Oslikavanje živih živčanih matičnih stanica fluorescencijom

Vujin, Željka

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:015316

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Željka Vujin

Oslikavanje živih živčanih matičnih stanica fluorescencijom

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof .dr. sc. Dinka Mitrečića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2016./2017.

POPIS KRATICA

PKH26 – Paul Karl Horan boja br. 26 (Sigma-Aldrich)

Thy1 – površinski antigen timusa (eng. *thymus cell antigen*)

Thy1-YFP – konstrukt površinskog antigena Thy1 koji emitira žutu svjetlost

YFP – fluorescentni protein koji emitira žutu svjetlost (eng. *yellow fluorescence protein*)

MS – matične stanice

EMS – embrionalne matične stanice

IVF – umjetna oplodnja (eng. *in vitro fertilization*)

IPMS – inducirane pluripotentne matične stanice

ciNPC – kemijski inducirane živčane progenitorne stanice (eng. *chemically induced neural progenitor cells*)

NPC – živčane progenitorne stanice (eng. *neural progenitor cells*)

ŽMS – živčane matične stanice

SVZ – subventrikularna zona

EGF – epidermalni čimbenik rasta (eng. *epidermal growth factor*)

FGF2 – čimbenik rasta fibroblasta (eng. *fibroblast growth factor*)

SOX2 – transkripcijski faktor *Sox* obitelji

GLAST – membranski transporter (eng. *glutamate aspartate transporter*)

BLPB – membranski protein (eng. *brain lipid binding protein*)

GFAP – intermedijarni filament (engl. *glial fibrillary acidic protein*)

RC2 – marker radijalne glije (eng. *radial glial cell marker-2*)

PDGF – trombocitni čimbenik rasta (eng. *platelet-derived growth factor*)

NT3 – faktor rasta živčanih stanica (eng. *neurotrophin-3*)

NT4 – faktor rasta živčanih stanica (eng. *neurotrophin-4*)

RA – retinoična kiselina (eng. *retinoic acid*)

MMP – matriksne metaloproteinaze (eng. *matrix metalloproteinase*)

ECM – ekstracelularni matriks (eng. *extracellular matrix*)

SMA – spinalna mišićna atrofija

ALS – amiotrofična lateralna skleroza

GVHD – reakcija presatka protiv primaoca (eng. *graft-versus-host disease*)

PET-CT – pozitronska emisijska tomografija uz kompjuteriziranu tomografiju

LeX – marker pluripotentnih stanica u glodavaca (eng. *Lewis X*)

CD133 – transmembranski glikoprotein (eng. *cluster of differentiation-133*)

C1qR1 – receptor komponente komplementa

CD271 – receptor za faktore rasta živčanih stanica

O4 – oligodendrocitni marker

TuJ1 – element mikrotubula u neuronima

MAP-2 – proteini povezani s mikrotubulima (eng. *microtubule-associated protein*)

NeuN – protein jezgre (eng. *neuronal nuclear antigen*)

HBSS – stanični pufer (eng. *Hanks' Balanced Salt Solution*, Gibco by life Technologies)

B27 – suplement za rast živčanih stanica (Gibco by life Technologies)

N2 – suplement za razvoj neuroblasta (Gibco by life Technologies)

DMEMF/F-12 – medij za uzgoj stanica (eng. *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*, Gibco by life Technologies)

PenStrep – pripravak penicilina i streptomicina

PBS – puferska otopina (eng. *phosphate-buffered saline*)

PFA - paraformaldehid

SADRŽAJ

SADRŽAJ IV

SAŽETAK VI

SUMMARY VII

1. UVOD 1

1.1. MATIČNE STANICE 1

1.2. PODJELA MATIČNIH STANICA 1

1.2.1. EMBRIONALNE MATIČNE STANICE 1

1.2.2. TKIVNO-SPECIFIČNE MATIČNE STANICE 2

1.2.3. INDUCIRANE PLURIPOTENTNE MATIČNE STANICE 2

1.3. ŽIVČANE MATIČNE STANICE 3

1.4. PRIMJENE U ISTRAŽIVANJU 4

1.5. PRIMJENE U LIJEČENJU 7

1.6. OZNAČAVANJE ŽIVČANIH MATIČNIH STANICA 9

2. HIPOTEZA 10

3. CILJ RADA 10

4. MATERIJALI I METODE 11

4.1. POKUSNE ŽIVOTINJE 11

4.2. IZOLACIJA I UZGOJ ŽIVČANIH MATIČNIH STANICA 11

4.3. PRIPREMA STANICA ZA POKUS *IN VITRO* 12

4.3.1 DISOCIJACIJA STANICA 12

4.3.2 OZNAČAVANJE STANICA PKH BOJOM 13

4.3.3 DIFERENCIJACIJA STANICA 13

4.3.4 FIKSACIJA DIFERENCIRANIH STANICA 14

5. REZULTATI 15

5.1. SAZRIJEVANJE NEURONA SE MOŽE PRATITI ANALIZOM SIGNALA Thy1-YFP 15

5.2. KOMBINACIJOM SIGNALA Thy1 I PKH26 MOGUĆE JE PREPOZNATI I ANALIZIRATI IZGLED NEURONA U MJEŠOVITOJ STANIČNOJ KULTURI 16

6. RASPRAVA.....19
7. ZAKLJUČCI.....21
8. ZAHVALE.....22
POPIS LITERATURE.....23
ŽIVOTOPIS.....30

SAŽETAK

Oslikavanje živih živčanih matičnih stanica fluorescencijom

Željka Vujin

Istraživanja temeljena na matičnim stanicama doživljavaju veliki zamah početkom 21. stoljeća. Mogućnost primjene pluripotentnih matičnih stanica dobivenih iz pacijenta predstavlja jednu od glavnih pokretačkih poluga personalizirane medicine, medicine prilagođene pojedinačnom pacijentu. Medicinsko područje u kojem se očekuje velika primjena matičnih stanica jesu bolesti živčanog sustava. Budući da je za analizu učinaka matičnih stanica potrebno razviti pouzdane metode praćenja transplantata, označavanje matičnih stanica je jedna od kritičnih točaka u razvoju novih terapijskih pristupa.

Cilj ovog istraživanja bio je analizirati i usporediti dvije metode označavanja i oslikavanja stanica: metodu bojanja stanica pomoću egzogene boje PKH26 te fluorescentni signal dobiven genetskom preinakom stanica pomoću konstrukta Thy1-YFP. Krajnji cilj rada bio je istražiti mogu li se ove dvije metode kombinirati na istoj staničnoj kulturi. Kultura živčanih matičnih stanica dobivena je izolacijom iz moždanog tkiva mišjih zametaka soja Thy1-YFP, nakon čega su stanice označene egzogenom bojom PKH26. Stanice su praćene 14 dana. Tijekom tog perioda, boja PKH26 je dobro oslikavala cijelu staničnu populaciju, a signal YFP se pojavio samo u živčanim stanicama. Kako je diferencijacija neurona napredovala, tako je YFP signal jačao. Konstrukt Thy1-YFP je omogućio prepoznavanje svih dijelova neurona te vizualizaciju svih njihovih nastavaka. Rezultati ovog rada pokazuju kako je moguće kombinirati egzogenu boju i genetski konstrukt. Takva kombinacija staničnih označivača omogućuje prepoznavanje subpopulacije živčanih stanica u cijeloj staničnoj kulturi te doprinosi istraživanjima u području matičnih stanica.

