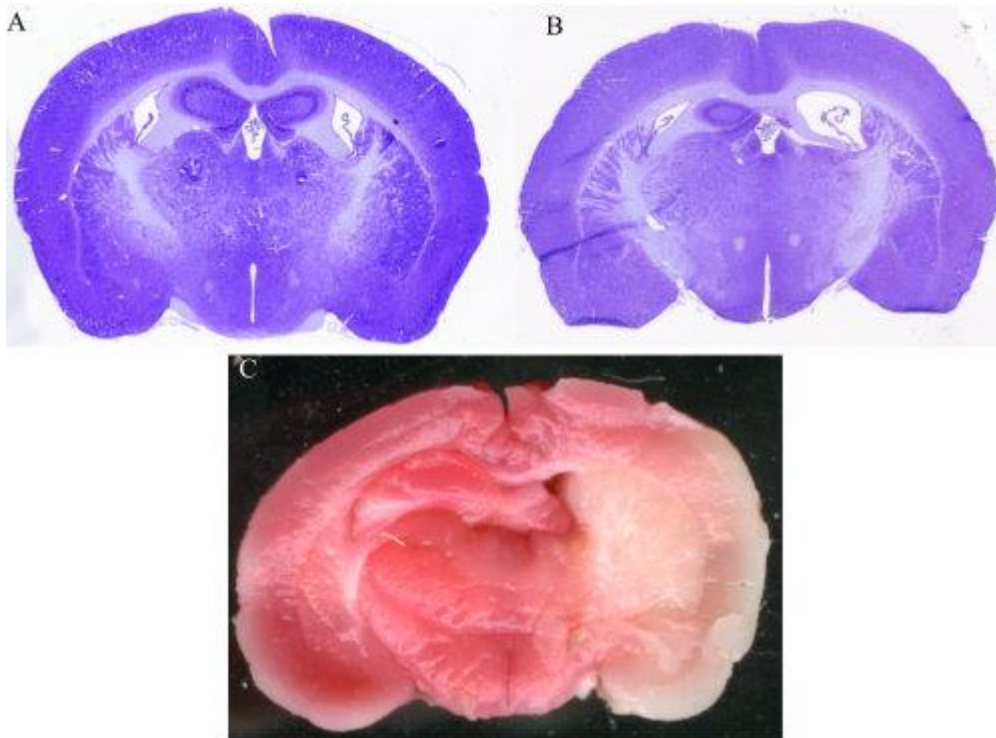
Tablica 5. Prikaz izražaja signala THY1 – YFP tijekom embrionalnog razvoja. Legenda: „–“ nema signala, „+/-“ slab signal, „+“ signal, „++“ jak signal, „+++“ izrazito jak signal.

Dio živčanog sustava	E12,5	E13,5	E14,5	E15,5	E16,5	E17,5	P0
Središnji živčani sustav							
Mozak							
Prozencefalon	+/-	+/-	+	+	++	++	++
Mezencefalon							
Rombencefalon	+	+	++	++	+++	+++	+++
Kralježnična moždina							
Ventralni rog	+	++	++	+++	+++	+++	+++
Dorzalni rog	+/-	+	+	++	+++	+++	+++
Periferni živčani sustav							
Moždani živci			+	++	++	++	++
Kralježnični živci	+	+	++	++	++	++	++
Mrežnica						+	++

5.3. Izražaj THY1 – YFP nakon transplantacije u mozak

Kako bi se odredio izražaj THY1 – YFP u mozgu miša zahvaćenim moždanim udarom, živčane matične stanice soja YFP-16 obilježene su fluorescentnom bojom PKH26 i transplantirane su 24 sata nakon ozljede. Stanice su transplantirane na kortikokalozalnoj granici ipsilateralno (lijeva hemisfera) i kontralateralno (desna hemisfera) u odnosu na ozljedu. Nakon transplantacije, životinje su žrtvovane te je napravljena analiza u vremenskim točkama od 2, 4, 8 i 14 tjedana nakon transplantacije stanica. Ovim modelom moždanog udara prvenstveno dolazi do oštećenja striatuma i lateralnog korteksa, ali posljedično dolazi i od oštećenja talamusa i hipokampusa. Obilježene THY1 – YFP stanice su transplantirane dorzalno od hipokampusa kako bi se vidjela njihova diferencijacija, migracija i integracija u tkivo ozlijeđene životinje. Drugi razlog transplantacije u ovaj dio mozga jest to što je hipokampus pogodno tkivo za rast neurona.

Kako bi se potvrdila ozljeda u operiranih životinja, napravljena su dva standardna bojanja tkiva kojima se potvrđuje ozljeda tkiva. U akutnoj fazi, 24 sata nakon izazivanja moždanog udara napravljeno je bojanje tkiva s trifenoltetrazolium kloridom (TTC) kako bi se dokazala ozljeda tkiva. Ozlijeđeni dio tkiva bijele je boje, za razliku od neozlijeđenog koji je ružičaste boje (Slika 24.C). Bojanjem prema Nisslu (Slika 24.A i B) dokazana je ozljeda u vremenskim točkama koje su upotrijebljene za praćenje transplantacije stanica. U životinja koje imaju moždani udar dolazi do ozljede tkiva koje vaskularizira srednja moždana arterija, ali osim toga područja dolazi i ozljede epitalamusa i talamusa te posljedično tome i do hipokampusa, koje vaskularizira stražnja moždana arterija (Slika 24.A i B).



Slika 24. Rostralni pogled. Na slici (A i B) prikazano je bojenje prema Nisslu; (A) zdrava životinja (kontrola), (B) ozlijeđena životinja, 4 tjedna nakon ozljede, vidi se oštećenje lijevog epitalamusa i talamusa, kao i potpuno propadanje lijevog hipokampusa. Na slici (B) prikazano je TTC bojanje s pomoću kojega se 24 sata nakon MCAO prema intenzitetu boje razlikuje oštećeno tkivo (blijedo) od neoštećenoga (ružičasto).

5.3.1. Izražaj THY1 – YFP dva tjedna nakon transplantacije

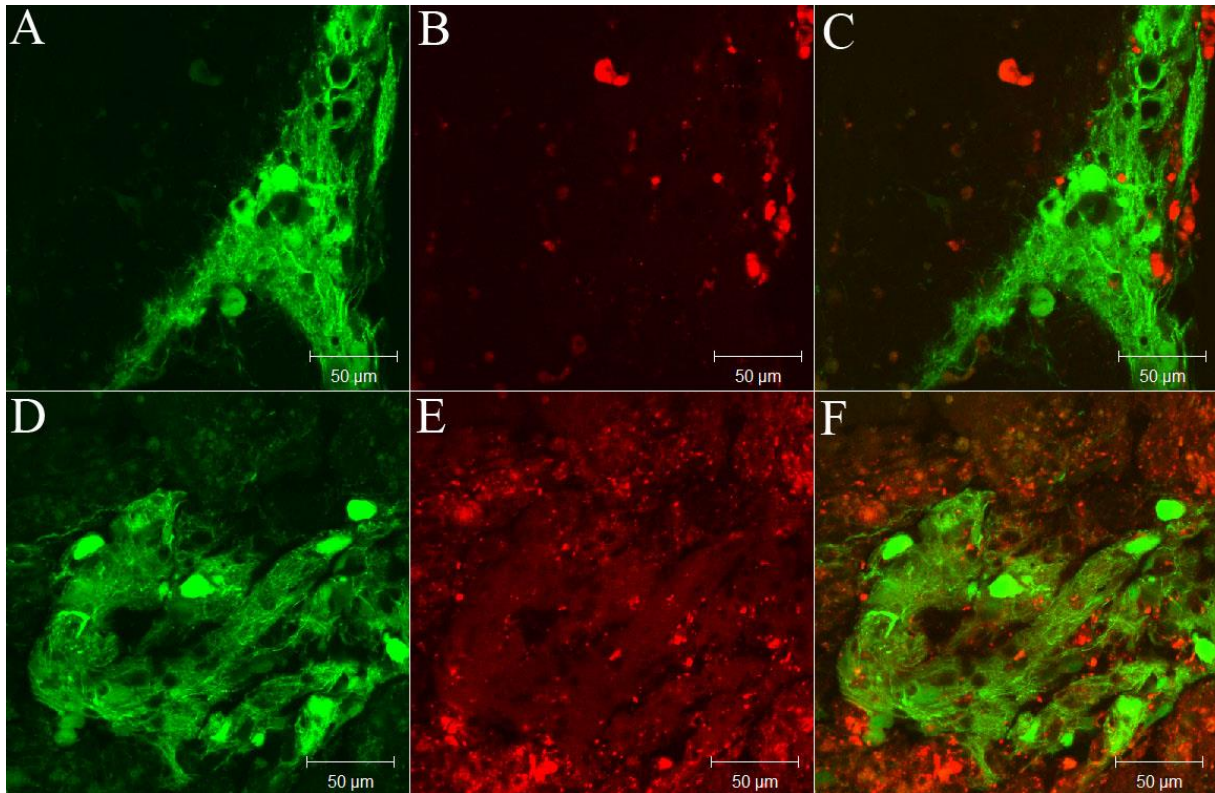
Prva vremenska točka u kojoj je analiziran izražaj THY1 – YFP u transplantiranih stanica jest bila dva tjedna nakon transplantacije živčanih matičnih stanica u mozak miša zahvaćen moždanim udarom. Nakon izolacije mozga, tkivo je pripremljeno za analizu konfokalnim mikroskopom LSM510. Budući da se THY1 – YFP pozitivne stanice nalaze u zelenom spektru (488), a PKH26 boja u crvenom spektru (546), imunohistokemija u ovom dijelu nije moguća, već su preparati samo poklopljeni i analizirani.

