

Utjecaj ishemije na in vitro diferencijaciju živčanih matičnih stanica izoliranih iz mišjeg soja THY1 YFP16

Šimunić, Barbara

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:622183>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-23**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET



Barbara Šimunić

**Utjecaj ishemije na in vitro diferencijaciju živčanih matičnih
stanica izoliranih iz mišjeg soja THY1 YFP16**

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2017.

Diplomski rad je izrađen u Laboratoriju za matične stanice Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te u laboratoriju Zavoda za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: izv. prof. dr.sc. Dinko Mitrečić, dr. med.

SADRŽAJ

SAŽETAK.....	3
SUMMARY	4
POPIS SLIKA	5
POPIS TABLICA.....	6
POPIS KRATICA	7
1. UVOD.....	8
1.1 Matične stanice	8
1.1.1 Podrijetlo i obilježja matičnih stanica	8
1.1.2 Primjena matičnih stanica	9
1.2 Ishemija/ Hipoksija	11
1.2.1 Definicija i patogeneza ishemije/ hipoksije	11
2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA	13
2.1. Hipoteza	13
2.2. Ciljevi rada	13
3. MATERIJALI I METODE.....	14
3.1 Pokusne životinje	14
3.2 Postupci sa stanicama.....	14
3.2.1 Izolacija živčanih matičnih stanica	14
3.2.2 Uzgoj neurosfera	15
3.2.3 Disocijacija stanica i bojenje	15
3.2.4 Priprema podloga za diferencijaciju stanica	16
3.2.5 Diferencijacija stanica.....	16
3.2.6 Fiksacija diferenciranih stanica.....	16
3.2.7 Snimanje na EVOS- uređaju	16
4. REZULTATI	19
5. RASPRAVA.....	25
6. ZAKLJUČAK.....	27
7. ZAHVALA	28
8. LITERATURA	29
9. ŽIVOTOPIS.....	30

SAŽETAK

Barbara Šimunić

Utjecaj ishemije na in vitro diferencijaciju živčanih matičnih stanica izoliranih iz mišjeg soja THY1 YFP16

Ishemija mozga dovodi do teških posljedica na moždano tkivo, a moždani udar je jedan od najvećih problema moderne medicine. Budući da matične stanice imaju veliki potencijal u liječenju raznih bolesti, njihova trasplantacija je predložena kao moguća metoda u smanjivanju štetnih posljedica ishemije na moždano tkivo. Ipak, vrlo se malo zna o utjecaju ishemije na same matične stanice.

Cilj ovog istraživanja je bio utvrditi utjecaj ishemije na ponašanje i diferencijaciju živčanih matičnih stanica uzgajanih u kulturi. Nakon izolacije matičnih stanica iz mišjih zametaka, napravljena je analiza kretanja stanica, njihovog rasta i diferencijacije uz pomoć visokorezolucijskog mikroskopa EVOS te njegovog poluautomatskog softvera Cell Tracker. Nakon što su stanice izložene ishemiji, analiziran je niz parametara (ukupna prijeđena udaljenost svih stanica, maksimalna dosegnuta brzina, maksimalna prijeđena udaljenost po jednoj stanici i udio naglih skretanja po stanici), a statistički značajna razlika je nađena u ukupnoj udaljenosti koje pređu sve stanice u kulturi. Ovim istraživanjem smo uspostavili nov način analize utjecaja različitih čimbenika na matične stanice, te smo pokazali da ishemija mijenja njihovo ponašanje.

Ključne riječi: matične stanice, ishemija, živčani sustav, in vitro mikroskopija uživo

SUMMARY

Barbara Šimunić

Effect of ischemia on in vitro differentiation of neural stem cells isolated from mouse strain THY1 YFP16

Brain ischemia leads to serious brain damage and stroke is one of the major problems of modern medicine. Since stem cells have great potential in treating various diseases, their transplantation is suggested as a possible method of reducing the damaging consequences of ischemia on brain tissue. Still, it is not much known about the effect of ischemia on the stem cells. The aim of this study was to determine the effect of ischemia on the behavior and differentiation of neural stem cells grown in the culture. After isolation of stem cells from mouse embryos, analysis of cell movement, their growth and differentiation was made with the help of a high-resolution EVOS microscope and its semi-automatic Cell Tracker software.

After the cells were exposed to ischemia, a number of parameters were analyzed (the length of the total traveled distance of all cells, the maximum speed, the maximum distance reached per cell and the rate of sudden rotation per cell). The statistically significant difference was found in the length of the total traveled distance of all cells. This research has established a new way of analyzing the effects of various factors on stem cells, and we have shown that ischemia changes their behavior.

Key words: stem cells, ischemia, nervous system, in vitro live microscopy

POPIS SLIKA

Slika 1. Prikaz EVOS mikroskopa za automatsko slikanje visokom rezolucijom.	17
Slika 2. Prikaz poluautomatskog softvera Cell Tracker s naprednim alatima za snimanje i analizu kretanja stanica.	18
Slika 3. Prikaz kontrolne skupine živčanih matičnih stanica koje su se počele diferencirati nakon 24 sata, slikane EVOS mikroskopom.	19
Slika 4. Prikaz živčanih matičnih stanica koje su se počele diferencirati nakon što su 1h provele u hipoksijskim uvjetima. Morfološki se ne uočava razlika u odnosu na kontrolnu skupinu.	20
Slika 5. Prikaz živčanih matičnih stanica koje su se počele diferencirati nakon što su 3h provele u hipoksijskim uvjetima. Morfološki se ne uočava razlika u odnosu na kontrolnu skupinu.	20
Slika 6. Prikaz živčanih matičnih stanica fluorescentnim načinom. Ove stanice su se počele diferencirati nakon što su 3h bile izložene hipoksijskim uvjetima. Izražaj gena Thy1 nije promijenjen nakon izloženosti hipoksiji.	21
Slika 7. Prikaz živčanih matičnih stanica koje su se počele diferencirati nakon što su 3h bile izložene hipoksijskim uvjetima. Promatrane su 6. dan u normoksijskim uvjetima. Izražaj gena Thy1 nije promijenjen nakon izloženosti hipoksiji.	21
Slika 8. Prikaz ukupne prijeđene udaljenosti kontrolne skupine stanica te stanica koje su bile izložene hipoksijskim uvjetima u trajanju od 1h i 3h.	23
Slika 9. Prikaz maksimalne dosegnute brzine migracije stanica iz kontrolne skupine, te stanica izloženih hipoksiji u trajanju od 1h i 3h.	24
Slika 10. Prikaz maksimalne prijeđene udaljenosti po jednoj stanici.	24
Slika 11. Prikaz udjela naglih skretanja po stanici.	24