KLJUČNE RIJEČI: Živčane matične stanice, stanična diferencijacija, Thy1-YFP, PKH26, fluorescencija.

SUMMARY

Visualization of live neural stem cells using fluorescence signal

Željka Vujin

Stem cell based research is rapidly developing since the beginning of the 21st century. The possibility of applying patient's own pluripotent stem cells is one of the main driving forces of the personalized medicine, medicine that is tailored to the individual patient. Medical field in which we expect benefits from stem cell applications is the field of neurological diseases. Since the analysis of possible effects of stem cell application requires reliable transplant tracing method, stem cell labeling is one of the crucial points in developing new therapeutic strategies.

The main objective of this study was to analyze and compare two cell labeling and visualizing methods: exogenous staining method with PKH26 dye, and fluorescent signal obtained by genetic modification using the Thy1-YFP construct. The final objective of this study was to determine whether these two methods can be combined in the same cell culture. Neural stem cells obtained from the brains of Thy1-YFP embryos were in addition stained by PKH26. Cells were monitored for 14 days. During that period it was possible to visualize the entire cell population with PKH26 dye, and the YFP signal was present only in neurons. The intensity of YFP signal was increased with the progression of neuronal differentiation. The construct Thy1-YFP enabled the recognition of all parts of neurons and visualization of their processes. The results of this study showed that it is possible to combine exogenous dies and genetic constructs. This combination of cell markers enables recognition of the neuron subpopulation in the entire cell culture, and contributes to the field of stem cell research.

KEYWORDS: Neural stem cells, cell differentiation, Thy1-YFP, PKH26, fluorescence.

1. UVOD

1.1. MATIČNE STANICE

Matične stanice (MS) su stanice koje se od ostalih stanica razlikuju u dvije značajne osobine: posjeduju sposobnost samoumnažanja i pluripotentne su, što znači da se mogu diferencirati u sve ostale tipove stanica u tijelu. Matične stanice su nespecijalizirane, ali procesom diferencijacije mogu postati visoko specijaliziranim stanicama. Pretpostavlja se da je svojstvo samoumnažanja i diferencijacije moguće putem tzv. asimetrične diobe (1) (2). Matična stanica u mitozi daje jednu stanicu sličnu samoj sebi i jednog intermedijarnog progenitora koji može krenuti u daljnju diferencijaciju. Osim endogenih signala koji stanicu upućuju u diobu ili diferencijaciju, za funkciju matičnih stanica je važno i mjesto gdje matične stanice obitavaju, tzv. stanična niša (1) (3). Budući da je poremećena regulacija endogenih i egzogenih signala matičnih stanica prisutna u starenju organizma, genetskim bolestima, razvoju degenerativnih bolesti i raka, matične stanice danas predstavljaju jednu od najvažnijih tema istraživanja u biomedicinskom području.

1.2. PODJELA MATIČNIH STANICA

1.2.1. EMBRIONALNE MATIČNE STANICE

Embrionalne matične stanice (EMS) su prvi puta izolirane iz embrioblasta blastociste miša 1981. godine (4) (5). Nakon toga su uspostavljene i kulture humanih embrionalnih stanica. To su pluripotentne stanice izolirane iz embrioblasta blastocista, no mogu se dobiti i iz primordijalnih germinativnih stanica (6). Danas se EMS izoliraju iz blastocista iz in vitro fertilizacije (IVF) koje su donirane za istraživanje s pristankom oba donora (7).

EMS karakterizira sposobnost diferencijacije u stanice sva tri zametna listića, što je potvrđeno u pokusima gdje su EMS transplantirane u imunosuprimirane miševe uzrokovale teratokarcinome (3). Stanice dobivene iz primordijalnih germinativnih

stanica su se pokazale kao mogući bolji izbor jer im nedostaje tumorigeni potencijal, a zadržale su sposobnost diferencijacije u sva tri zametna listića (8).

Iako su EMS poslužile za brojna istraživanja razvoja organizma i bolesti, danas se traže alternativni načini izolacije matičnih stanica zbog etičkih pitanja vezanih uz izolaciju EMS i zbog problema odbacivanja transplantata u slučaju presađivanja EMS.

1.2.2. TKIVNO-SPECIFIČNE MATIČNE STANICE

Tkivno-specifične matične stanice (adultne, somatske) su multipotentne stanice koje nalazimo u svakom tkivu te predstavljaju izvor regeneracije tkiva u kojem žive. One su djelomično specijalizirane stanice, što znači da se mogu diferencirati samo u stanice tkiva u kojem žive. Podrijetlo ovih stanica u svakom tkivu još uvijek nije otkriveno (3). Iako se ove stanice u živom organizmu mogu dijeliti jako dugo, in vitro izolirane adultne matične stanice se ne mogu kultivirati tako uspješno kao EMS (8). Izolacija somatskih MS je složena jer je broj takvih stanica u zrelom tkivu malen, izuzev hematopoetskog tkiva.

Osim navedenih stanica mnogo se istražuju i mezenhimalne MS, nazvane još i stromalnim stanicama. Ovaj tip stanica izoliran je još 1950-ih iz stanica koštane srži, kada se pokazalo da su sposobne diferencirati se u stanice masti, kosti i hrskavice (3) (7). Ipak još uvijek ne znamo jesu li ove stanice podvrsta matičnih stanica i koje vrste stanica iz njih mogu nastati. U *in vitro* pokusima se pokazalo da ove stanice imaju imunomodulatorna svojstva i da potiču proliferaciju i diferencijaciju MS (9) (10).

1.2.3. INDUCIRANE PLURIPOTENTNE MATIČNE STANICE

Godine 2006. objavljen je rad koji je opisao novu vrstu pluripotentnih stanica nastalih genetskim reprogramiranjem embrionalnih i adultnih fibroblasta miša (11). Autori rada su retroviralnom transdukcijom uspjeli iz fibroblasta razviti stanice koje su izražavale biljege specifične za matične stanice te su ih nazvali induciranim pluripotentnim matičnim stanicama (iPMS). Ove stanice, iako pluripotentne, nisu jednake embrionalnim matičnim stanicama već pokazuju malo drugačiju gensku

ekspresiju i obrazac metilacije DNA. Nedostatak ove metode je korištenje retrovirusnog vektora koji može dovesti do maligne alteracije transfektiranih stanica.

Danas postoje metode kojima se uspjelo inducirati direktnu konverziju diferenciranih stanica (mišji fibroblasti, humani urotel) u živčane progenitorne stanice korištenjem kemijskog koktela i hipoksije kojima su stanice bile izložene (ciNPC) (12). Iako su stanice u ovom istraživanju zadržale neke epigenetske značajke fibroblasta, nakon konverzije su pokazivale svojstvo multipotentnosti, samoumnažanja i proliferacije. Ova metoda je otvorila mogućnost kreiranja stanica koje će specifično odgovarati pacijentu (eng. *patient specific NPC*) bez izlaganja pacijenta rizicima retrovirusnog genetskog inženjeringa.

1.3. ŽIVČANE MATIČNE STANICE

Živčane matične stanice (ŽMS) su multipotentne, tkivno-specifične MS koje se diferencijacijom mogu razviti u neurone, astrocite i oligodendrocite.