U ovoj vremenskoj točki stanice se većim dijelom nalaze na mjestu uboda u obliku nakupine. Izgled nakupine transplantiranih stanica se razlikuje u ozlijeđenih i kontrolnih životinja. U ozlijeđenih životinja, transplantat je duži, stanice su rahlije raspoređene i zrakasto raspršene oko središta transplantacije (Slika 25.A-C). Za razliku od ozlijeđenih, u kontrolnih životinja je ta nakupina stanica kraća, kompaktna i stanice su zbijenije na mjestu transplantata (Slika 25.D-F). Manji dio stanica je THY1 – YFP pozitivan dok je većina stanica u obliku matičnih stanica koje su intenzivno PKH26 pozitivne. Stanice koje su se započele diferencirati u THY1 – YFP zaostaju na mjestu uboda. Za razliku od njih, sitne, PKH26 pozitivne stanice imaju sposobnost migracije. Stanice migriraju po vlaknima corpusa callosum, spuštaju se u vlaknima u oba smjera, ali ipak znatno više prema ozljedi. Zbog neposredne blizine lateralnog ventrikula, dio stanica tijekom transplantacije ulazi u ventrikule. U ovoj vremenskoj točki u ventrikulima se nalazi malo stanica koje su pričvršćene za ependim i pružaju male nastavke prema tkivu. U kontrolnih životinja, stanice se zadržavaju na mjestu uboda.

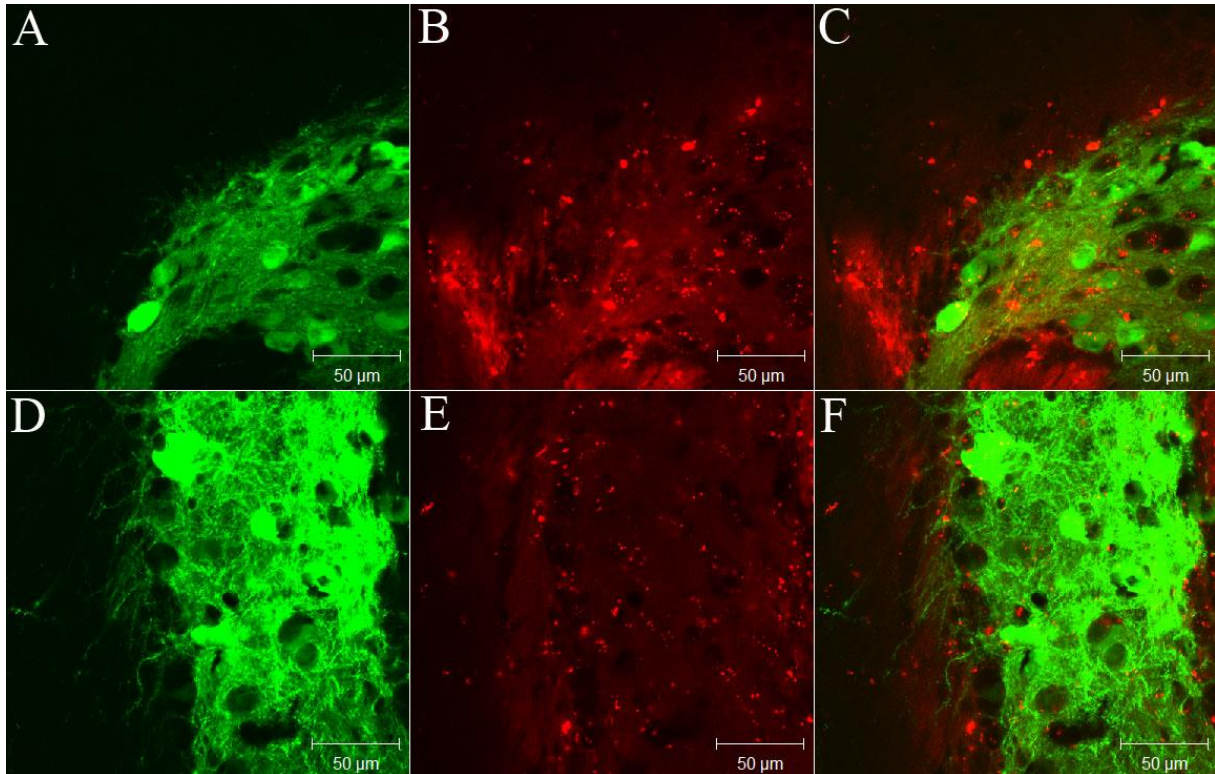
5.3.2. Izražaj THY1 – YFP četiri tjedna nakon transplantacije

Četiri tjedna nakon transplantacije stanica razlika između ozlijeđene i zdrave životinje je još očitija. U ozlijeđenoj životinji stanice se ugrađuju u hipokampus i pružaju nastavke u tkivo (Slika 26.A-C). U kontrolnih životinja su stanice ostale na mjestu transplantacije, broj diferenciranih THY1 – YFP pozitivnih stanica je veći te one tvore kompaktnu nakupinu bogatu gustim nastavcima (Slika 26.D-F). U ozlijeđenih životinja zbog pomicanja stanica i same građe tkiva, transplantat izgleda manji s manjim brojem stanica, ali do izražaja dolaze pojedinačne stanice koje se ugrađuju u tkivo. U oba slučaja vidljive su i zrelije stanice koje su THY1 – YFP pozitivne, ali i nezrele (matične) stanice koje su izrazito PKH26 pozitivne. Kako su stanice obilježene s PKH26 bojom, prije transplantacije, dok su bile u stadiju matičnih stanica, rastom

stanice i pružanjem nastavaka boja se raspodijeli po čitavoj stanici tako da nije moguće utvrditi kolokalizaciju između THY1 – YFP pozitivnih stanica i PKH26. No, za razliku od diferenciranih stanica, u nezreljim oblicima stanica PKH26 je izrazito pozitivan.



Slika 25. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i PKH26 (crveni signal) mozgu miša 2 tjedna nakon transplantacije. Slike A-C prikazuju ozlijeđenu životinju dok je na slikama D-F zdrava kontrola. U ozlijeđene životinje vidi se THY1 – YFP pozitivne stanice koje se iz corpora callosum ugrađuju u hipokampus (A i C), dok se u kontrolnim životinjama stanice zadržavaju na mjestu uboda.