POPIS TABLICA

Tablica 1. Rezultati analize varijance između skupina	22
--	----

POPIS KRATICA

YFP	yellow fluorescent protein
NK	engl.natural killer, stanice ubojice
ATP	adenozin trifosfat
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartat receptor
AMPA	engl. α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor
DNA	engl. deoxyribonucleic acid
TNF	engl. tumor necrosis factor
IL	engl. interleukin
TGF	engl. transforming growth factor
PBS	engl. Phosphate Buffer Solution
DMEM	engl. Dulbecco's Modified Eagle's medium
bFGF	engl. basic fibroblast growth factor
EGF	engl. epidermal growth factor
PFA	paraformaldehid
HBSS	engl. Hank's balanced salt solution
NSC	engl. neural stem cell
NPC	engl. neural progenitor cell
MSC	mesenchymal stem cells
CTRL	kontrolna skupina
HYP1h	hipoksija u trajanju 1 sat
HYP3h	hipoksija u trajanju 3 sata

1. UVOD

1.1 Matične stanice

Matične stanice su stanice iz kojih se mogu razviti sva tkiva u organizmu. Dva su osnovna obilježja matičnih stanica: sposobnost dijeljenja, tj. samoobnavljanja te sposobnost diferencijacije u specijalizirane stanice. Matične stanice podrijetlom iz mišjeg embrija su prvi puta izolirane i uzgojene u kulturi 1981. godine, a humane matične stanice uzgojene su in vitro 1998. godine [1].

1.1.1 Podrijetlo i obilježja matičnih stanica

Obzirom na podrijetlo, matične stanice se mogu podijeliti na embrionalne i adultne matične stanice. Zigota i njene stanice-kćeri, odnosno blastomere su u prvih nekoliko dioba totipotentne. To znači da se iz njih, u odgovarajućim uvjetima može razviti embrio sposoban za život. Tijekom daljnjih nekoliko diobi stanice gube svoju totipotentnost i postaju pluripotentne, što znači da imaju sposobnost diferencirati se u različite tipove stanica, odnosno tkiva i organa u tijelu, ali ne više i u cijeli embrio. Embrionalne matične stanice se mogu dobiti iz unutrašnje mase stanica blastociste koja izgledom podsjeća na šuplju kuglu sastavljenu od oko 150-200 stanica. Adultne ili somatske stanice, za razliku od embrionalnih, imaju sposobnost diferencijacije u stanice specifične samo za određeni organ, te se zbog toga nazivaju i multipotentne [2].

Iznimku od pravila hijerarhije od totipotentnosti prema nižim razinama potencijala su znanstvenici postigli 2006.godine kada su u određenim uvjetima „pretvorili“ adultne stanice u pluripotentne, tzv. inducirane pluripotentne matične stanice [1].

Adultne matične stanice u nekim organima u našem tijelu nastaju redovito, svakodnevno obnavljajući oštećene i nadomještajući potrošene stanice (npr. u koštanoj srži i epitelu tkiva), a u nekima se aktiviraju tek u slučaju potrebe (npr. u srcu i gušterači). U koštanoj srži se nalaze dvije skupine matičnih stanica- hematopoetske, iz kojih nastaju eritrociti, B limfociti, T limfociti, prirodne NK stanice ubojice, neutrofili, bazofili, eozinofili, monociti i makrofazi, te mezenhimalne matične stanice koje su izvor osteoblasta i osteocita, hondrocita, adipocita i stromalnih stanica.

Živčane matične stanice su izvor neurona te potpornih stanica u mozgu- astrociti i oligodendrociti. Epitelne matične stanice u probavnom sustavu nalaze se u crijevnim kriptama – žlijezdama i preteča su apsorpcijskih, vrčastih, Panethovih i enteroendokrinih stanica. Matične stanice kože nalaze se u bazalnom sloju epidermisa i folikula dlake, a služe obnovi keratinocita, odnosno folikula dlake [1].

1.1.2 Primjena matičnih stanica

Danas se matične stanice sve više primijenjuju u terapijske svrhe, a jedan od najpoznatijih primjera je transplantacija koštane srži za liječenje leukemije, koja se uspješno izvodi još od 1950. godine.

Osim za liječenje leukemije, terapija matičnim stanicama može se primijeniti i za liječenje limfoma, različitih imunih deficijencija, talasemija i sl. Glavni izvori humanih matičnih stanica, osim koštane srži su pupkovina i periferna krv. Za liječenje nasljednih defekata krvnih stanica, kao što su naprimjer talasemija i srpasta anemija, potrebno je provesti i određenu korekciju gena, dok za stečene bolesti poput stečene aplastične anemije, to nije potrebno. Ova vrsta terapije ima i svoje nedostatke, kao što su rizik od odbacivanja presatka protiv davaoca, mali broj odgovarajućih davatelja, nedovoljna in vitro ekspanzija matičnih stanica, teškoće primjene genske terapije itd.

Što se tiče terapije neuroloških bolesti, mogućnosti su još uvijek dosta skromne; iako su postignuti dobri rezultati u ublažavanju simptoma, primjerice Parkinsonove bolesti. Ipak, krajnji cilj je postići trajno izlječenje tih teških bolesti u koje, osim spomenute Parkinsonove, ubrajamo još i Huntingtonovu bolest, amiotrofičnu lateralnu sklerozu, moždani udar i sl.

Primjena matičnih stanica u liječenju srčanih i jetrenih bolesti i oštećenja također je još dosta ograničena te je potrebno uložiti dodatne napore u to područje istraživanja [5].

Terapija matičnim stanicama također se pokazala uspješnom u smislu uzgoja i presađivanja tkiva (primjerice kod nekih bolesti kostiju, kože i rožnice) [2].

Razvojem 3D kulture omogućen je uzgoj složenih organiziranih struktura nalik organima, koji se nazivaju organoidi. Pristup uzgoju se razlikuje ovisno o tome jesu li inicijalno upotrijebljene embrionalne ili adultne matične stanice.

Prototipni organoid mišjeg crijeva uzgojen je iz adultnih matičnih stanica te je kao jednoslojan epitel organiziran u crijevne resice i kripte, a sadržavao je enterocite, vrčaste stanice, Panethove stanice, enteroendokrine i matične stanice koje su sve zajedno okruživale lumen.

Početakom 2015. godine pacijent koji boluje od cistične fibroze se prvi put liječio na temelju istraživanja koja su provedena na organoidu nalik njegovom vlastitom organu crijeva. Nakon toga je još sedam pacijenata liječeno prema rezultatima ovog personaliziranog pristupa organoidima.