Nakon završetka neurulacije, ŽMS se nalaze najbliže lumenu ventrikularnog sustava, dok post-mitotske stanice migriraju radijalno prema površini neuralne cijevi. ŽMS također podliježu asimetričnoj diobi, te tako u subventrikularnoj zoni uvijek preostane populacija MS, a intermedijarni progenitori radijalnom migracijom sazrijevaju i pomiču se prema površini mozga. Iako se u literaturi kao ŽMS označavaju svi razvojni oblici do zrelih neurona ili glija stanica, u razvoju mozga se neuroepitel rano zamjenjuje radijalnom glijom. Radijalna glija je prekursor neurona i glije, ali i svojom strukturom usmjeruje i „vodi“ nezrele stanice u migraciji prema površini mozga. Istraživanja su pokazala da i embrionalne i adultne ŽMS pokazuju karakteristike astrocita (13).

U odraslom mozgu je dokazano da se ŽMS mogu naći u dvije regije: u girusu dentatusu, nazubljenoj vijugi hipokampusa (14) te u subventrikularnoj zoni (SVZ) zida lateralne komore (15). U ove dvije regije ŽMS su većinom inaktivne, ali pokazano je da se mogu aktivirati ako su izložene nekom patološkom stimulusu, ali i trudnoći i fizičkoj aktivnosti (1). ŽMS se danas dobivaju diferencijacijom EMS izoliranih iz

preimplantacijskih embrija, te konverzijom somatskih stanica. Potonji mehanizam ima velike potencijale da postane dominantan način razvoja ŽMS jer se istraživanjima pokazalo da takve reprogramirane stanice pokazuju i akcijski potencijal i sposobnost unosa neurotransmitera, što je jedna od osobina neurona i glija stanica (16).

Kultura ŽMS se može uspostaviti na dva načina. Uzgojem u tekućem mediju s dodatkom EGF i FGF-2 te kao adherentna kultura. Uzgoj u tekućem mediju je češće korišten (korišten je i u ovom radu), a karakterizira ga prisutnost neurosfera, kuglastih nakupina ŽMS. Adherentni medij se razlikuje od tekućeg medija zbog manje gustoće stanica, a stanicama su dostupniji faktori rasta. Proučavanje diferencijacije stanica se najčešće provodi nakon adherencija stanica za staklenu ili plastičnu podlogu, što omogućuje nastanak raznih populacija i subpopulacija neurona i astrocita (17) (18).

Uočilo se da ŽMS nemaju jedan jedinstveni biljeg koji bi ih označavao. Tijekom ranog razvoja stanice neuroepitela su pozitivne na nestin i SOX2, radijalna glija eksprimira GLAST, BLPB i GFAP i RC2, dok u adultnoj SVZ ŽMS eksprimiraju GFAP, GLAST, BLBP, koneksin 20, vimentin i nestin (1).

1.4. PRIMJENE U ISTRAŽIVANJU

Kako bismo mogli terapijski primijeniti ŽMS važno je proučiti njihove fiziološke karakteristike, proučiti signalne puteve i molekule koje reguliraju proliferaciju, diferencijaciju i migraciju stanica. Razvoj iPMS pružio je priliku da se to istraži na reprogramiranim somatskim stanicama ljudi koji boluju neuroloških bolesti. Tako su neke od glavnih tema istraživanja ona u području neurogeneze, kortikalne organizacije stanica, ponašanja živčanih progenitora u životinjskim modelima neuroloških bolesti i primjena kultura stanica u istraživanju djelotvornosti lijeka. Genetskom modifikacijom ŽMS, imortalizacijom stanica virusnim vektorom uspostavile su se dugotrajne kulture ŽMS za proučavanje mehanizma samoumnažanja (19). Da bi se izbjeglo korištenje virusnih vektora, razvio se i protokol imortalizacije stanica aktiviranjem telomeraze (20). Dugotrajne kulture ŽMS

poslužile su za analizu loza koje potiču od ŽMS (21) te za otkrivanje da su PDGF, NT3, NT4 i RA promotori neuralne diferencijacije (18) (22).

U mozgu sisavaca živčani progenitori iz SVZ mogu migrirati cijelog života do olfaktornog bulbusa. Na temelju toga razvila su se daljnja istraživanja migracije neurona te istraživanja koja proučavaju je li migracija stanica moguća izvan tog fiziološkog puta. Radovima na miševima dokazano je da živčani progenitori iz SVZ mogu migrirati i prema ishemijskom području u ishemijskog moždanog udara (23). Postavilo se pitanje terapijskih mogućnosti u poticanju endogenih progenitora na migraciji u neurološkim bolestima. Jedna od mogućnosti je transplantacijom u pogođeno mjesto dostaviti dovoljan broj egzogenih MS koje bi uspješno migrirale i proliferirale. To se pokazalo uspješnim u više radova, koristeći humane živčane progenitore ili EMS u mozak štakora (24) (25).

Jedan od pristupa uključuje protokol u kojem se egzogene MS transplantiraju u mozak kako bi potaknule na migraciju endogene progenitore. U tom pristupu nije potrebno duže preživljavanje egzogenih MS, već je njihova uloga da potpomognu migraciju endogenih progenitora. Pokazalo se da egzogene MS mijenjaju ekspresiju MMP i ECM u izvanstaničnom prostoru, tako kreirajući neku vrstu „mosta“ (eng. *„biobridge“)* kojim bi endogeni progenitori onda migrirali iz neurogenog do ishemičnog mjesta (26) (27). Tajiri i sur. su u navedenom radu pokazali da je ishemično mjesto 3 mjeseca nakon transplantacije pokazivalo proliferaciju i diferencijaciju živčanih stanica. Sve je više radova koji pokazuju sposobnost NSC da migriraju prema mjestu ozljede, a što je još važnije, „spašavaju“ disfunkcionalne neurone na tom mjestu i usmjeravaju ih prema normalnom razvoju (28).

Jedan od vrijednih izvora ŽMS koje bi se koristile kao graftovi za poticanje migracije endogenih stanica su mezenhimalne stromalne stanice koje se vrlo lako mogu dobiti iz koštane srži pacijenta (29). Nije nužno da se ŽMS izravno transplantiraju u moždano tkivo, jer se na štakorskom modelu ALS-a ustanovilo da pri primjeni ŽMS putem krvi one prolaze krvno-moždanu barijeru, pronalaze mjesto neurodegeneracije i tamo se počnu diferencirati. U kontrolnoj skupini je izostala diferencijacija, što još jednom potvrđuje važnost niše u koju stanice dolaze i upalnih faktora koji ondje vladaju (30).

Proučavanjem neurona dobivenih od iPMS pacijenata s neurološkim bolestima uočili su se poremećaji povezani uz te bolesti (Shizofrenija, Huntington, Rettov sindrom, SMA; Parkinsonova bolest, ALS). Zahvaljujući kulturama takvih neurona, otkriveni su neki stanični mehanizmi kao i struktura samih stanica koje su zahvaćene bolešću (1) (31) (32) (33). Intenzivno istraživanje životinjskih modela ALS-a pokazalo je da glija djeluje toksično na motorne neurone (34) (35). Prema tome, pretpostavlja se da bi se u mogućim transplantacijama ŽMS kod obiteljskog tipa ALS trebalo transplantirati i motorne neurone i gliju. ALS je bila prva bolest koja se mogla proučavati koristeći motorne neurone derivirane od iPMS pacijentice s obiteljskim tipom bolesti (36). Osim toga, proučavanje bolesti u staničnoj kulturi (eng. *„disease in a culture dish“* (1)) bi se moglo koristiti i za testiranje lijekova na staničnim modelima neurodegenenerativnih bolesti.