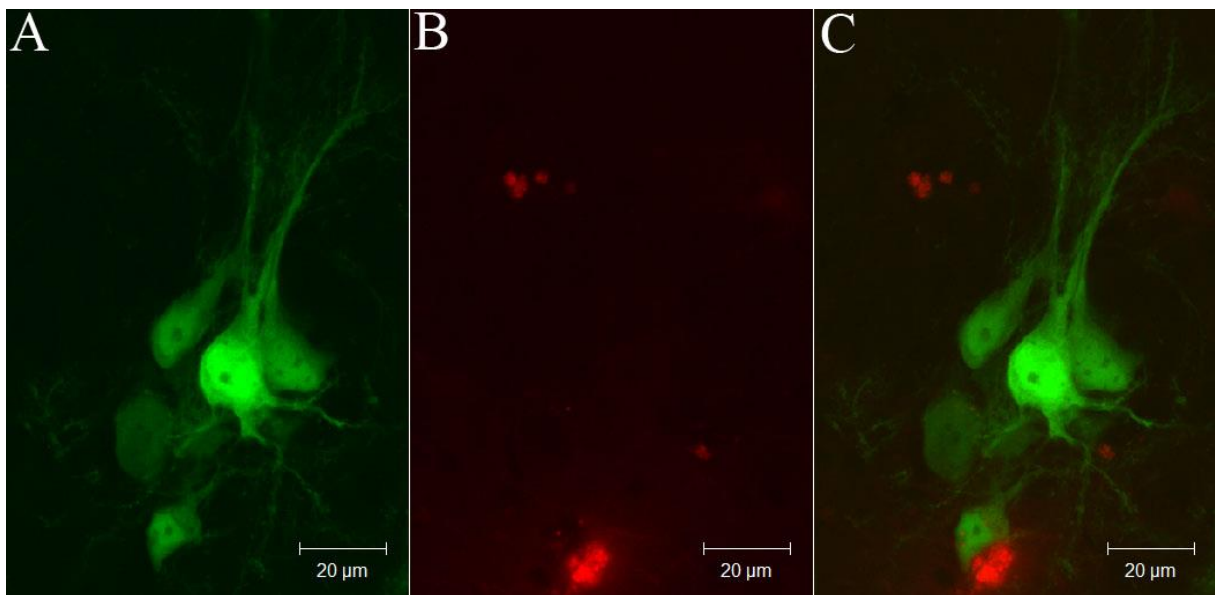


Slika 26. Izražaj THY1 – YFP (zeleni signal) i PKH26 (crveni signal) mozgu miša 4 tjedna nakon transplantacije. Slike A-C prikazuju ozlijeđenu životinju dok je na slikama D-F zdrava kontrola. U ozlijeđene životinje vidi se THY1 – YFP pozitivne stanice koje se iz corpusa callosum ugrađuju u hipokampus, jasno su vidljive pojedinačne stanice koje se ugrađuju u tkivo. U kontrolnim životinja stanice se zadržavaju na mjestu uboda i tvore kompaktnu nakupinu.

5.3.3. Izražaj THY1 – YFP osam tjedana nakon transplantacije

Osam tjedana nakon transplantacije stanica u tkivo ozlijeđene životinje, stanice su se izrazito razgranale, pružile su dugačke nastavke i međusobno su se povezale sa stanicama domaćina (Slika 27.). To je posebno dobro vidljivo u hipokampusu. Na pozitivnim stanicama se jasno razlikuju akson i dendriti, ali i trnovi – spine na nastavcima. Broj PKH26 stanica znatno je manji u odnosu na prethodnu vremensku točku jer se boja prilikom staničnih dioba razdijeli na stanice-kćeri pa intenzitet signala slabi. Diferencirane THY1 – YFP pozitivne stanice (Slika 27.) nisu PKH26 pozitivne.

U kontrolnih životinja su se stanice zadržale na mjestu transplantacije, a transplantat oblikuje kuglastu nakupinu izgrađenu od diferenciranih THY1 – YFP pozitivnih stanica. Različiti fenotip stanica je nađen i u lateralnom ventrikulu: u ozlijeđenih životinja stanice pružaju dugačke nastavke kroz ependim prema ozlijeđenom tkivu, dok u kontrolnih životinja stanice u ventrikulu tvore sfere koje se pričvrste za ependim.

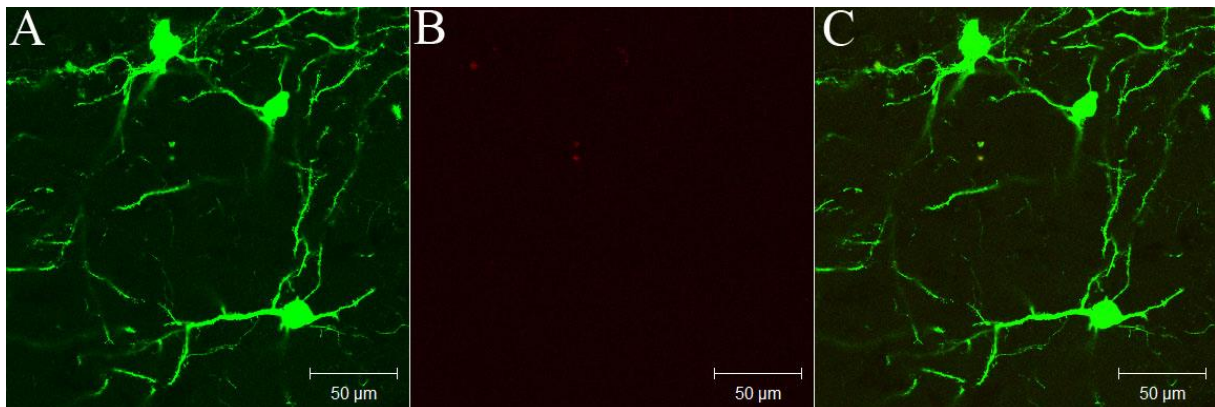


Slika 27. Osam tjedana nakon transplantacije živčanih matičnih stanica u tkivo miša s moždanim udarom. U hipokampusu se vide THY1 – YFP (zeleni signal) pozitivne stanice u CA1 području. Stanice su se ugradile u tkivo domaćina. Na slici (B) vide se PKH26 (crveni signal) pozitivne stanice koje se nisu diferencirale već su ostale u nediferenciranom odliku.

5.3.4. Izražaj THY1 – YFP četrnaest tjedana nakon transplantacije

Četrnaest tjedana nakon transplantacije stanica, diferencirane THY1 – YFP pozitivne stanice razgranale su se po hipokampusu ozlijeđene životinje i nalaze se uglavnom u CA1 području (Slika 28.). Stanice imaju velike nastavke na kojima se jasno vide trnovi – spine. Transplantirane stanice su međusobno povezane, ali se povezuju i sa stanicama domaćina. U ovoj vremenskoj točki gotovo da i nema PKH26 pozitivnih stanica u hipokampusu, jedino se zadržavaju na mjestu transplantacije okružene diferenciranim THY1 – YFP pozitivnim stanicama.

U kontrolnih životinja THY1 – YFP pozitivne stanice se nalaze na mjestu uboda, u obliku velike nakupine, a dio stanica koji je ušao ventrikul tvori veliku sferu koja je identična kao sfera u prethodnoj vremenskoj točki.



Slika 28. Četrnaest tjedana nakon transplantacije živčanih matičnih stanica u tkivo miša s moždanim udarom. U hipokampusu vide se THY1 – YFP pozitivne stanice u CA1 području. Stanice su se ugradile u tkivo domaćina, stvorile su gustu mrežu nastavaka na kojima se vide trnovi – spine.

6. RASPRAVA

Iako su miša koji pod utjecajem promotora *Thy1* gena izražava žutu fluorescentnu bjelančevinu napravili FENG i sur. (2000.) još uvijek nije određen precizan i točan uzorak fluorescencije u svih 25 sojeva. Budući da je velika prednost ovoga soja izražaj žute fluorescentne bjelančevine u samo određenim neuronima, ovakva istraživanja je potrebno napraviti jer se stanice podrijetlom od ovakvih sojeva mogu koristiti u transplantacijskim istraživanjima. Osim toga velika prednost ovakvih mišjih sojeva je u tome što nisu sve stanice pozitivne što omogućuje lakše praćenje stanica u tkivu nakon transplantacije u usporedbi sa životinjama koje ubikvitarno izražavaju fluorescentne bjelančevine.

6.1. Izražaj THY1 – YFP *in vitro*

U ovom istraživanju je opisan izražaj THY1 – YFP tijekom *in vitro* diferencijacije stanica. Budući da izražaj THY1 – YFP vezan za, isključivo, stanice neuronske loze odnosno neurone, u ovom istraživanju je napravljena detaljna analiza tijekom različitih stadija diferencijacije stanica. Osim stanica koje su predodređene za diferencijaciju stanica, dio stanica uzgajan je i na podlogama u proliferacijskom mediju koji sadržava proliferacijske čimbenike. Zanimljivo je da u literaturi nema podataka o pojavi signala u proliferacijskim uvjetima, što je ovim istraživanjem dokazano. Iako mali broj, u proliferacijskim uvjetima opisane su THY1 – YFP pozitivne stanice koje su većinom nestin pozitivne, dok manji broj se nalazi u „zrelijem“ obliku i nije nestin pozitivan. U diferencijacijskim uvjetima THY1 – YFP pozitivne stanice su opisane od prvog dana diferencijacije.