Uzgojeni su organoidi endodermalnog, mezodermalnog i ektodermalnog porijekla. Iako je prvi organoid endodermalnog porijekla uzgojen iz adultnih matičnih stanica bio organoid mišjeg crijeva, znanstvenici su uspjeli uzgojiti i ljudske organoide. Tako su dosad uzgojeni ljudski organoidi nalik crijevima, želucu, gušterači, jetri, jednjaku, žučnom mjehuru, prostati i okusnim pupoljcima. Paralelno, uzgojeni su i neki organoidi iz ljudskih pluripotentnih matičnih stanica nalik tankom crijevu, plućima, jetri, štitnjači, želucu te tkivima gušterače i žučnih vodova. Zadnji primjer je uzgoj tijela želuca kulturom pluripotentnih matičnih stanica. Nedavni uspješan primjer uzgoja iz pluripotentnih matičnih stanica je organoid ljudskog crijeva s funkcionalnim živčanim sustavom. Od organoida mezodermalnog porijekla uspješno su uzgojeni organoidi nalik bubrezima kao i jajovodi.

Što se tiče organoida ektodermalnog porijekla, u kulturi su nasadene embrionalne matične stanice, a iz njih su u posebnim uvjetima uzgojeni organoidi nalik očnom vrču, malom mozgu, hipokampusu te adenohipofizi, kao i mliječnoj žlijezdi te žlijezdi slinovnici.

Osim svega navedenog, u posebnim laboratorijskim uvjetima uzgojene su i strukture nalik malim humanim fetalnim mozgovima. Godine 2016. tri su grupe znanstvenika na modelima organoida fetalnih mozгова dokazale izrazitu neurotropnost virusa Zike, kao i to da su preteče neurona izrazito osjetljive na virus Zike u prvom tromjesečju fetalnog razvoja. Ljudski organoidi su odlični modeli za proučavanje patofiziologije i specifičnih učinaka virusa u pokusima in vitro. Oni su obećavajuća zamjena za životinjske modele te su budućnost u smislu personalizirane terapije [3].

1.2 Ishemija/ Hipoksija

1.2.1 Definicija i patogeneza ishemije/ hipoksije

Ishemija mozga je stanje u kojem je opskrba mozga krvlju prekinuta ili znatno smanjena, najčešće uslijed aterosklerotičnih suženja krvnih žila, tromboze, embolije i sl. Zbog ishemije neuroni ne dobivaju dovoljno kisika, što negativno utječe na energetske procese u mozgu.

Kada dođe do toga da neuroni više ne mogu održavati normalni transmembranski ionski gradijent ni homeostazu, pojavljuju se patološke pojave u obliku ekscitotoksičnosti, oksidativnog stresa, upale i apoptoze, a posljedično tome i stanične smrti. Dio mozga u kojemu je prekinuta opskrba krvlju ireverzibilno propada zbog nekroze, a okolno tkivo može još neko vrijeme ostati metabolički aktivno (penumbra), te se pravovremenom intervencijom može spasiti. Sve stanice u tijelu (pa tako i moždane) osjetljive su na nedostatak kisika jer je on bitan za obnovu visokoenergetskog ATP-a, što se događa u mitohondrijima u procesu oksidativne fosforilacije.

ATP je neophodan za rad Na-K pumpe koja održava transmembranski ionski gradijent normalnim (Na izbacuje izvan stanice, a K ubacuje natrag u stanicu). Uslijed hipoenergoze zatajit će i Ca^{++} pumpa što će za posljedicu imati veliki porast unutarstaničnog Ca^{++} , aktivaciju kalcij-ovisnih proteaza, lipaza i DNA-aza koje će voditi stanicu u smrt. Mozak sadrži puno neurotransmitera glutamata koji u stanju hipoksije pretjerano aktivira glutamatne receptore (NMDA i AMPA), olakšava ulazak kalcijevih iona u stanicu te posljedično tome izaziva ekscitotoksičnost odnosno oštećenje i odumiranje stanica. Ovo je važno stoga što su neke studije otkrile da se inhibicijom AMPA i NMDA glutamatnih receptora sprječava ulazak Ca^{++} u stanice, što može djelovati neuroprotektivno.

Tijekom ishemije, razni mehanizmi dovode to stvaranja slobodnih radikala kao što su reaktivni kisikovi radikali i reaktivni dušikovi radikali koji oštećuju stanične molekule i doprinose programiranoj staničnoj smrti. Jedan od mehanizama nastanka slobodnih radikala je i hipoenergozom uzrokovan nastanak mliječne kiseline, a time i acidoze. Oni sudjeluju u stvaranju slobodnih hidroksidnih i peroksilnih radikala, koji su važni inicijatori lipidne peroksidacije, oštećenja staničnih proteina, DNA i staničnog citoskeleta.

Opisano oštećenje tkiva posredovano slobodnim radikalima dovodi do upalnog odgovora posredstvom stanica mikroglije koje se transformiraju u specijalizirane makrofage te otpuštaju proupalne citokine- TNF- α , IL-1 β i IL-6 te kemokine. Ovi citokini i kemokini dovode do aktivacije neutrofila, monocita, T-limfocita i NK-stanica pojačavajući upalni odgovor unutar moždane lezije.

Osim štetnog učinka uzrokovanog prolaskom navedenih proupalnih stanica kroz oštećenu krvno-moždanu barijeru, nastaju i neki korisni učinci kao što su fagocitoza, odnosno čišćenje nekrotičnog tkiva te formacija glijalnog „ožiljka“ na mjestu ishemične lezije. Tijekom ishemijske, brojne stanice kao što su mikroglija, astrociti, neuroni i endotelne stanice otpuštaju i protoupalne citokine, npr. TGF-beta i IL-10. Uslijed upale se aktiviraju proteolitički enzimi kao što su primjerice matriks metaloproteinaze za koje je u mnogim studijama dokazano da oštećuju krvno-moždanu barijeru te na taj način olakšavaju infiltraciju leukocita s periferije na mjesto oštećenja.

Dva su načina aktivacije apoptoze- intrinzični i ekstrinzični. Intrinzični put započinje aktivacijom mitohondrijskih signalnih puteva, a ekstrinzični je posljedica aktivacije određenih staničnih receptora. Ranije spomenuta aktivacija glutamatnih NMDA receptora te ulazak Ca⁺⁺ u stanicu potiče otvaranje pora na mitohondrijskoj membrani, izlazak mitohondrijskog citokroma „c“ s posljedičnom aktivacijom kaspaza koje će cijepati enzime popravljачe DNA, a time dovesti do oštećenja DNA i stanične smrti.