Još jedna neurodegenerativna bolest gdje se uočio potencijalni učinak matičnih stanica je Parkinsonova bolest. Istraživanja su pokazala da se transplantacijom EMS u striatum modela Parkinsonove bolesti na glodavcima, transplantirane stanice diferenciraju u dopaminergičke neurone (37). U humanim modelima bolesti, moglo bi se koristiti mezenhimalne MS koje se *in vitro* mogu diferencirati u dopaminergičke neurone (38). Jedan od modaliteta liječenja multiple skleroze kao kronične upalne i imunološki posredovane bolesti je transplantacija koštane srži. Budući da koštana srž sadrži matične stanice, postavilo se pitanje da li bi transplantirani živčani progenitori imali jednak terapijski učinak. Životinjski modeli potvrdili su da živčani progenitori imaju jak protuupalni učinak kada se nalaze u upalnom području, te da potiču remijelinizaciju u području pogođenom demijelinizacijom (39). Iznimno bitno za morbiditet povezan za kralježničnu moždinu, na modelima glodavaca transplantacijom više vrsta živčanih progenitora (MS neuralnog grebena i prediferencirani neuroni iz EMS) na mjesto avulzije spinalnog korijena dolazi do diferencijacije stanica u gliju i motorne neurone i interneurone, što bi upućivalo na to da bi se kombinacijom živčanih progenitora mogao zamijeniti cijeli segment i sive i bijele tvari kralježnične moždine (40).

1.5. PRIMJENE U LIJEČENJU

Nakon uspješne primjene ŽMS na životinjskim modelima bolesti, sve je više kliničkih istraživanja u primjeni ŽMS na pacijentima koji boluju od neuroloških bolesti. Studije su većinom u fazi I istraživanja gdje se ispituje sigurnost terapijskih postupaka i neželjene reakcije na primjenu ŽMS. Ove studije su većinom nerandomizirane studije na malom broju ispitanika, tako da je vjerodostojnost samih rezultata u proučavanju terapijskih ishoda primjene ŽMS upitna.

Budući da je ishemični moždani udar vodeći uzrok invaliditeta kod odraslih, intenzivno se traže nove terapijske opcije uz postojeću ranu trombolizu i trombektomiju. Studija iz 2014. godine na 6 bolesnika koja je koristila ŽMS iz subependimalne zone fetalnog mozga i mezenhimalne MS izolirane iz pupkovine predlaže da bi se kod terapije ishemičnog moždanog udara trebalo nadomjestiti nezrele prekursore koji bi se diferencirali i u neurone i gliju, budući da su obe populacije pogođene ishemijom. Bolesnici su praćeni 2 godine, te su rezultati pokazali da nakon transplantacije nije došlo do težih neželjenih reakcija, razvoja tumora nakon primjene ili opadanja neuroloških funkcija. Izmjereno je poboljšanje neuroloških funkcija i opisano poboljšanje kvalitete života (41).

Budući da je u literaturi opisan slučaj razvoja tumora 4 godine nakon transplantacije fetalnih ŽMS u pacijenta s ataxiom teleangiectasiom (42), predlaže se korištenje mezenhimalnih MS. Studija koja je koristila autologne mezenhimalne MS iz koštane srži pacijenata s ishemičnim moždanim udarom pratila je 12 pacijenata jednu godinu nakon intravenske primjene mezenhimalnih MS, te se također nisu primjetili teški neželjeni učinci, razvoj tumora, infekcija ili neurološka deterioracija. Međutim, kao ni prijašnja studija, nije postojala kontrolna skupina, tako da su daljnji zaključci o dugoročnom učinku terapije upitni (43).

Cilj studije objavljene 2015. godine u kojoj su 21 oboljelom od Parkinsonove bolesti u strijatum transplantirane ŽMS razvijene iz EMS fetusa bio je dokazati izostanak razvoja tumora, neželjenih imunoloških reakcija, GVHD-a i neželjenih reakcija na mjestu primjene. Neželjene reakcije su izostale, a uz to je primijećeno poboljšanje simptoma bolesti, te je u 6 bolesnika to potvrđeno PET-CT snimanjem (44).

Godine 2014. objavljeni su rezultati studije kojoj je cilj bio proučiti sigurnost transplantacije humanih ŽMS u lumbalne i cervikalne segmente kralježnične moždine u oboljelih od ALS-a. Transplantacija, unilateralna i bilateralna, izvršena je na 12 pacijenta, od kojih je 6 pacijenata primilo transplantaciju u cervikalne segmente. Rezultati praćenja nakon 15 mjeseci su pokazali sigurnost postupka i izostanak neželjenih reakcija, a na 4 oboljela kod kojih je od otkrivanja bolesti do transplantacije prošlo malo vremena i kod kojih nije bilo bulbarnih simptoma, je zamijećena vrlo spora progresija bolesti. Generalno, rana transplantacija je pokazana kao važna za usporavanje progresije bolesti ili čak poboljšanje simptoma (45). Još jedno istraživanje na 6 bolesnika koje je potvrdilo sigurnost transplantacije ŽMS u prednji rog kralježnične moždine je koristilo ŽMS iz fetusa koji su umrli *in utero*, što rješava dio etičkih pitanja vezanih za humane EMS (46).

Istraživanje faze I objavljeno 2013. godine proučavalo je sigurnost transplantacije ŽMS razvijenih iz autolognih mezenhimalnih MS u subarahnoidalni prostor kralježnične moždine kao mogućnost liječenja cerebralne paralize u djece. Istraživanje je provedeno na 60 ispitanika, pri čemu je 30 ispitanika primilo transplantat i neurološku rehabilitaciju, dok je 30 ispitanika kontrolne skupine primilo samo neurološku rehabilitaciju. Ova studija nije bila randomizirana ali je bio prisutan neutralni promatrač (eng. *observer-blinded study*). Uz potvrdu sigurnosti postupka, skupina istraživača je primijetila poboljšanje grube motoričke snage u skupini ispitanika tijekom perioda praćenja od 6 mjeseci, dok je kod kontrole skupine taj učinak izostao, zbog čega autori predlažu ovaj modalitet liječenja motornog deficita u cerebralnoj paralizi (47).

Studija objavljena 2015 proučavala je sigurnost transplantacije fetalnih ŽMS na mjesto traumatske lezije cervikalnog segmenta kralježnične moždine. Istraživanje je provedeno na 19 bolesnika, s kontrolnom skupinom od 15 ispitanika koji su se pratili godinu dana. Rezultati su pokazali da je transplantacija direktno u mjesto lezije siguran postupak, bez neželjenih reakcija u vidu spasticiteta, kronične boli, razvoja tumora i dodatnog oštećenja moždine i te je u 5 transplantiranih pacijenata primijećeno diskretno poboljšanje motoričke i/ili senzorne funkcije (48).

1.6. OZNAČAVANJE ŽIVČANIH MATIČNIH STANICA

Za uspješnu vizualizaciju stanica u kulturi se koriste različite metode temeljene na bojama koje boje jezgru, membrane ili specifične organele. Također se može koristiti metoda imunofluorescencije. Signali se zatim proučavaju na fluorescentnom mikroskopu. Specifične biomolekule, tzv. stanični biljezi u živčanom sustavu razlikuju se od stanica do stanica. Iako su sve stanice živčanog sustava porijekla ŽMS, neki biljezi ŽMS se gube diferencijacijom, dok se drugi biljezi specifični za diferencirane stanice pojavljuju naknadno. Najčešće korišteni biljezi nezrelih živčanih stanica su nestin, SOX2, LeX i CD133/Prominin1. Novija istraživanja pokazuju još nekoliko biljega ŽMS – C1qR1, GFAPδ i CD271 (49) (50). Zanimljivost u biljegu CD271 je ta što su autori primijetili ekspresiju u adultnim humanim živčanim progenitorima SVZ, no isti marker nije bio prisutan na fetalnim živčanim stanicama. Od glija stanica u SŽS-u, biljeg GFAP je specifičan za astrocite, a O4 za oligodendrocite. Zrele neurone obilježavaju biljezi β3-tubulin(TuJ1), MAP-2 i NeuN.