Prema istraživanju (CORTI i sur., 2006.) u staničnoj kulturi izražaj YFP pod utjecajem *Thy1* gena zabilježen je isključivo u zrelim neuronima, ali ne i u nediferenciranim neurosferama. Navedeno istraživanje rađeno je na istom soju (YFP-16) kao i istraživanje u ovom doktorskom radu. Za razliku od CORTI i sur. (2006.) u ovom istraživanju su dokazane THY1 – YFP pozitivne stanice i u progenitornim stanicama i u zrelijim oblicima neurona već tijekom prvog dana diferencijacije *in vitro*. Progenitorne THY1 – YFP pozitivne stanice su zagasito zelene boje, okruglasnog su oblika i izrazito su nestin pozitivne, dok zreliji oblici pozitivnih stanica više nisu nestin pozitivni, ali su zato SOX2 pozitivni, kao i MAP2, β 3-tubulin i NeuN koji su standardni biljezi neurona. Sazrijevanjem stanične kulture broj THY1 – YFP progenitornih stanica se smanjuje i postupno prelaze u zrele neurone. Ovi oblici stanica dok se nalaze u

staničnoj kulturi izrazito su SOX2 pozitivni. Kolokalizacija nestina i progenitornih THY1 – YFP stanica vidljiva je samo tijekom prvog dana diferencijacije, ali kolokalizacija sa SOX2 se zadržava tijekom čitave diferencijacije. Već trećeg dana diferencijacije stanica progenitorne stanice postaju pozitivne na biljege neurona, iako te stanice još uvijek nisu zreli neuroni.

6.2. Izražaj THY1 – YFP *in vivo*

U ovom istraživanju osim u staničnoj kulturi, opisana je pojava THY1 – YFP pozitivnih stanica tijekom embrionalnog razvoja. Progenitorne THY1 – YFP pozitivne stanice vidljive su i tijekom 12,5. dana embrionalnog razvoja. U zametcima također se mogu razlikovati progenitorni oblici stanica od zrelijih stanica po intenzitetu boje. Progenitorne THY1 – YFP stanice su, slično kao i staničnoj kulturi, zagasito zelene boje i okruglastog su oblika dok su zreliji oblici stanica izrazito zelene boje i postupno poprimaju izgled neurona izrastanjem nastavaka. Za razliku od uvjeta u staničnoj kulturi, tijekom embrionalnog razvoja nema kolokalizacije između THY1 – YFP pozitivnih stanica i nestina, ali je vidljiva jasna kolokalizacija između THY1 – YFP i SOX2, MAP2 i β 3-tubulina tijekom svih stadija razvoja.

WANG i sur. (2006.) radili su istraživanje na THY1 – YFP soju „H“ i pokazali da je izražaj žute fluorescentne bjelančevine prisutan u nekoliko tipova neurona, ali u korteksu samo u piramidnim neuronima. U postnatalnim mozgovima intenzivan YFP signal vidi se u tijelu neurona i u aksonima, dok je u zametka 16. dana razvoja slab izražaj vidljiv samo u tijelu neurona. U usporedbi s navedenim istraživanjem, u soju na kojem je provedeno ovo istraživanje (YFP-16) signal je vidljiv i u aksonima kortikalnih neurona, dok WANG i sur. (2006.) signal u aksonima opisuju tek 18. dana embrionalnog razvoja. Iako je signal u području korteksa, odnosno kortikalnih neurona 16. dana embrionalnog razvoja slabiji u usporedbi sa signalom neurona u romencefalonu, ipak se vidi pozitivnost u aksonima. Sazrijevanjem zametka, a posebno tijekom prvih dana postnatalnog života intenzitet signala se strahovito pojačava. Prema ovom istraživanju signal u kralježničnoj moždini zametka opisan je u tijelu stanice i u aksonima u starosti od 12,5, pri čemu je izrazito jak signal u aksonima kralježnične moždine u zametka starog 15,5 dana.

PORRERO i sur. (2010.) također su radili istraživanja na soju THY1 – YFP soju „H“, ali na postnatalnim miševima od rođenja do 30. dana života te na odraslim miševima. Prema rezultatima autora većina THY1 – YFP pozitivnih stanica nalazi se u tri dijela prednjeg mozga i to u: neokorteksu, hipokampusu i amygdali. Osim u korteksu pozitivne stanice pronađene su bazalnom dijelu prednjeg mozga, jezgrama moždanog debla i kralježničnoj moždini što se podudara s rezultatima ovoga istraživanja. U navedenom istraživanju, autori su istraživali razvoj na THY1 – YFP pozitivnih stanica, ali prvi stadij u kojem su promatrali prisutnost pozitivnih stanica jest novorođena životinja (P0). Prema njihovom istraživanju u prednjem mozgu nisu pronašli pozitivne stanice, a kaudalniji dio mozga odnosno moždano deblo u ovom stadiju razvoja nisu promatrali. Za razliku od navedenog istraživanja u soju YFP-16 pozitivne stanice, javljaju se u prednjem mozgu već tijekom 13,5. dana embrionalnog razvoja u području njušnih lukovica. Sazrijevanjem zametka broj pozitivnih stanica kao i intenzitet signala se izrazito pojačava, tako da je u novorođene životinje u njušnim lukovicama teško diferencirati pojedinačne stanice. Osim u njušnim lukovicama u ovom istraživanju pozitivne stanice u novorođene životinje opisane su i korteksu i u hipokampusu.

FENG i sur. (2000.) navode da je izražaj YFP u nekih sojeva vidljiv 13. dana embrionalnog razvoja i postaje sve izraženiji u postnatalnom razdoblju, dok PORRERO i sur. (2010.) navode da se fluorescencija pojavljuje tek postnatalno. Tvrdnje navedenih autora ne slažu se s provedenim istraživanjem na YFP-16 soju, jer je za razliku od navedenih istraživanja pojava THY1 – YFP pozitivnih stanica opisana 12,5. dana embrionalnog razvoja u kralježničnoj moždini i slabije u rombencefalonu. U kralježničnoj moždini u ovom stadiju jači signal opisan je u ventralnim rogovima, ali rastom i razvojem zametka dolazi i do jačeg izražaja u dorzalnim rogovima kralježnične moždine. U rombencefalonu signal u ovom stadiju je slab, ali sazrijevanjem embrija dolazi do pojačavanja. Iako je 12,5. dana tek druga trećina graviditeta i neurogeneza u miša tek kreće, odnosno nije dosegla svoj maksimum, pozitivne stanice vidljive su i u perifernom dijelu živčanog sustava tj. u kralježničnim živcima. Kako embrionalni razvoj napreduje tako se i broj pozitivnih stanica i intenzitet signala izrazito pojačavaju što se slaže s tvrdnjama citiranih autora.

Prema istraživanju (YUASA, 2001.) astrociti u glodavaca se razvijaju u prvim danima postnatalnog života, nakon završetka neurogeneze. U ovom istraživanju autor je pomoću Tenascina-C koji je ekstracelularni biljag astrogije čiji se izražaj javlja prije GFAP-a, pratio

razvoj astroglije od subventrikularne zone do korteksa. Stanice koje su tenascin-C pozitivne migriraju nakon 15. dana embrionalnog razvoja te su nakon 17. dana vidljive u korteksu. Ove stanice tek u postnatalnih životinja postaju GFAP pozitivne. Rezultati YUASA (2001.) odgovaraju rezultatima provedenog istraživanja, budući da niti jedna GFAP pozitivna stanica nije vidljiva u THY1 – YFP tijekom embrionalnog razvoja.

GAETE i sur (2004.) opisuju razvoj zuba u miša tijekom embrionalnog razvoja. Prema navedenom istraživanju zub se započinje razvijati u starosti od 12,5 dana, a u stadiju kape nalazi se s 14,5 dana. Rezultati GAETE i sur. (2004.) podudaraju se s rezultatima provedenog istraživanja jer se u THY1 – YFP zametka starog 14,5 dana jasno vidi zub u stadiju kape. Osim toga u ventromedijalnom dijelu kape, opisane su i THY1 – YFP pozitivne stanice koje mogu pridonijeti praćenju razvoja zuba u ovog soja. Pozitivne THY1 – YFP, zapravo su aksoni živaca koji inerviraju zube. Budući da zube inerviraju grane petog mozgovnog živca (n. trigeminus) pri čemu gornje zube inerviraju alveolarne grane n. maxillarisa, a donje zube alveolarne grane n. mandibularisa, bilo je i očekivano pronaći THY1 – YFP pozitivne stanice jer peti mozgovni živac izlazi iz pontomedlarnog dijela embrionalnog mozga u kojem su pozitivne stanice opisane 13,5. dana razvoja.