Ekstrinzični put započinje vezanjem specifičnih liganda na „receptore smrti“ te na taj način aktivira kaspaze dovodeći do stanične smrti. Ovakva kompleksnost patofizioloških mehanizama je razlog zašto još uvijek nema idealne terapije u liječenju moždanog udara, kao i pokazatelj da je potrebno raditi na istraživanju lijekova koji će djelovati na molekularnoj razini [4].

2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA

2.1. Hipoteza

Hipoteza ovog istraživanja je da ishemija djeluje na ponašanje živčanih matičnih stanica uzgajanih u kulturi.

2.2. Ciljevi rada

Kako bismo potvrdili hipotezu, osnovni cilj ovog istraživanja je bio istražiti kako se diferenciraju živčane matične stanice nakon što su bile izložene hipoksiji od 1 i 3 sata.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Pokusne životinje

Za potrebe ovog istraživanja su korišteni miševi soja THY1 YFP16. Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu odobrilo je sve postupke sa životinjama, koji su također u skladu i s odredbama Zakona o zaštiti životinja (NN 135/06) i čl. 9 Pravilnika o uvjetima držanja pokusnih životinja, posebnim uvjetima za nastambe i vrstama pokusa (NN 176/04).

Mišji soj THY1 YFP16 dizajniran je s posebnom namjerom da se omogući lakše praćenje živčanih matičnih stanica na njihovom putu sazrijevanja, odnosno diferencijacije (počevši od toga da ih se može pratiti u embrionalnim mozgovima te nakon izolacije i transplantacije u mozgove odraslih jedinki). Za razliku od komercijalno dostupnih egzogenih boja kod kojih signal oslabi, ovaj soj omogućuje trajno praćenje svih dijelova neurona (tijela, dendrita i aksona) i to zahvaljujući specifičnom žutom fluorescentnom proteinu koji je pod kontrolom THY1 promotora [6].

3.2 Postupci sa stanicama

3.2.1 Izolacija živčanih matičnih stanica

U pokusu su žrtvovane ženke gravidne 14 dana. Nakon žrtvovanja, životinja je položena na leđa i očišćena 70% alkoholom. Trbušna šupljina je otvorena te su izolirani rogovi maternice sa zametcima i premješteni u sterilnu Petrijevu posudu napunjenu HBSS puferom, a zatim su odvojene ovojnice. Prije početka izolacije embrija, pripremljene su 2 velike Petrijeve posude, svaka sa po cca 10 ml HBSS-a ili PBS-a pufera. Embriji iz jednog roga maternice prebačeni su u čistu Petrijevu posudu, te se rad nastavio u sterilnoj komori. Maternica je prebačena u čistu Petrijevu posudu s puferom i tada su otvoreni mišji zameci koji su zatim dekapitirani. Izvađeni su telencephaloni koji su onda prebačeni u sterilnu tubu (BD Falcon, 50mL) u malo HBSS-a da se tkivo ispere i da nije na suhom, te je ponovljen postupak za sve ostale embrije.

Telencefaloni su usitnjeni škaricama te su pipetom preneseni u sterilnu tubu (BD Falcon, 50mL). Nakon dodavanja 5 mL akutaze kako bi se razgradio višak vezivnog tkiva, sadržaj tube je grijan u ruci 20 min uz lagano protresanje i trituiranje.

Nakon 20 minuta, tekući sadržaj (stanična suspenzija, bez tkiva) prebačen je u novu tubu od 50mL i na to se dodaje 5 ml DMEM medija da se blokira djelovanje akutaze. Slijedi centrifugiranje na 300g, 6 minuta, 21 C°. Nakon centrifuge supernatant je odstranjen i u talog stanica dodano je 5 ml DMEM medija, a za to vrijeme pripremljen je novi medij za uzgoj stanica. Talog je lagano protresanjem resuspendiran te je suspenzija stanica zatim nasadena u flasku u ostatak medija za rast-ukupno je dobiveno 25 mL suspenzije.

3.2.2 Uzgoj neurosfera

Izolirane matične stanice koje su nasadene u flasku stavljene su u inkubator na 37°C i 5% CO₂ te su se nakon nekog vremena spontano organizirale u kuglaste nakupine-tzv. neurosfere, koje nakon nekog vremena treba razdvojiti disocijacijom i razrijediti ih.

3.2.3 Disocijacija stanica i bojenje

Uzgojene neurosfere zajedno s medijem za rast NSC-a premještene su u sterilne tube od 50 mL i centrifugirane pri brzini od 300 g, 6 minuta na 21 °C. Nakon centrifuge dobiven je talog neurosfera u starom mediju koji je zatim uklonjen, te smo u talog dodali 2 mL akutaze i grijali u ruci uz lagano protresanje i trituiranje 10 minuta. Na stanice je djelovao enzim 10 min kako bi se razbile veće sfere, a suspenzija stanica 10 – 20 puta je promiješana s nastavkom za pipete. Mutni tekući sadržaj sa stanicama prebačen je u novu tubu te je dodano 5 mL medija DMEM/F-12 za neutralizaciju akutaze.

Nakon centrifugiranja i uklanjanja supernatanta, u talog stanica dodali smo 1 ml medija za rast NSC-a i resuspendirali stanice tipsom. U 1 bunaric w/p, dodajemo 90 ml tripan blue boje i u nju resuspendiramo 10 ml stanične suspenzije (resuspendiramo sadržaj pipetom od 10 ml), uzmemo 10 ml sadržaja i njime punimo komoricu (NeuBauerova komorica).

Broje se 4 vidna polja (4 mrežice), zbrojimo stanice unutar svih mrežica, podijelimo sa 4.

Okolo 3 000 000 stanica premješteno je u čiste flaske s medijem, pri čemu je stavljeno pola starog medija (10ml), a pola je nadodano novog medija.

3.2.4 Priprema podloga za diferencijaciju stanica

Kao podloga za diferencijaciju, korištena su stakalca koja su prethodno sterilizirana s HNO₃, isprana destiliranom vodom i preko noći ostavljena u 70% alkoholu. Stakalca su nakon toga stavljena u sterilizator na 240 °. Nakon toga na stakalca je stavljen Poly-D-lizin u koncentraciji 1 µg/mL koji je stajao preko noći. Nakon što je Poly-D-lizin ispran sterilnom vodom, stakla su premještena u ploče za diferencijaciju -24 well plate te se dodao laminin u koncentraciji 1 µg/mL koji je također stajao preko noći na 4 C°. Laminin je drugi dan ispran PBS-om te je u wellove stavljeno 250 µL medija za diferencijaciju.