Metoda imunofluorescencije vrši se na fiksiranim, dakle mrtvim stanicama, što je jedan od nedostataka metode, uz činjenicu da fluorescentni signal blijedi s vremenom. Zato su razvijene nove metode oslikavanja ŽMS, koje koriste stanice transgeničnih miševa, u čijim se neuronima fluorescentni protein koji emitira žutu svjetlost (YPF) stavio pod kontrolu promotora Thy1. To je protein prisutan na površini neurona, pa zbog toga možemo vizualizirati cijelu stanicu (51). Rezultati istraživanja su pokazali da je signal Thy1 bio prisutan već u ŽMS i zadržao se u svim stadijima diferencijacije neurona. Autori su potvrdili da diferencijacijom ŽMS u kulturi progresivno pada broj nestin pozitivnih stanica, dok su bili pozitivni signali na β3-tubulin, MAP-2 i SOX2. Zbog svega navedenog, korištenje ŽMS mišjeg soja Thy1-YFP se izdvaja kao idealna metoda proučavanja diferencijacije neurona.

2. HIPOTEZA

Rast i diferencijacija živčanih matičnih stanica se može pratiti kombinirajući endogeni fluorescentni signal Thy1-YFP i egzogeno označavanje pomoću boje PKH26.

3. CILJ RADA

Osnovni cilj rada bio je opisati sazrijevanje neurona pomoću matičnih stanica dobivenih iz Thy1-YFP mišje linije. Ta linija omogućuje vizualizaciju endogenog signala koji se javlja tijekom diferencijacije neurona.

Specifični ciljevi rada su bili istražiti može li se kombinirati endogeni signal Thy1-YFP sa egzogenom bojom PKH26 te hoće li signal jedne boje utjecati na signal druge boje.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. POKUSNE ŽIVOTINJE

Za potrebe ovog diplomskog rada su upotrijebljeni mišji zameci gravidne ženke visokosrođenog soja transgeničnih miševa Thy1-YFP. Ovom soju miševa je genskim inženjeringom fluorescentni protein koji emitira žutu svjetlost (YFP) stavljen pod kontrolu promotora površinskog glikoproteina Thy1 koji je eksprimiran na neuronima. Ženka je uzgojena na Odsjeku za laboratorijske životinje Hrvatskog instituta za istraživanje mozga, Sveučilišta u Zagrebu.

Kako bi dobili zametke, ženka je stavljena u kavez s mužjakom. Svaki dan joj je pregledavana rodnica da bi se utvrdila prisutnost sjemene tekućine u obliku vaginalnog čepa, što odgovara početku graviditeta. Budući da se životinje pare noću, nalaz vaginalnog čepa ujutro označava zametak starosti od 0.5 dana. Nakon nalaženja vaginalnog čepa ženka je premještena u svoj kavez. 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 fakulteta (urudžbeni broj dozvole: 380-59-10106-17-100/27).

4.2. IZOLACIJA I UZGOJ ŽIVČANIH MATIČNIH STANICA

Ženka je žrtvovana postupkom cervikalne dislokacije. Cervikalna dislokacija u životinje izaziva trenutnu smrt i minimalnu bol. Životinja se fiksira u kaudalnom području glave, te istovremenim povlačenjem repa dolazi do prekidanja kralježnične moždine u području spoja vrata s glavom i trenutne smrti. Nakon žrtvovanja, životinja je okrenuta na leđa i očišćena 70% alkoholom. Zatim su izolirani rogovi maternice i premješteni u sterilnu petrijevu posudu s HBSS puferom (Gibco by life Technologies).

Zametci iz kojih su se izolirale matične stanice bili su stari 14 dana, jer se utvrdilo da se najviše matičnih živčanih stanica nalazi u telencefalonu zametaka starih upravo 14 dana. Od zametaka su se odvojile ovojnice, nakon toga se učinila dekapitacija embrija, te su se izolirali telencefaloni. Nakon izolacije, mehanički su usitnjeni

škaricama i 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) da bi se moždano tkivo proteolitički razgradilo i dobila suspenzija stanica. Tkivo je bilo pod djelovanjem akutaze 20 minuta u kupelji na 37°C, nakon toga se dodatno mehanički 20-30 puta usitnilo tipsom. Nakon isteka 20 minuta, stanična suspenzija se prebacila u novu tubu i dodano je 5 mL medija (Eagle DMEMF) te se tuba stavila na centrifugu 6 minuta na brzinu od 300 g. Višak tekućine se odstranio, a na talog stanica je dodano 2 mL medija kako bi se stanice međusobno razdvojile i oslobodile se viška tkiva. Tijekom centrifugiranja, pripremljen je poseban medij za uzgoj stanica. U flasku od 75 cm^2 je stavljeno 32 mL medija (DMEM/F-12 + GlutaMAX^{TM}, Gibco by life Technologies) u koji je dodano 640 µL B-27 (Gibco by life Technologies), 320 µL N-2 (Gibco by life Technologies), 320 µL Pen Strep (Gibco by life Technologies), 64 µL FGFb (Invitrogen) i 64 µL EGF (Invitrogen). Stanice u flaskama uzgajane su u inkubatoru na 37º C i 5% CO_2.

4.3. PRIPREMA STANICA ZA POKUS *IN VITRO*

4.3.1 DISOCIJACIJA STANICA

Opisanim načinom uzgoja staničnim diobama i reagregacijom nastaju neurosfere. Zbog brzog rasta je potrebno stanice svaka tri dana razdvojiti u nove posude i zamijeniti medij, pri čemu se zadržava oko 30% starog medija zbog prisutnosti faktora koje su izlučile same stanice. U pokusu su korištene stanice iz četvrtog razdvajanja.

Uzgojene neurosfere su zajedno s medijem premještene u sterilne tube od 50 mL i centrifugirane kroz 6 minuta na 300 g i 21°C. Nakon centrifugiranja pola medija se uklonilo, a pola stavilo u flaske s novim medijem. Na stanice je dodano 2 mL akutaze pod čijim djelovanjem ih se ostavilo 10 minuta uz blago treskanje i zagrijavanje rukom. Nakon isteka vremena, kako bi se razbilo veće sfere, dodatno se suspenzija promiješala mikropipetom. Zatim je dodano 5 mL medija da bi se neutraliziralo djelovanje akutaze i suspenzija je stavljena na centrifugu 6 minuta na 300g i 21°C.

Nakon centrifugiranja, tekući sadržaj je bačen a stanice su premještene u čiste flaske s pripremljenim medijem.

4.3.2 OZNAČAVANJE STANICA PKH BOJOM

Za označavanje jednog dijela ŽMS koristila se fluorescentna boja PKH26 (PKH26 *Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling*, Sigma-Aldrich) s maksimumom emisije na 567 nm.