6.3. Izražaj THY1 – YFP nakon transplantacije u mozak miša

U ovom istraživanju je napravljena transplantacija živčanih matičnih stanica podrijetlom od soja YFP-16 u mozak miša nakon izazivanja moždanog udara, ali i u zdrave kontrole kao bi se opisala pojava signala THY1 – YFP u transplantiranih stanica. Prema dostupnim podacima iz literature stanice podrijetlom ovoga soja, kao ni drugih sojeva koji pod utjecajem promotora *Thy1* gena izražavaju YFP nisu korištene u istraživanjima koja se bave transplantacijom stanica u mozak nakon izazivanja moždanog udara.

CORTI i sur. (2006.) transplantirali su stanice u lateralni ventrikul neonatalnih i odraslih miševa. U neonatalnih miševa transplantirane stanice su zabilježene dva mjeseca nakon transplatacije te je opisana njihova migracija i ugradnja u tkivo domaćina. Stanice su migrirale u područje mezencefalona gdje su okružile područje aqueductusa mesencephali te su se ugradile u hipokampus, talamus i hipotalamus. Osim u ovim djelovima stanice su migrirale i u striatum, corpus callosum te njušne lukovice. Brojne transplantirane stanice su se razvile u zrele neurone

dok su druge ostale u takozvanom nezrelom obliku. Iako su se stanice pojedinačno ugradile u tkivo domaćina brojne su se zadržale u nakupinama u blizini mjesta transplantacije. U odraslih miševa transplantirane stanice ponašale su se slično kao i neonatalnih miševa. Transplantirane stanice pozitivne su na biljege neurona kao što su NeuN, Tuj1, MAP2 i NF u obje transplantirane skupine. Rezultati CORTI i sur. (2006.) podudaraju se s provedenim istraživanjem, iako su je transplantacija rađena pod različitim uvjetima. U ovom istraživanju, zbog blizine lateralnog ventrikula mjestu transplantacije dio stanica ulazio je u ventrikule. Stanice koje su ušle u ventrikul, migrirale su po ventrikulima te su kroz endim pružile nastavke u tkivo domaćina, posebno u životinja s moždanim udarom. U kontrolnih životinja transplantirane stanice su stvorile manje ili veće sfere koje su se pričvrstile za endim. Stanice u sferama kao i pojedinačne stanice koje su pružile nastavke u tkivo, izrazito su THY1 – YFP pozitivne te kolokaliziraju sa svim biljezima neurona koji su korišteni u istraživanju (MAP2, β 3-tubulin i NeuN). Migracija iz ventrikula prema udaljenijim dijelovima tkiva kao što je striatum, posebno u kontrolnih životinja u ovom istraživanju nije zabilježena.

6.4. Korištenje THY1 – YFP u drugim istraživanjima

Budući da se radi o sojevima miševa koji izražavaju GFP odnosno jednu od njegovih spektralnih varijanti, ove linije zanimljeve su brojnim istraživačkim skupinama koje se bave morfologijom stanica neuronske loze. Osim istraživanja vezanim uz živčani sustav ovi sojevi koriste se i u istraživanjima imunskog sustava.

VUKŠIĆ i sur. (2008.) napravili su detaljnu morfometrijsku analizu i 3D rekonstrukciju granularnih stanica hipokampusa zahvaljujući izražaju GFP u mišjeg soja THY1 – GFP. Prema rezultatima ovoga istraživanja analizirana je veličina tijela stanice, dužina dendrita, broj segmenata, ukupni broj trnova – spina te njihova gustoća. Autori u ovom istraživanju opisuju kompleksniju građu dendrita u granularnim stanicama ventralnog dijela hipokampusa u odnosu na dorzalne dijelove, te zaključuju da je ovaj soj miša pogodan za istraživanja morfologije granularnih stanica.

CARTER i sur. (2011.) radili su istraživanja ozlijede kralježnične moždine na mišjem soju YFP-H. Na temelju ovog istraživanja autori su pokazali da kortikospinalni neuroni podliježu progresivnoj atrofiji nakon ozljede dorzalnog roga kralježnične moždine u području prsnog dijela kralježnice. U mozgu ozlijeđenih životinja dolaz do atrofije projekcijskih neurona u V. sloju korteksa.

COMLEY i sur. (2011.) istraživali su fiziološke učinke YFP na stanice koje ga izražavaju u soju THY1 – YFP. Autori u svom istraživanju navode da izražaj ove bjelančevine nije biološki inertan te da mijenja molekularne i stanične karakteristike živčanih stanica *in vivo* te dovodi do nepredvidljivih učinaka na neurodegenerativne puteve. Autori smatraju da ova bjelančevina utječe na molekularni sastav i staničnu aktivnost stanica koje ga izražavaju.

JOSAY i sur. (2014.) proveli su istraživanja na istom soju YFP-16 kao i ovo istraživanje. Autori u ovom istraživanju su pokazali da stroma subkutanog tumora koji je injekcijski induciran sadrži stanice ovog konstrukta iako se stanice YFP jasno razlikuju od tumorskih stanica koje su transfekcijski obilježene sa crvenom fluorescentnom bjelančevinom. Autori ovoga istraživanja zaključuju da se ovi sojevi mogu koristiti u istraživanjima upale, cjeljenja rana, različitim modelima tumora, a prije svega u istraživanjima živčanog sustava.

KEIFER i sur. (2015.) u svom recentnom istraživanju koristili su soj THY1 – YFP i te su uspoređivali histološku gustoću dendrita, odnosno njihovih trnova – spina zahvaljujući fluorescenciji bjelančevine te su je uspoređivali sa rezultatima magneteske rezonance.

7. ZAKLJUČCI

1. THY1 – YFP je izražen u progenitornim i u zrelijim oblicima stanica tijekom prvog dana diferencijacije *in vitro*

Tijekom diferencijacije stanica *in vitro*, THY1 – YFP pozitivne stanice vidljive su od prvog dana diferencijacije, s time da se jasno razlikuju progenitorne stanice koje su zagasito zelene boje i zreliji oblici stanica. Progenitorne stanice su nestin pozitivne, dok zreliji oblici stanica nisu. Za razliku od nestina oba tipa stanica su SOX2 pozitivni. Prema tome može se zaključiti da je THY1 – YFP izražen i u progenitornim i u zrelijim oblicima stanica. Osim u uvjetima diferencijacije THY1 – YFP pozitivne stanice vidljive su i u proliferacijskim uvjetima.

2. THY1 – YFP je izražen u neuronima tijekom diferencijacije *in vitro*

Tijekom diferencijacije stanica *in vitro*, THY1 – YFP pozitivne stanice su pozitivne i na specifične biljege neurona (MAP2, β 3-tubulin i NeuN) od prvog dana do kraja trajanja diferencijacije. Iako je biljeg NeuN tipičan za jezgre neurona u zreлом živčanom sustavu, mi smo tijekom diferencijacije uočili i dodatnu prisutnost NeuN-a u citoplazmi. Od ukupnog broja neurona koji su MAP2 i β 3-tubulin pozitivni njih 21,3–22,5% je THY1 – YFP pozitivno. Budući da niti jedna THY1 – YFP pozitivna stanica nije GFAP pozitivna, zaključujemo da je izražaj THY1 karakterističan za neurone.

3. THY1 – YFP je izražen tijekom embrionalnog razvoja u središnjem živčanom sustavu

Tijekom embrionalnog razvoja THY1 – YFP pozitivne stanice su prvi put vidljive u 12,5 dana starog zametka. Na tom stadiju je najintenzivniji signal vidljiv u ventralnim rogovima kralježnične moždine. Tijekom razvoja signal postaje sve jači, posebno u kralježničnoj moždini, rombencefalonu, telencefalonu, te u njušnim lukovicama. U hipokampusu se signal nalazi u CA1 području tijekom 17,5. dana razvoja. Za razliku od uvjeta *in vitro*, THY1 – YFP pozitivne stanice nisu istovremeno i nestin pozitivne. Kao i u *in vitro* uvjetima, SOX2, MAP2 i β 3-tubulin kolokaliziraju s THY1 – YFP stanicama tijekom embrionalnog razdoblja.

4. THY1 – YFP je izražen tijekom embrionalnog razvoja i u perifernom živčanom sustavu

Tijekom embrionalnog razvoja THY1 – YFP pozitivne stanice su nađene i u perifernom živčanom sustavu. Tijekom 12,5. dana pozitivne su stanice nađene u kralježničnim te u moždanim živcima (V i VII). Tijekom 14,5. dana embrionalnog razvoja nalazimo pozitivne stanice u ventro-medijalnom dijelu zuba, koji se tada nalazi u stadiju kape. U mrežnici su pozitivne stanice vidljive u zametka starog 17,5 dana. Na temelju ovog nalaza može se zaključiti da se ovaj soj može koristiti i u proučavanju razvoja perifernog živčanog sustava.