3.2.5 Diferencijacija stanica

Nakon pauze od 2 sata, stanice su se već organizirale u neurosfere , a za to vrijeme smo ih držali u inkubatoru. Iz flaski smo prebacili medij sa stanicama u tube, centrifugirali i resuspendirali, a zatim nasadili 150 000 stanica po stakalcu. Stanice su na diferencijaciju stavljene u novom mediju, bez čimbenika rasta (bFGF i EGF). Korišteno je 500 µL medija bez faktora (od čega 250 µL sa stanicama). Prije nasadivanja ploče za diferencijaciju (24 well plate) stavljene su u inkubator radi ekvibracije (37°C i 5% CO₂). Kad su stanice nasadene, pogledamo ih pod mikroskopom.

3.2.6 Fiksacija diferenciranih stanica

Nakon što je krenula diferencijacija, stanice su fiksirane nakon 24h, pa nakon 3 dana, (5) i 7 dana. Kao fiksator korišten je 4% PFA kroz 10-ak minuta. Nakon fiksacije stanice su 4 puta isprane PBS-om.

3.2.7 Snimanje na EVOS- uređaju

EVOS mikroskop je sustav za automatsko slikanje te je idealan za praćenje staničnih kultura u vremenu i s visokom rezolucijom. EVOS-ova komora omogućava preciznu kontrolu temperature, vlažnosti i plinova za snimanje živih stanica u vremenu te fizioloških i nefizioloških (hipoksičnih) stanja. EVOS je idealan za snimanje rutinske kulture tkiva i stanica, njihovog rasta i diferencijacije, analizu kretanja stanica itd.

Ključna komponenta EVOS-a je integrirani poluautomatski softver za analizu Cell Tracker koji ima standardne funkcije i napredne alate za snimanje i analizu. Sve snimljene slike mogu se spremiti [7].

Na EVOS-u su namješteni hipoksični uvjeti (0% kisika), te su stavljena 3 stakalca po danu snimanja u 24-well-plate: kontrola, zatim 1-satna hipoksija i 3-satna hipoksija i na taj način su stanice praćene 1.dan, 3., 6., 9. i 15.



Slika 1. Prikaz EVOS mikroskopa za automatsko slikanje visokom rezolucijom.

EVOS-ova komora omogućava kontrolu raznih parametara uključujući temperaturu, vlažnost i plinove, kao i snimanje živih stanica i staničnih kultura u realnom vremenu.



Slika 2. Prikaz poluautomatskog softvera Cell Tracker s naprednim alatima za snimanje i analizu kretanja stanica.

4. REZULTATI

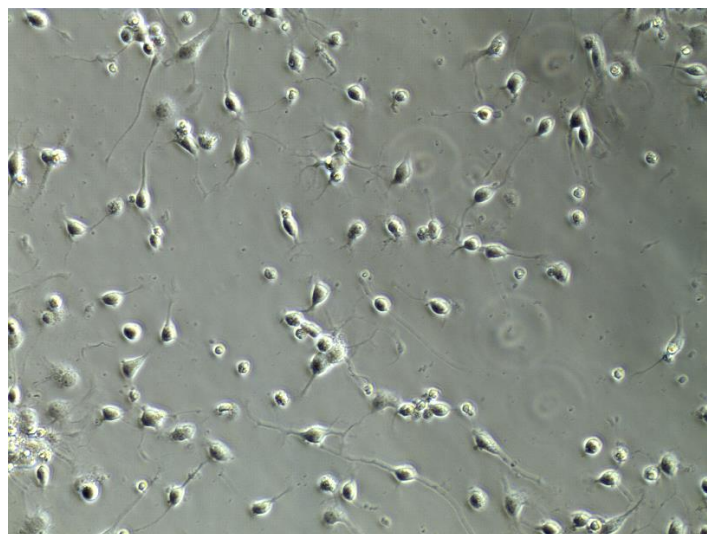
4.1. Usporedba kontrolne skupine stanica s onima izloženim hipoksiji

Nakon što smo izolacijom iz mišjih zametaka uzgojili živčane matične stanice, od iste skupine stanica smo napravili tri skupine: kontrolnu, skupinu koja će u ishemiji provesti 1 sat i onu koja će provesti 3 sata. Te su stanice zatim praćene u normoksijskim uvjetima 15 dana.

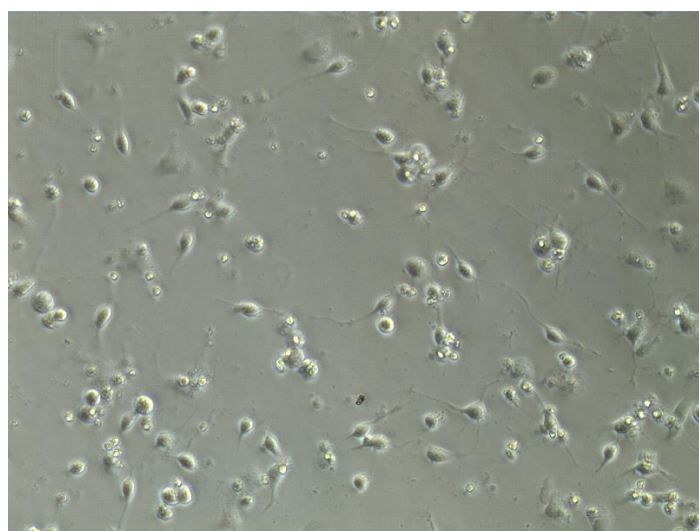
EVOS je snimao stanice tijekom 14 sati svake 3 minute, što se naknadno spojilo u video zapis kojim je prikazana stanična migracija.



Slika 3. Prikaz kontrolne skupine živčanih matičnih stanica koje su se počele diferencirati nakon 24 sata, slikane EVOS mikroskopom.

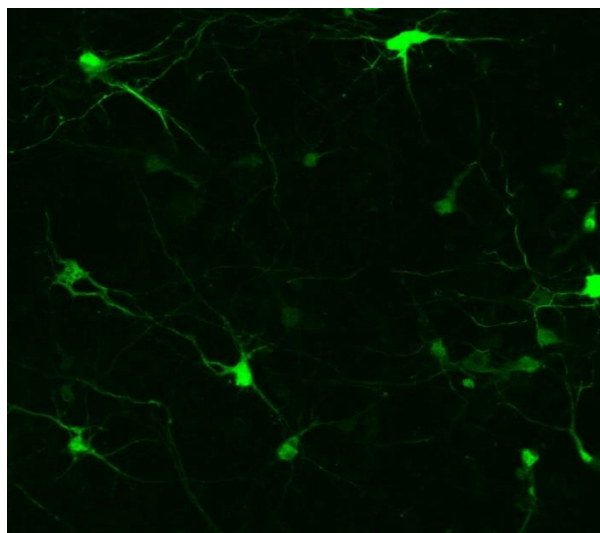


Slika 4. Prikaz živčanih matičnih stanica koje su se počele diferencirati nakon što su 1h provele u hipoksijskim uvjetima. Morfološki se ne uočava razlika u odnosu na kontrolnu skupinu.