Sadržaj jedne flaske s kulturom ŽMS se centrifugirao kroz pet minuta na 400 g i 21°C, zatim se odlio višak tekućine, a stanice su se resuspendirale u 1 mL otapala. U posebnoj tubi pripremila se boja dodavanjem 4 µL boje (PKH26) i 1 mL otapala. Suspenzija stanica se zatim dodala u pripremljenu boju, resuspendirala mikropipetom i inkubirala s bojom tijekom 5 min na sobnoj temperaturi. Zatim se dodalo 2 mL HBSS-a da bi se neutraliziralo djelovanje boje, te se suspenzija centrifugirala tijekom 10 minuta na 400g i 21°C. Nakon isteka tog vremena, stanice su se tri puta isprale u 10 mL medija da bi se odstranio višak boje, te su se stavile u flaske s novim medijem. U ovako dobivenoj smjesi nalazile su se obojane stanice u koncentraciji 1 x 10^7/mL.

4.3.3 DIFERENCIJACIJA STANICA

Za diferencijaciju stanica koriste se stakalca promjera 12 mm (eng. *cover slips*) koja se prethodno moraju pripremiti. Prvo ih se ostavlja preko noći u nitratnoj kiselini. Sutradan ih se ispire sterilnom vodom i ostavlja preko noći u 70% alkoholu. Sljedeći dan se uklanja alkohol i stakalca se steriliziraju na 240°C 12 sati. Sterilizirana stakalca su zatim stavljena u ploče za diferencijaciju (eng. *24-well plate*). Nakon toga u svaki bunarić se dodaje 400 µL Poly-D-lizina (Sigma-Aldrich) u koncentraciji 10µg/mL koji zatim stoji 24 sata. Sutradan se uklanja Poly-D-lizin, stakalca se ispiru dva puta sterilnom vodom te se zatim dodaje 400µL laminina (Sigma-Aldrich) koji je zatim stajao 48 sati. Laminin se ispire dva puta s PBS-om, zatim se u bunarić dodaje 250 µL medija za diferencijaciju bez faktora rasta (FGFb i EGF).

Nakon disocijacije, stanice su ostavljene u flaskama 5-6 sati do formiranja malih sfera, nakon čega su centrifugirane i nasađene na stakalca u koncentraciji 150-200 000 stanica po staklu. Na ovaj način stanice su diferencirane u vremenskim točkama 1, 2 ,3, 5, 9 i 12 dana. Svako 24 sata stanicama se mijenjao medij.

4.3.4 FIKSACIJA DIFERENCIRANIH STANICA

Nakon određenih vremenskih točaka, stanice su stavljene u nove bunariće s 4% PFA u trajanju od 15 minuta. Nakon fiksacije, PFA se uklanja, a stakalca se ispiru 4 puta PBS-om i ostavljaju u hladnjaku na 4°C.

5. REZULTATI

5.1. SAZRIJEVANJE NEURONA SE MOŽE PRATITI ANALIZOM SIGNALA Thy1-YFP

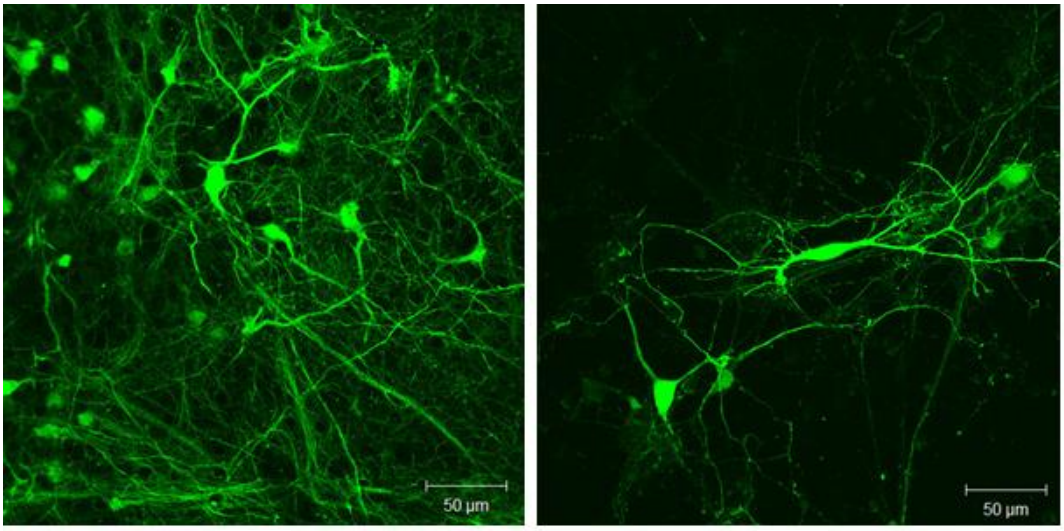
Kultura ŽMS se pratila kroz 14 dana. Nakon nasađivanja stanica i poticanja njihove diferencijacije, praćen je nastanak fluorescentnog signala i razvoj nastavaka tipičnih za neurone. Morfologija neurona je praćena pomoću mikroskopa EVOS FL Auto.

U prva tri dana se javljaju prvi nastavci i stanice počinju ličiti na neurone. Iako slab signal Thy1 postoji od samog početka diferencijacije, jak intenzitet se može uočiti tek kad stanice počinju pružati nastavke.

Od četvrtog do šestog dana diferencijacije stanice poprimaju oblik neurona i mogu se jasno razlikovati od astrocita. Signal postaje vrlo jasan i vidljiv je u svim nastavcima.

Od osmog do dvadesetog dana se može pratiti sazrijevanje neurona praćeno jasnim i stabilnim flourescentnim signalom (Slika 1).

Ovom grupom pokusa je pokazano da se endogenom bojom Thy1-YFP može pratiti diferencijacija i sazrijevanje neurona u *in vitro* kulturi.

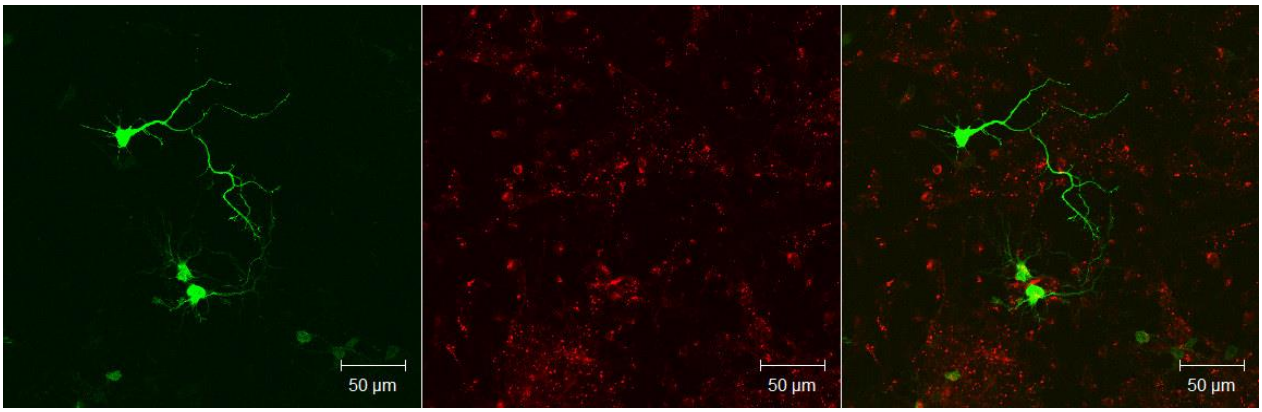


A B

Slika 1. *Analiza signala Thy1 na kulturi ŽMS. A) Stanice 9. dan diferencijacije. B) Stanice 12. dan diferencijacije.Jasno su vidljivi tijelo i nastavci neurona.*