5. THY1 – YFP stanice se mogu upotrijebiti u istraživanjima praćenja stanica nakon transplantacije

Budući da smo pokazali da je 22,5% neurona THY1 – YFP pozitivno to donosi mogućnost da se ovaj genetski konstrukt može iskoristiti u pokusima praćenja transplantiranih stanica. Iako se na ovaj način ne mogu kvantificirati sve stanice upravo činjenica da fluorescentni signal vidimo u jednoj četvrtini stanične populacije omogućuje vizualizaciju pojedinačnih stanica. Tako je ovom metodom moguće vidjeti sve dijelove stanica, te pratiti izrastanje nastavaka i integraciju u tkivo domaćina.

6. THY1 – YFP pozitivne stanice ugradile su se u hipokampus ozlijeđenog miša

U ozlijeđenom hipokampusu THY1 – YFP pozitivne stanice se diferenciraju i ugrađuju se u tkivo, u potpunosti zadobivajući fenotip stanica domaćina. U ozlijeđenom tkivu, stanice su nađene u CA1 i CA3 području, gdje su pružile nastavke i povezale se međusobno i sa stanicama domaćina. U kontrolnim životinjama stanice ostaju na mjestu transplantacije. Što su stanice udaljenije od područja ozljede slabije se diferenciraju i ostaju u nakupinama.

7. THY1 – YFP izražen u stanicama transplantiranim u ventrikul miša

Zbog neposredne blizine lateralnog ventrikula mjestu transplantacije, dio stanica je tijekom transplantacije ušao u ventrikule, te tamo oblikovao sfere pričvršćene za stijenke ventrikula. U životinjama koje su zahvaćene moždanim udarom su stanice pružale nastavke u tkivo prolazeći kroz ependimski sloj. U kontrolnih životinja se stanice zadržavaju u manjim ili većim sferama te ne pružaju nastavke.

8. POPIS LITERATURE

ALVAREZ-BUYLLA, A., C. Y. LING, J. R. KIRN (1990): Cresyl violet: a red fluorescent Nissl stain. *J Neurosci Methods* 33, 129–133.

ANDERSEN, K. K., T. S. OLSEN, C. DEHLENDORFF, L. P. KAMMERSGAARD (2009): Hemorrhagic and Ischemic Strokes Compared Stroke Severity, Mortality, and Risk Factors. *Stroke* 40, 2068–2072.

ANONYMOUS (2015): Allen Brain Atlas, Allen Developing Mouse Brain Reference Atlas. [citirano 02. 02. 2015.] Dostupno na: <http://developingmouse.brain-map.org/static/atlas>

ANONYMOUS (2015): European Commission, Health, Major and Chronic Diseases, Diseases, Brain and neurological diseases. [citirano 02. 05. 2015.] Dostupno na: URL http://ec.europa.eu/health/major_chronic_diseases/diseases/brain_neurological/index_en.htm

BACIGALUPPI, M., S. PLUCHINO, G. MARTINO, E. KILIC, D. M. HERMANN (2008): Neural stem/precursor cells for the tretment of ischemic stroke. *J Neurol Sci* 265, 73–77.

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.

BARLOW, J. Z., G. W. HUNTLEY (2000): Developmentally Regulated Expression of Thy-1 in Structures of the Mouse Sensory-Motor System. *J Comp Neurol* 421, 215–233.

BATTI, L., M. MUKHTAROV, E. AUDERO, A. IVANOV, R. C. PAOLICELLI, S. ZURBORG, C. GROSS, P. BREGESTOVSKI, P. A. HEPPENSTALL (2013): Transgenic mouse lines for non-invasive ratiometric monitoring of intracellular chloride. *Front Mol Neurosci* 6, 1–14.

BEAULIEU, J. M., J. KRIZ, J. P. JULIEN (2002): Induction of peripherin expression in subsets of brain neurons after lesion injury or cerebral ischemia. *Brain Res* 946, 153–161.

BELAYEV, L., R. BUSTO, W. ZHAO, G. FERNANDEZ, M. D. GINSBERG (1999): Middle cerebral artery occlusion in the mouse by intraluminal suture coated with poly-L-lysine: neurological and histological validation. *Brain Res* 833, 181–190.

BÜHNEMANN, C., A. SCHOLZ, C. BERNREUTHER, C. Y. MALIK, H. BRAUN, M. SCHACHNER, K. G. REYMAN, M. DIHNE (2006): Neuronal differentiation of transplanted embryonic stem cell-derived precursors in stroke lesions of adult rats. *Brain* 129, 3238–3248.

BUSCH, E., K. KRUGER, K. A. HOSSMANN (1997): Improved model of thromboembolic stroke and rt-PA induced reperfusion in the rat. *Brain Res* 778, 16–24.

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.

CHANG, D. J., S. H. OH, N. LEE, C. CHOI, I. JEON, H. S. KIM, D. A. SHIN, S. E. LEE, D. KIM, J. SONG (2013): Contralaterally transplanted human embryonic stem cell-derived neural precursor cells (ENStem-A) migrate and improve brain functions in stroke-damaged rats *Experimental & Molecular Medicine*. doi:10.1038/emm.2013.93.

CHEN, J., P. R. SANBERG, Y. LI, L. WANG, M. LU, A. E. WILLING, J. SANCHEZ-RAMOS, M. CHOPP (2001): Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke* 32, 2682–2688.

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.

DARSALIA, V., S. J. ALLISON, C. CUSULIN, E. MONNI, D. KUZDAS, T. KALLUR, O. LINDVALL, Z. KOKAIA (2011): Cell number and timing of transplantation determine survival of human neural stem cell grafts in stroke-damaged rat brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 31, 235–242.

DURUKAN, A., T. TATLISUMAK (2007): Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 87, 179–197.

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.

FUKSE, K., B. BJELKE, B. ANDBJER, H. GRAHN, R. RIMONDINI, L. F. AGNATI (1997): Endothelin-1 induced lesions of the frontoparietal cortex of the rat. A possible model of focal cortical ischemia. *Neuroreport* 8, 2623–2629.

GAETE, M., N. LOBOS, M. A. TORRES-QUINTANA (2004): Mouse tooth development time sequence determination for the ICR/Jcl strain. *Journal of Oral Science* 46, 135–141.

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

GAO, J., J. E. DENNIS, R. F. MUZIC, M. LUNDBERG, A. I. CAPLAN (2001): The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cell Tissue Research* 169, 12–20.

GARZON-MUVDI, T., A. QUINONES-HINOJOSA (2010): Neural stem cell niches and homing: recruitment and integration into functional tissues. *ILAR Journal* 51, 3–23.

GIGUERE, V., K. I. ISOBE, F. GROSVELD (1985): Structure of Murine Thy-1 gene. *The EMBO Journal* 4, 2017–2024.

HICKS, A., J. JOLKKONEN (2009): Challenges and possibilities of intravascular therapy in stroke. *Acta Neurobiol Exp* 69, 1–10.

HIGASHIJIMA, S., Y. HOTTA, H. OKAMOTO (2000): Visualization of cranial motor neurons in live transgenic zebrafish expressing green fluorescent protein under the control of the islet-1 promoter/enhancer. *J Neurosci* 20, 206–218.

HOF, P. R., W. G. YOUNG, F. E. BLOOM, P. V. BELICHENKO, M. R. CELIO (2000): *Comparative Cytoarchitectonic Atlas of the C57BL/6 and 129/Sv Mouse Brains*. Elsevier, Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo.

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.

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

JIN, K., Y. SUN, L. XIE, X. O. MAO, J. CHILDS, A. PEEL, A. LOGVINOVA, S. BANWAIT, D. A. GREENBERG (2005): Comparison of ischemia-directed migration of neural precursor cells after intrastrial, intraventricular, or intravenous transplantation in the rat. *Neurobiol Dis* 18, 366–374.

JIN, K., L. XIE, X. MAO, M. B. GREENBERG, A. MOORE, B. PENG, R. B. GREENBERG, D. A. GREENBERG (2011): Effect of human neural precursor cell transplantation on endogenous neurogenesis after focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res* 1374, 56–62.

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.

KEIFER, O. P., R. C. HURT, D. A. GUTMAN, S. D. KEILHOLZ, S. L. GOURLEY, K. J. RESSLER (2015): Voxel-based morphometry predicts shifts in dendritic spine density and morphology with auditory fear conditioning. NATURE COMMUNICATIONS, DOI: 10.1038/ncomms8582

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.