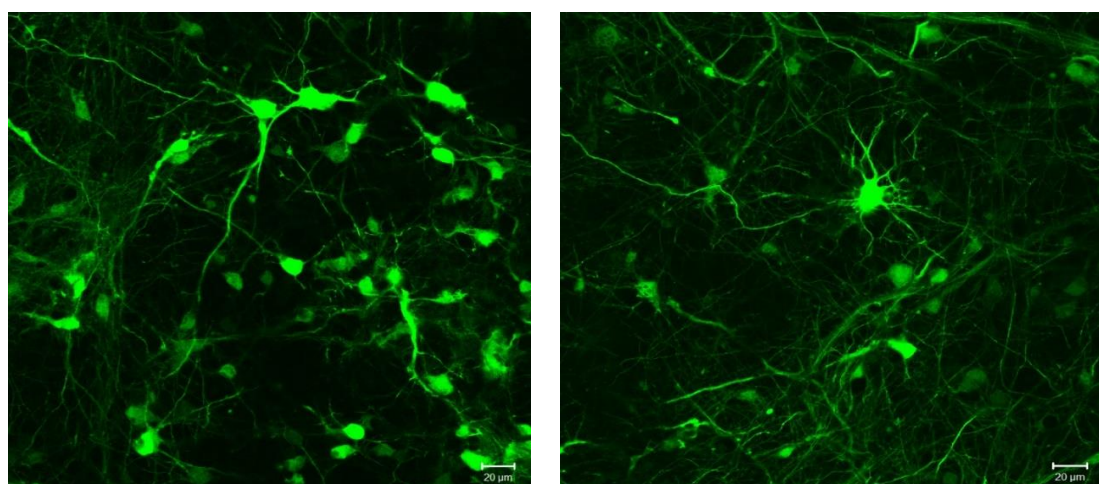


Slika 5. Prikaz živčanih matičnih stanica koje su se počele diferencirati nakon što su 3h provele u hipoksijskim uvjetima. Morfološki se ne uočava razlika u odnosu na kontrolnu skupinu.

Nakon 14h snimanja stanice su fiksirane i obojene. Nakon što su stanice iz ishemičnih uvjeta vraćene u normalne, praćene su i snimane Evos sustavom, te su rezultati analizirani poluautomatskim softverom za analizu Cell Tracker.



Slika 6. Prikaz živčanih matičnih stanica fluorescentnim načinom. Ove stanice su se počele diferencirati nakon što su 3h bile izložene hipoksijskim uvjetima. Izražaj gena Thy1 nije promijenjen nakon izloženosti hipoksiji.



Slika 7. Prikaz živčanih matičnih stanica koje su se počele diferencirati nakon što su 3h bile izložene hipoksijskim uvjetima. Promatrane su 6. dan u normoksijskim uvjetima. Izražaj gena Thy1 nije promijenjen nakon izloženosti hipoksiji.

Nakon što morfološka opažanja nisu otkrila nikakvu razliku, korišten je program CellTracker kako bi izmjerio parametre živih stanica u gibanju. Od niza analiziranih parametara (ukupna prijeđena udaljenost svih stanica, maksimalna dosegnuta brzina, maksimalna prijeđena udaljenost po jednoj stanici i udio naglih skretanja po stanici), statistički značajna razlika je nađena u ukupnoj udaljenosti koje pređu sve stanice u kulturi. Time je pokazano da ishemija, posebno ona u trajanju od 1 sata, potiče stanice na pojačanu migraciju.

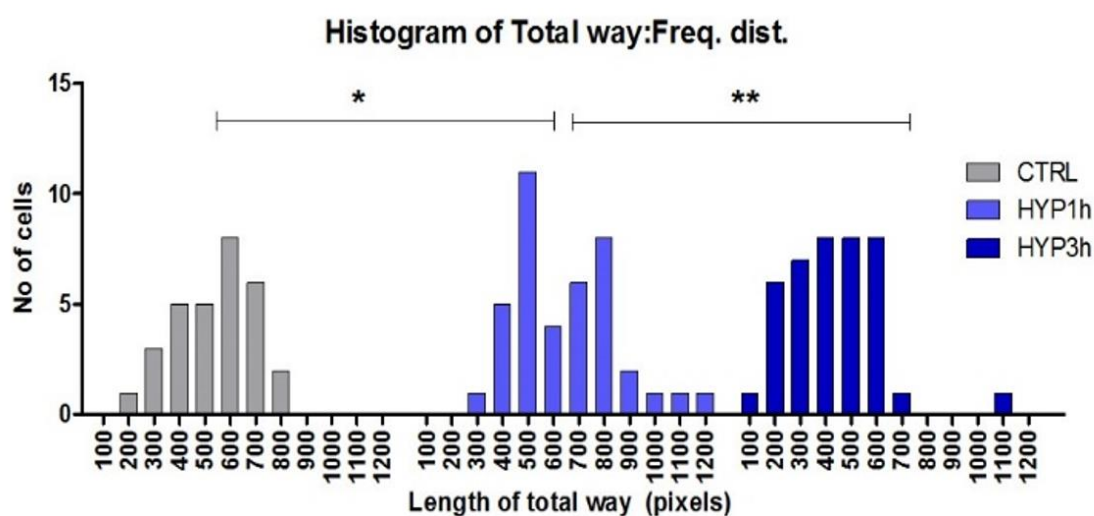
Analiza ukupno prijeđenog puta učinjena je programskim paketom MATLAB, proizvođača MathWorks (Natick, MA, SAD) i to analizom varijance (ANOVA) između skupina CTRL, HYP1h i HYP3h. Usporedba varijance napravljena je za skupine CTRL – HYP1h; CTRL – HYP3h te HYP1h i HYP3h skupinu kako je prikazano u tablici 1.

Tablica 1. Rezultati analize varijance između skupina

GRUPA	CTRL	HYP1h	HYP3h
CTRL	1	0,0195	0,0109
HYP1h	0,0195	1	$3,83 \cdot 10^{-6}$
HYP3h	0,0109	$3,83 \cdot 10^{-6}$	1

Za nivo statističke značajnosti odabrana je vrijednost $\alpha = 0,05$. Kako je vidljivo iz tablice utvrđena je značajna statistička razlika između grupa CTRL i HYP1h te CTRL i HYP3h. Razlika je ujedno uočena i između grupa HYP1h i HYP3h.