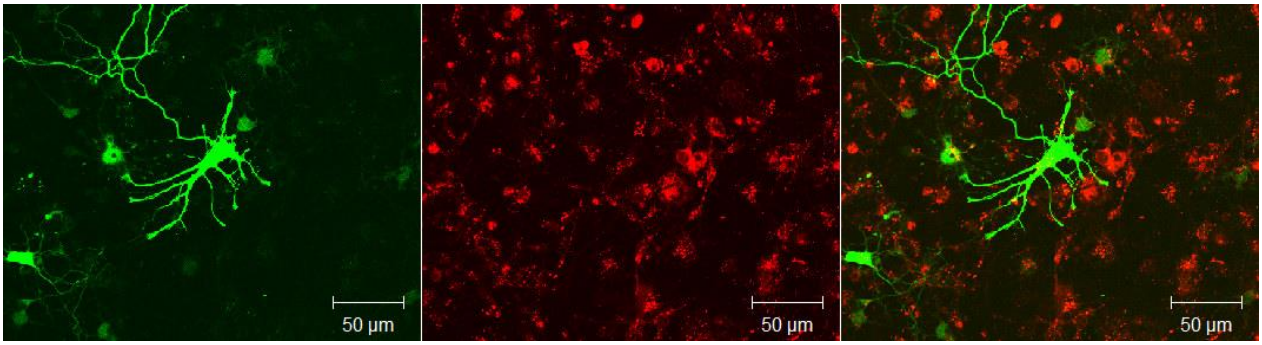
5.2. KOMBINACIJOM SIGNALA Thy1 I PKH26 MOGUĆE JE PREPOZNATI I ANALIZIRATI IZGLED NEURONA U MJEŠOVITOJ STANIČNOJ KULTURI

Kako bismo istražili mogu li se sve stanice označiti egzogenom bojom PKH26, pratiti tijekom diferencijacije, a onda prepoznati koje od njih postaju neuroni pomoću konstrukta Thy1, analizirala se kultura ŽMS prvi (Slika 2), drugi (Slika 3), treći (Slika 4), peti (Slika 5), deveti (Slika 6) i dvanaesti dan (Slika 7) diferencijacije. Kombinacijom signala PKH26 i Thy1 uočava se da od ukupnog broja stanica vidljivih signalom PKH26, jedan dio daje neurone.



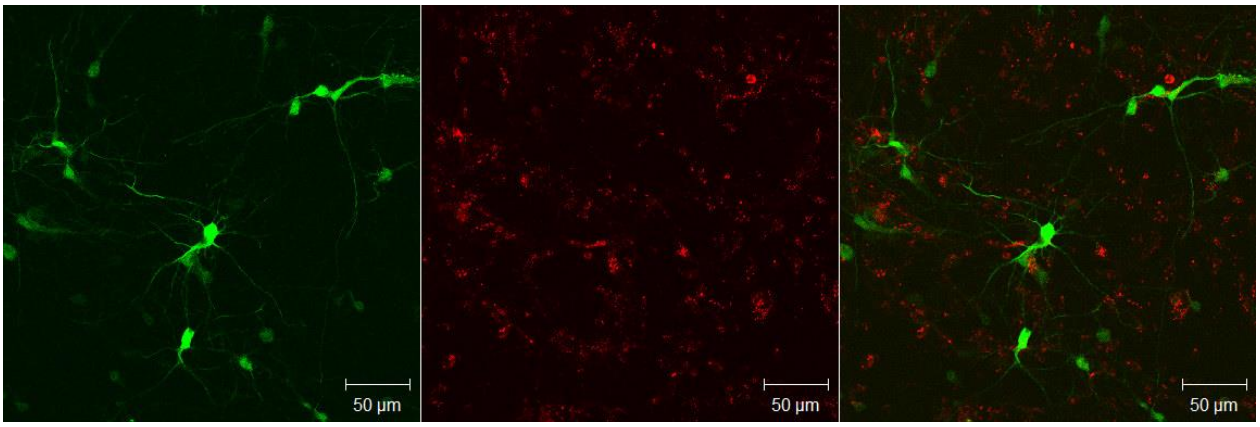
A B C

Slika 2. *Kultura ŽMS prvi dan diferencijacije. A) Zelena boja odgovara fluorescentnom signalu Thy1. Vidi se nekoliko poligonalnih stanica s ograncima. B) Crvena boja odgovara signalu PKH26. Pomoću boje PKH26 možemo vidjeti koliki je ukupni broj stanica u kulturi. C) Zajednički prikaz Thy1 i PKH26 signala.*



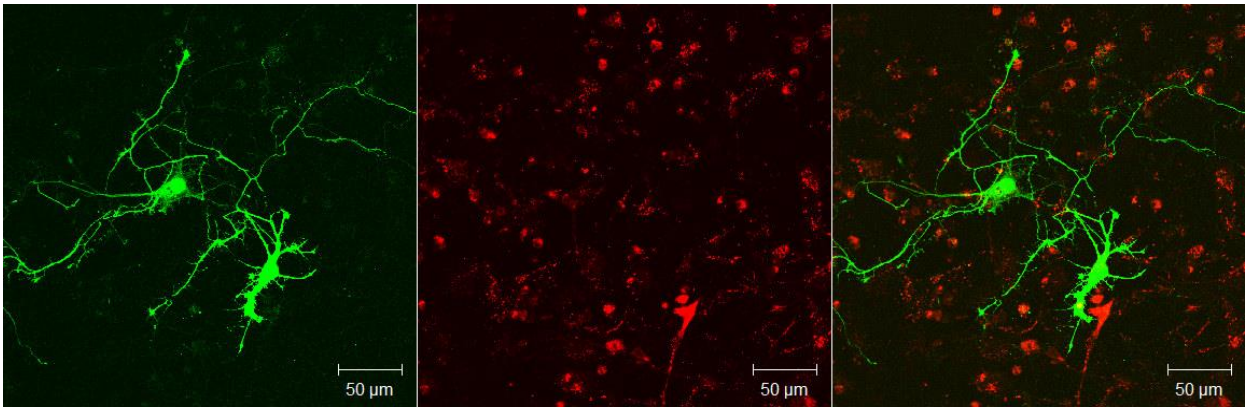
A B C

Slika 3. *Kultura ŽMS drugi dan diferencijacije. A) Zelena boja odgovara signalu Thy1. B) Crvena boja odgovara signalu PKH26. Jasnije se vide okrugle ŽMS. C) Zajednički prikaz Thy1 i PKH26 signala.*