KELLY, S., T. M. BLISS, A. K. SHAH, G. H. SUN, M. MA, W. C. FOO, J. MASEL, M. A. YENARI, I. L. WEISSMAN, N. UCHIDA, T. PALMER, G. K. STEINBERG (2004): Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. PNAS 101, 11839–11844.

KNOBEL, K. M., E. M. JORGENSEN, M. J. BASTIANI (1999): Growth cones stall and collapse during axon outgrowth in *Caenorhabditis elegans*. Development 126, 4489–4498.

KOIZUMI, J., Y. YOSHIDA, T. NAKAZAWA, G. OONEDA (1986): Experimental studies of ischemic brain edema: 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. Jpn Stroke J 8, 1–8.

LINDVALL, O., Z. KOKAIA (2010): Stem cells in human neurodegenerative disorders – time for clinical translation?. J Clin Invest 120, 29–40.

LLOVERA, G., S. ROTH, N. PLESNILA, R. VELTKAMP, A. LIESZ (2014): Modeling Stroke in Mice: Permanent Coagulation of the Distal Middle Cerebral Artery. Journal of Visualized Experiments 89,1–9.

LONGA, E. Z., P. R. WEINSTEIN, S. CARLSON, R. CUMMINIS (1989): Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke 20, 84–91.

MA, J., J. GAO, B. HOU, J. LIU, S. CHEN, G. YAN, H. REN (2015): Neural stem cell transplantation promotes behavioral recovery in a photothrombosis stroke model. *Int J Clin Exp Pathol* 8, 7838–7848.

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.

MIYAZAWA, T., A. TAMURA, S. FUKUI, K. A. HOSSMANN (2003): Effect of mild hypothermia on focal cerebral ischemia. Review of experimental studies. *Neurol Res* 25, 457–464.

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

MODO, M., J. S. BEECH, T. J. MEADE, S. C. R. WILLIAMS, J. PRICE (2009): A chronic 1 year assessment of MRI contrast agent-labelled neural stem cell transplants in stroke. *NeuroImage* 47, 133–142.

MURRAY, M. J., D. J. MERRITT, A. H. BRAND, P. M. WHITINGTON (1998): In vivo dynamics of axon pathfinding in the *Drosophila* CNS: a timelapse study of an identified motorneuron. *J. Neurobiol.* 37, 607–621.

NARODNE NOVINE (2001): Pravilnik o zaštiti životinja. Narodne novine 47/2001.

NARODNE NOVINE (2006): Zakon o zaštiti životinja. Narodne novine 135/2006.

NARODNE NOVINE (2013): Pravilnik i zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe. Narodne novine 55/2013.

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.

RAMANAN, V. K., A. J. SAYKIN (2013): Pathways to neurodegeneration: mechanistic insights from GWAS in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and related disorders. *Am J Neurodegener Dis* 2, 145–175.

REGE, T. A., J. S. HAGOOD (2006): Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *The FASEB Journal* 20, 1045–1054.

ROBERTS, R. (1968): *The Mouse, its reproduction and development*. Burgess Publishing Company, Minneapolis.

ROBINSON, M. J., I. M. MACRAE, M. TODD, J. L. REID, J. MCCULLOCH (1990): Reduction of local cerebral blood flow to pathological levels by endothelin-1 applied to the middle cerebral artery in the rat. *Neurosci Lett* 118, 269–272.

RODRIGUEZ, I., P. FEINSTEIN, P. MOMBAERTS (1999): Variable patterns of axonal projections of sensory neurons in the mouse vomeronasal system. *Cell* 97, 199–208.

SANBERG, P. R., A. E. WILLING, S. GURBUZOVA-DAVIS, S. SAPORTA, G. LIU, C. D. SANBERG, P. C. BICKFORD, S. K. KLASAKO, N. S. EL-BADRI (2005): Umbilical cord blood-derived stem cells and brain repair. *Ann N Y Acad Sci* 1049, 67–83.

SHARKEY, J., I. M. RITCHIE, P. A. KELLY (1993): Perivascular microapplication of endothelin-1: a new model of focal cerebral ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 13, 865–871.

SPANOPOULOU, E., V. GIGUERE, F. GROSVELD (1991): The Functional Domains of the Murine *Thy-1* Gene Promoter. *Molecular and Cell Biology* 11, 2216–2228.

TAKAHASHI, K., S YAMANAKA (2006): Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676.

TAKAHASHI, K., T. YASUHARA, T. SHINGO, K. MURAOKA, M. KAMEDA, A. TAKEUCHI, A. YANO, K. KUROZUMI, T. AGARI, Y. MIYOSHI, K. KINUGASA, I. DATE (2008): Embryonic neural stem cells transplanted in middle cerebral artery occlusion model of rats demonstrated potent therapeutic effects, compared to adult neural stem cells. *Brain Research* 1234, 172–182.

THEILER, K. (1989): *The house mouse: Atlas of Embryonic Development*. Springer-Verlag, Berlin.

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.

YUASA, S. (2001): Development of Astrocytes in the Mouse Embryonic Cerebrum Tracked by Tenascin-C Gene Expression. *Arch Histol Cytol* 64, 119–126.

YUTAKA, M., J. TATARISHVILI, K. OKI, E. MONNI, Z. KOKAIA, O. LINDVALL (2013): Grafted human neural stem cells enhance several steps of endogenous neurogenesis and improve behavioral recovery after middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurobiol Dis* 52, 191–203.

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, B. D., W. D. DIETRICH, R. BUSTO, M. S. WACHTEL, M. D. GINSBERG (1985): Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol* 17, 497–504.

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.

WEI, L., L. CUI, B. J. SNIDER, M. RIVKIN, S. S. YU, C. S. LEE, L. D. ADAMS, D. I. GOTTLIEB, E. M. JOHNSON, S. P. YU, D. W. CHOIA (2005): Transplantation of embryonic stem cells overexpressing Bcl-2 promotes functional recovery after transient cerebral ischemia. *Neurobiology of Disease* 19, 183–193.

WHO (2014): *Global status report on noncommunicable diseases 2014*. [citirano 02. 05. 2015.]. Dostupno: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854_eng.pdf?ua=1

9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA

Ivan Alić rođen je 18. svibnja 1985. u Gospiću gdje je završio osnovnu školu. Opću gimnaziju završio je u Otočcu. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao je 2003. gdje je i diplomirao je 2009. Tijekom studija bio je demonstrator u Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju te je izradio dva studentska znanstvena rada nagrađena Rektorovom nagradom. Akademske godine 2010./2011. upisao je poslijediplomski doktorski studij iz veterinarskih znanosti, a od 01. lipnja 2011. zaposlen je kao asistent-znanstveni novak na projektu „Morfometabolička istraživanja placente i organa životinja“. Godine 2012. priključio se timu „Laboratorija za matične stanice“ Hrvatskog instituta za istraživanje mozga. Objavio je pet znanstvenih radova od čega su tri citirana u CC, a dva u SCI Expanded. Aktivno je sudjelovao na dvanaest međunarodnih kongresa i četiri radionice. Sudjeluje u dodiplomskoj nastavi iz predmeta: „Anatomija s organogenezom domaćih životinja I, II i III“, „Klinička anatomija“, „Poredbena anatomija koštanog sustava“ i „Arheozoologija“. Kao suradnik uključen je i u izvođenje nastave na poslijediplomskom doktorskom studiju. Bio je voditelj dva studentska znanstvena rada i prevoditelj sveučilišnog udžbenika „Veterinarska embriologija“. Član je European Association of Veterinary Anatomists (EAVA), Hrvatskog društva za neuroznanost, te organizacijskog odbora međunarodnog kongresa „Veterinarska znanost i struka“.

Popis objavljenih radova

Poglavlja u knjizi:

1. TRBOJEVIĆ VUKIČEVIĆ, T., **I. ALIĆ** (2008): Arheozoološka analiza (Gradski park Virovitica; drveni piloti mosta). U: Srednjovjekovna nizinska utvrda u Virovitici. (M. Kulej). Gradski muzej Virovitica, Virovitica. str. 39–44.