Ovime je potvrđena hipoteza kako hipoksija utječe na migraciju živčanih stanica.



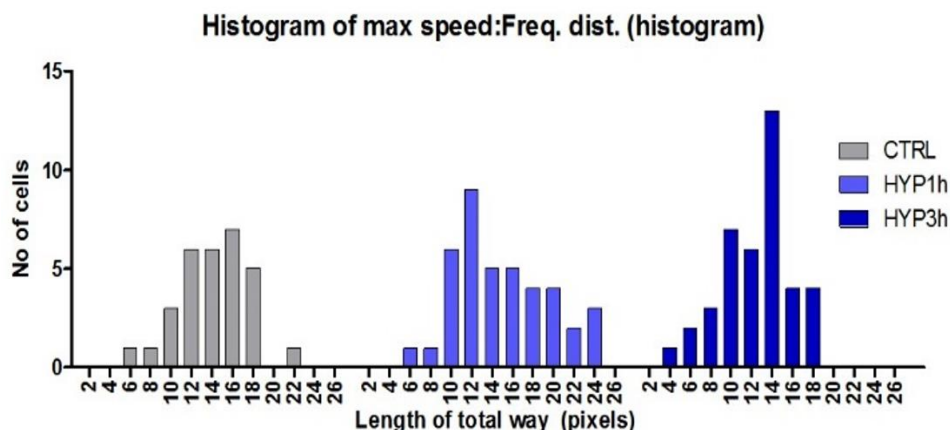
Slika 8. Prikaz ukupne prijeđene udaljenosti kontrolne skupine stanica te stanica koje su bile izložene hipoksijskim uvjetima u trajanju od 1h i 3h.

Stanice koje su bile izložene hipoksiji u trajanju od jednog sata više migriraju od stanica iz kontrolnih uvjeta.

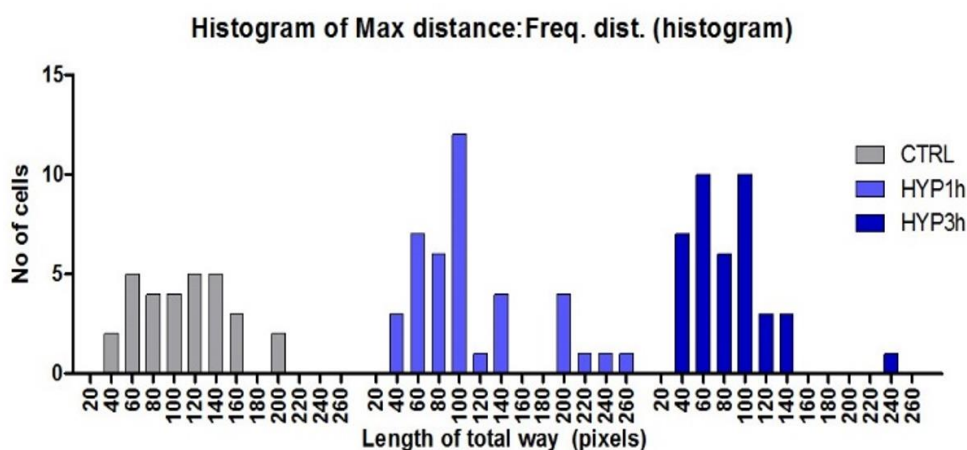
Tako su stanice koje su provele 1 sat u ishemijskim uvjetima prelazile 45% veću udaljenost, mjerenu u periodu od 8 sati, u odnosu na kontrolnu skupinu.

Stanice koje su provele 3 sata u hipoksiji, pa su vraćene u normalne uvjete su u početku pojačano migrirale, ali su onda počele pojačano odumirati. Iako će za potvrdu ovog nalaza trebati pažljivo ispratiti svaku pojedinu stanicu, čini se da one stanice koje kreću u migraciju na veću udaljenost, nakon toga odumiru, za razliku od stanica koje manje migriraju i preživljavaju.

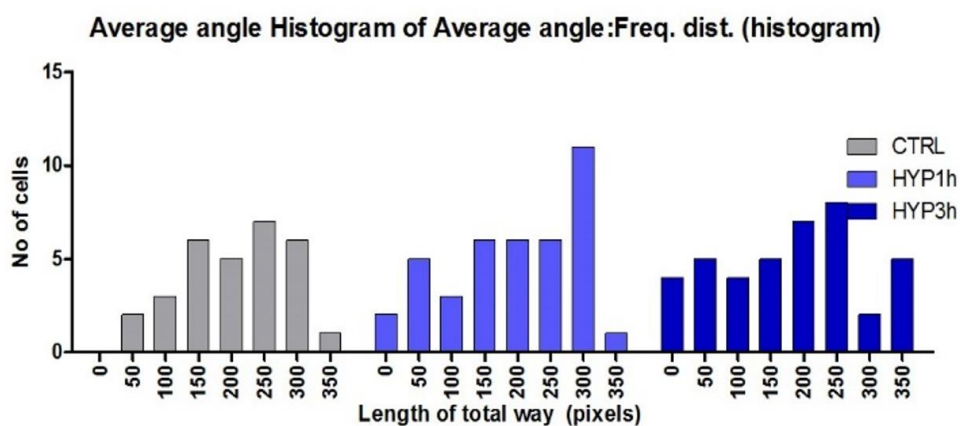
Usporedbom fluorescentnog signala stanica Thy1 nakon izloženosti hipoksiji nisu nađene razlike u odnosu na stanice koje su uzgajane u normalnim uvjetima.



Slika 9. Prikaz maksimalne dosegnute brzine migracije stanica iz kontrolne skupine, te stanica izloženih hipoksiji u trajanju od 1h i 3h.



Slika 10. Prikaz maksimalne prijedene udaljenosti po jednoj stanici.



Slika 11. Prikaz udjela naglih skretanja po stanici.

5. RASPRAVA

Iako se mnogo zna o štetnom djelovanju hipoksije na cijelo tijelo, tkiva i stanice, ne postoje brojni radovi koji su proučavali utjecaj hipoksije na nastanak i diferencijaciju neurona. U nekim eksperimentalnim modelima je pokazano kako se u mozgu događaju određene kompenzacijske promjene u svrhu popravka strukture i funkcije mozga, no upravo se primjenom matičnih stanica nastoji smanjiti negativni ishod hipoksično-ishemijskih ozljeda mozga [8].

Kratkotrajna izloženost umjerenj hipoksiji je u nekim radovima pokazala optimizaciju funkcije transplantiranih stanica. Ove stanice mogu migrirati u oštećenu regiju kao odgovor na stimulaciju endogenim kemokinima. Umjerena hipoksija je pokazala povećanu sposobnost proliferacije i diferencijacije humanih NPC ali i MSC u neurone i oligodendrocite [9].

Naše istraživanje je otkrilo značajnu statističku razliku između grupa CTRL i HYP1h te CTRL i HYP3h. Analizom četiri glavna parametra: ukupna prijeđena udaljenost svih stanica, maksimalna dosegnuta brzina, maksimalna prijeđena udaljenost po jednoj stanici i udio naglih skretanja po stanici, statistički značajna razlika je nađena u ukupnoj udaljenosti koje pređu sve stanice u kulturi.

Iz histograma se vidi da su stanice koje su bile izložene hipoksiji 1h krenule na značajno duži put u odnosu na kontrolnu skupinu. Također je vidljivo da su stanice koje su bile izložene hipoksiji 3h postigle najveću maksimalnu brzinu u odnosu na prve dvije skupine stanica, no konačno su prevalile manji put jer su ranije počele odumirati.

Razlika je ujedno uočena i između grupa HYP1h i HYP3h, čime je potvrđena hipoteza da hipoksija utječe na ponašanje i migraciju stanica promatranih tijekom vremena. Upravo je naš nalaz povećane migracije nakon umjerene hipoksije pokazao da stanice dobivaju određena dodatna svojstva koja im vjerojatno služe kako bi lakše preživjele hipoksiju.

Matične stanice podrijetlom iz Thy1 YFP-16 miševa predstavljaju izvrstan alat za praćenje neurogeneze omogućujući morfološke analize novih neurona i njihovih projekcija, osobito nakon transplantacije u mozgu [6].

U našem istraživanju nismo našli razlike u izražaju fluorescencije nakon izloženosti hipoksiji, što potvrđuje da se radi o vrlo korisnom modelu koji može biti korišten za istraživanja hipoksije.

Budući da je smanjenje morbiditeta i mortaliteta izazvanih hipoksijom i /ili ishemijom jedan od prioriteta u modernim biomedicinskim istraživanjima, ovo istraživanje je dalo svoj doprinos u razumjevanju zbivanja koji se događaju tijekom manjka kisika. Temeljem ovog i brojnih drugih istraživanja, budućnost farmakološke terapije će biti u ciljanju specifičnih molekularnih mehanizama u svrhu neuroprotekcije i poboljšanja kvalitete života pacijenata [10].

6. ZAKLJUČAK

1. Kombinacija EVOS mikroskopijskog sustava i programa CellTracker omogućuje praćenje živih stanica i mjerenje brojnih parametara njihovog izgleda i ponašanja.
2. Živčane matične stanice izložene hipoksiji pokazuju sklonost izraženijoj migraciji u odnosu na stanice uzgajane u normoksičnim uvjetima. Razlika je najveća kada su stanice izložene hipoksiji u trajanju od 1 sata, pa poslije vraćene u normalne uvjete.
3. Živčane matične stanice dobivene iz mišjeg soja Thy1-YFP ne mijenjaju svoju flouescenciju u hipoksičnim uvjetima, što ih potvrđuje kao korisne u istraživanju nastanka i diferencijacije neurona u uvjetima smanjene koncentracije kisika.

7. ZAHVALA

Zahvaljujem se svom mentoru izv.prof.dr.sc. Dinku Mitrečiću na strpljenju i podršci koju mi je pružio tijekom pisanja diplomskog rada, a bez čije pomoći nebi bilo moguće ostvariti ovaj rad.

Zahvaljujem se također i laboranticama: dipl.ing.med.lab.dg. Željki Punčec te dipl.ing. molekularne biologije Ivi Salamon na strpljivosti i ljubaznosti te ukazanoj pomoći.

Na kraju se želim zahvaliti i svojoj obitelji na pruženoj potpori tijekom svih ovih godina studiranja.

8. LITERATURA

- [1] <https://stemcells.nih.gov/info/basics/1.htm>
- [2] <http://www.isscr.org/visitor-types/public/stem-cell-facts>
- [3] S. Bartfeld, H. Clevers: Stem cell-derived organoids and their application for medical research and patient treatment, *J Mol Med* (2017); doi:10.1007/s00109-017-1531-7.
- [4] S. E. Khoshnam, W. Winlow, M. Farzaneh et al: Pathogenic mechanisms following ischemic stroke, *Neurol Sci* (2017); doi: 10.1007/s10072-017-2938-1.
- [5] Xiu-ling Xu, Fei YI, Hui-ze PAN et al: Progress and prospects in stem cell therapy, *Acta Pharmacologica Sinica* (2013) 34: 741–746; doi: 10.1038/aps.2013.77.
- [6] I. Alić, N. Kosi, K. Kapuralin et al: Neural stem cells from mouse strain Thy1 YFP-16 are a valuable tool to monitor and evaluate neuronal differentiation and morphology, *Neuroscience Letters* (2016) 634: 32–41.
- [7] <https://beta-static.fishersci.com/.../evos-digital-inverted-microscope-brochure.pdf>
- [8] Marcel M. Daadi, Alexis S. Davis, Ahmet Arac et al: Human Neural Stem Cell Grafts Modify Microglial response and Enhance Axonal Sprouting in Neonatal hypoxic–Ischemic Brain Injury, *Stroke* (2010) 41: 516-523.
- [9] L. Chicha, T. Smith, R. Guzman: Stem cells for brain repair in neonatal hypoxia–ischemia, *Childs Nerv Syst* (2014) 30: 37–46.
- [10] Lancelot J. Millar, Lei Shi, Anna Hoerder-Suabedissen: Neonatal Hypoxia Ischaemia: Mechanisms, Models, and Therapeutic Challenges (2017) 11:78.

9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 11.02.1989.godine u Karlovcu, gdje sam i pohađala karlovačku Gimnaziju. Godine 2007. upisala sam Medicinski fakultet u Zagrebu. Za vrijeme studiranja sudjelovala sam u nekoliko studentskih akcija u sklopu organizacije CROMSIC te sam bila član Psihijatrijske sekcije.

Na trećoj godini studija sam se udala, a između treće i pete godine postala sam majka dviju djevojčica. Trenutno završavam 6.godinu studija Medicine i zanimaju me razna područja: biologija, genetika, neuroznanost, ali i radiologija, mikrobiologija te patologija.