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima:

1. KOSI, N., **I. ALIĆ**, M. KOLAČEVIĆ, N. VRSALJKO, N. JOVANOVIĆ MILOŠEVIĆ, M. SOBOL, A. PHILIMONENKO, P. HOZAK, S. GAJOVIĆ, R. POCHET, 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.
2. **ALIĆ, I.**, T. TRBOJEVIĆ VUKIČEVIĆ, M. ĐURAS, S. KUŽIR, G. FAZARINC, V. GJURČEVIĆ KANTURA (2014): Variation in Pectoral Girdle Muscles in Dogs. *Anat Histol Embryol* 43, 16–21.
3. GJURČEVIĆ KANTURA, V., Z. JANJEČIĆ, S. MUŽIĆ, D. ŽUPANIĆ, Ž. MIKULEC, M. ZOBUNDŽIJA, **I. ALIĆ**, D. STANIN, LJ. BEDRICA (2011): The influence of pasture and supplemental restrictive or free choice feeding on the

morphometabolic characteristic of some muscles in Zagorje turkeys. Tierärztl Umschau 66, 166–170.

Znanstveni radovi u drugim časopisima:

1. ALIĆ, I., T. TRBOJEVIĆ VUKIČEVIĆ, M. ĐURAS, S. KUŽIR, D. VNUK, S. NEJEDLI, L. PENDOVSKI, V. GJURČEVIĆ KANTURA (2014): Anatomic variations of the neck muscles in dogs. Vet. arhiv 84, 51–60.
2. RADMANIĆ, L., J. TRŠAN, I. ALIĆ (2014): Mišići prsnoga pojasa kune bjelice (*Martes foina*, ERX.). Veterinar: časopis studenata veterinarske medicine Zagreb 52, 14–22.
3. TRBOJEVIĆ VUKIČEVIĆ, T., I. ALIĆ, A. SLAVICA, M. POLETTO, S. KUŽIR (2012): Preliminary Osteometrical Analysis of Metapodium and Acropodium Bones of Fallow deer (*Dama dama* L.) from the Brijuni Islands (Croatia). Vet. arhiv 82, 75–88.

Stručni radovi:

1. ROBIČ, B., S. KUŽIR, A. KOSTELIĆ, I. ALIĆ, M. BELČIĆ, T. TRBOJEVIĆ VUKIČEVIĆ (2014): Morfometrijska analiza kostiju međimurskog konja. Hrvatski veterinarski vjesnik 22, 61–68.

Kongresno priopćenje (sažeci) u CC časopisu:

1. ALIĆ, I., T. TRBOJEVIĆ VUKIČEVIĆ, M. ĐURAS, D. VNUK, V. GJURČEVIĆ KANTURA (2014): Clinical importance of muscle variation in dogs. Anat Histol Embryol, 23–26 July, Cluj-Napoca, Rumunjska, pp. 21–22.
2. KUŽIR, S., D. VINDUŠIN, T. TRBOJEVIĆ VUKIČEVIĆ, I. ALIĆ, E. GJURČEVIĆ (2014): Histological investigation of the eyes in certain marine fish species – preliminary research. Anat Histol Embryol, 23–26 July, Cluj-Napoca, Rumunjska, pp. 59.
3. GJURČEVIĆ KANTURA, V., T. TRBOJEVIĆ VUKIČEVIĆ, I. ALIĆ, S. NEJEDLI, S. KUŽIR, D. STANIN (2010): Abnormalities of the m. sternohyoideus and m. stylohyoideus in a dog. Anat Histol Embryol, 28–31 July, Pariz, Francuska, pp. 290.
4. TRBOJEVIĆ VUKIČEVIĆ, T., I. ALIĆ, M. ĐURAS GOMERČIĆ, S. KUŽIR, V. GJURČEVIĆ KANTURA (2010): Unusual bilateral origin of the omotransversarius muscle in a dog. Anat Histol Embryol, 28–31 July, Pariz, Francuska, pp. 262.

Kongresno priopćenje (sažeci) u ostalim časopisima:

1. ALIĆ, I., M. ĐURAS GOMERČIĆ, A. STOJANAC, T. TRBOJEVIĆ VUKIČEVIĆ, S. KUŽIR, V. GJURČEVIĆ KANTURA (2012): Unilateral agenesis of intercostal muscles in a dog. BJVM, 25–28 July, Stara Zagora, Bugarska, pp. 129.

2. TRBOJEVIĆ VUKIČEVIĆ, T., I. ALIĆ, S. KUŽIR, M. ĐURAS GOMERČIĆ, V. GJURČEVIĆ KANTURA (2012): Anatomical variation of the scalenus dorsalis muscle in a dog. BJVM, 25–28 July, Stara Zagora, Bugarska, pp. 129–130.

Sažeci u zbornicima skupova:

1. GAJOVIĆ, S., A. BOZZA, I. PONGRAC, I. ALIĆ, S. CASAROSA (2014): Alginate application in the mouse brain as a potential carrier for stem cells. NanoTools for diagnosis and regeneration of tissues with PT Korea symposium, 23-24 October, Porto, Portugal, pp. 69-70.
2. MITREČIĆ, D., N. KOSI, I. ALIĆ, S. GAJOVIĆ (2014): Markers of synapse formation appearing in neural stem cells after transplantation in mouse brain affected by ischemic stroke. International society for stem cell research, 12th annual meeting, 18-21 June, Vancouver, Canada, pp. 302.
3. KOSI, N., D. GORUP, I. ALIĆ, S. GAJOVIĆ, D. MITREČIĆ (2013): Survival and integration of embryonic neural stem cells transplanted into ischemic mouse brain. World Conference of Regenerative Medicine, 23-25 October, Leipzig, Njemačka, pp. 394.
4. LOVRIĆ, M., L. FERHATOVIĆ, D. POLŠEK, N. KOSI, L. BRKIĆ, I. ALIĆ, R. POCHE, S. CASAROSA, S. GAJOVIĆ (2013): Mouse fetal neural stem cell preparation and brain transplantation using alginate hydrogels. J Tissue Eng Regen Med, 7–9 October, Porto, Portugal, pp. 29
5. ALIĆ, I., N. KOSI, K. KAPURALIN, D. GORUP, S. GAJOVIĆ, D. MITREČIĆ (2013): Application of neural stem cells originating from THY1 - YFP mouse strain in transplantation experiments. 4th Croatian Neuroscience Congress, 20-21 September, Zagreb, Hrvatska, pp. 45–46.
6. LOVRIĆ, M., L. FERHATOVIĆ, N. KOSI, I. ALIĆ, L. BRKIĆ, D. POLŠEK, S. CASAROSA, S. GAJOVIĆ (2013): 3D Culture of mouse neuronal stem cells in calcium alginate beads. 4th Croatian Neuroscience Congress, 20-21 September, Zagreb, Hrvatska, pp. 38.
7. ALIĆ, I., S. KUŽIR, T. TRBOJEVIĆ VUKIČEVIĆ, D. VNUK, S. DURO, V. GJURČEVIĆ KANTURA (2013): Additional part of M. Sartorius in the Dog and its importance in femoral hernia surgery. The 4th International Scientific Meeting Days of Veterinary Medicine 2013, 6-8 September, Struga, Makedonija, pp. 142.
8. ALIĆ, I., R. REBAC, A. STOJANAC, M. ĐURAS, T. TRBOJEVIĆ VUKIČEVIĆ, S. KUŽIR, V. GJURČEVIĆ KANTURA (2013): Persistent left cranial cardinal vein in a dog. Proceedings of the 7th Meeting of the Young Generation of Veterinary Anatomists, 17–20 July, Leipzig, Njemačka, pp. 11.
9. ALIĆ, I., N. KOSI, K. KAPURALIN, D. GORUP, D. MITREČIĆ (2013): Expression of THY1 - YFP during mouse embryonic development. Proceedings of the 7th Meeting

of the Young Generation of Veterinary Anatomists, 17–20 July, Leipzig, Njemačka, pp. 10–11.

10. KOSI, N., I. ALIĆ, K. KAPURALIN, S. GAJOVIĆ, D. MITREČIĆ (2012): Expression of genes involved in synapse formation during differentiation of neural stem cells. Microscopy conference, 16–17 November, Pula, Hrvatska.
11. ĐURAS GOMERČIĆ, M., T. GOMERČIĆ, A. GALOV, H. LUCIĆ, D. ŠKRTIĆ, S. ČURKOVIĆ, H. BRZICA, K. ŠPIRANEC, I. ALIĆ (2012): High number of striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) deaths during 2012 in the Adriatic sea. Zbornik sažetaka 11. hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, 16–21 September, Šibenik, Hrvatska, pp. 203–204.
12. TRBOJEVIĆ VUKIČEVIĆ, T., I. ALIĆ, A. SLAVICA, K. BABIĆ, S. KUŽIR (2007): Osteometrical Analysis of Metapodial Bones and Phalanges of Fallow Deer (*Dama Dama* L.) from Brijuni Island. Book of Abstracts of 2nd International Symposium „Game and Ecology“, 17–20 October, Plitvička jezera, Hrvatska pp. 80.