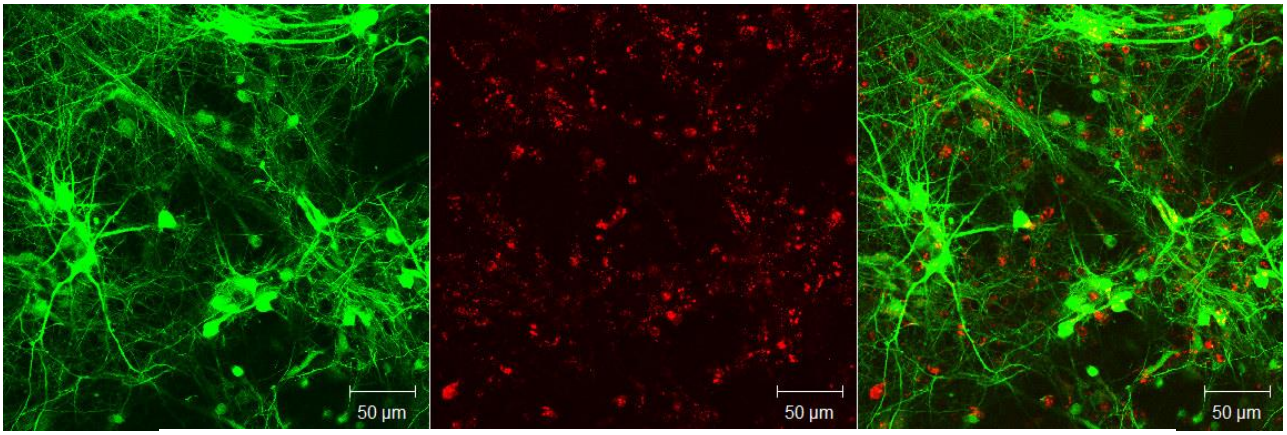
A B C

Slika 4. *Kultura ŽMS treći dan diferencijacije. A) Zeleni signal Thy1 prikazuje nekoliko nježno razgranatih neurona. B) Stanice obilježene bojom PKH26. C) Zajednički prikaz Thy1 i PKH26 signala.*



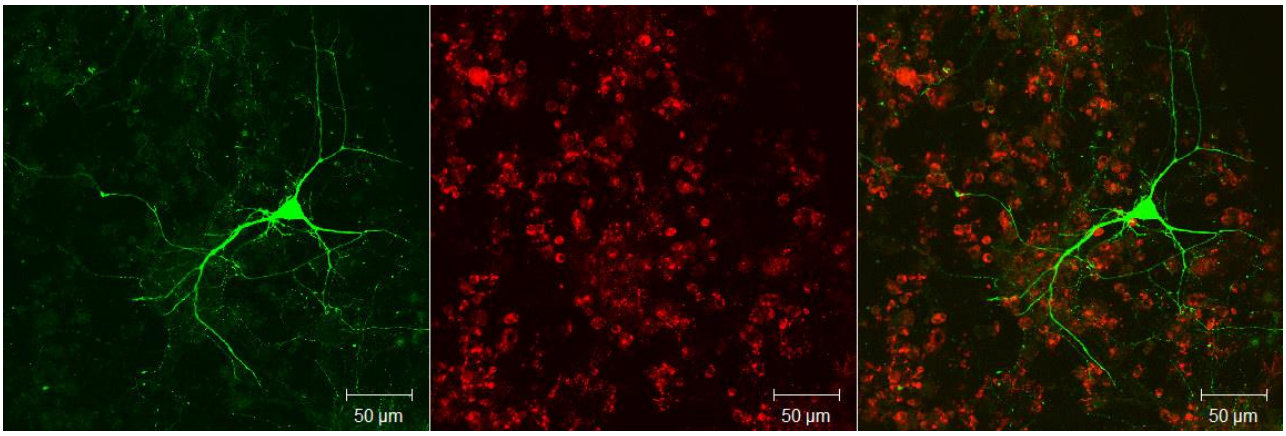
A B C

Slika 5. *Kultura ŽMS peti dan diferencijacije. A) Zeleni Thy1 signal prikazuje nekoliko već izrazito razgranatih neurona. B) Crveni signal PKH26 ostalih stanica. C) Zajednički prikaz Thy1 i PKH26 signala.*



A B C

Slika 6. *Kultura ŽMS deveti dan diferencijacije. A) Zeleni signal Thy1 prikazuje izrazito razgranatu mrežu dendrita i aksona, što odgovara progresiji sazrijevanja neurona. B) Crveni signal PKH26. C) Zajednički prikaz Thy1 i PKH26 signala.*



A B C

Slika 7. *Kultura ŽMS dvanaesti dan diferencijacije. A) Zelena boja odgovara signalu Thy1. Uočava se da se Thy1 signalom može analizirati morfologija cijele živčane stanice. Vidljiva je poligonalna stanica, što odgovara obliku neurona, s jasno razgranatim izdancima citoplazme – što odgovara dendritima i/ili aksonu. B) Crveni signal PKH26 prikazuje okrugle i nediferencirane ŽMS. C) Zajednički prikaz Thy1 i PKH26 signala.*

6. RASPRAVA

Rezultati ovog rada pokazuju da se korištenjem endogenog signala Thy1-YFP može pratiti diferencijacija živčanih matičnih stanica u neurone. Kombiniranjem endogenog signala i egzogeno primijenjene boje PKH26 može se analizirati broj neurona u odnosu na ukupnu populaciju stanica.

Fluorescentna boja PKH26 je boja vezana za alifatski lanac koji se ugrađuje u lipidni dvosloj membrane. Kratko vrijeme inkubacije i ugrađivanje unutar membrane omogućuje vizualizaciju stanice, ali bez ometanja površinskih proteina i funkcije stanice koju oni posreduju. Opisuje ju dugotrajna stabilnost (*in vivo* poluvrijeme od 100 dana), intenzivnost fluorescencije i mogućnost analize proliferacije odmah nakon bojenja. Nakon pobuđivanja svijetlom valne duljine 551 nm emitira svijetlo valne duljine 567 nm (52). Ovaj rad je potvrdio da se proliferacija može analizirati već prvi dan nakon bojenja, te je do kraja zadanog perioda praćenja stanica signal bio jasan. Ipak, nedostatak PKH26 boje je što, kao i sve egzogeno primijenjene boje za označavanje stanica, blijedi tijekom vremena. U *in vitro* uvjetima slabljenje signala se može uočiti nakon 4 tjedna (51).

Suprotno tome, endogeni signal Thy1 se pokazao izuzetno stabilnim tijekom vremena, jer intenzitet signala ovisi o ekspresiji Thy1 površinskog glikoproteina na stanicama, te ne ovisi o tome koliko je mitoza prošlo od inicijalnog bojenja stanica. U ovom radu uočen je signal Thy1-YFP pozitivnih stanica već prvi dan diferencijacije, što upućuje na to da ekspresija Thy1 na površini stanica postoji već kod živčanih progenitora. Sazrijevanjem neurona signal je sve intenzivniji i prisutan je i u somi te u dendritima i aksonu neurona, što omogućuje proučavanje morfologije stanice.

Funkcije Thy1 proteina su raznolike i uključuju inhibiciju rasta neurita, signaliziranje apoptoze, tumorsku supresiju , adheziju i migraciju leukocita, te proliferaciju i adheziju fibroblasta (53). Osim proučavanja živčane proliferacije i diferencijacije, stanice Thy1-YFP pozitivnog soja mogu se koristiti za analizu ponašanja u eksperimentalnim tumorima, te u upali i cijeljenju rana (54). Stabilnost signala i prisutnost na živčanim progenitorima mogla bi se koristiti u dugotrajnim kulturama ŽMS i proučavanju diferencijacije u razne tipove živčanih stanica, ovisno o staničnoj niši i funkciji koju bi ta živčana stanica trebala obavljati

Također, u eksperimentima na životinjama bi se mogla pratiti sudbina transplantiranih Thy1-YFP pozitivnih neurona dugo vremena nakon transplantacije u zdravim modelima, ali i životinjskom modelu moždanog udara. Dobra vizualizacija aksona je dobar preduvjet za proučavanje neurodegenerativnih bolesti s aksonskom degeneracijom, kao što su Parkinsonova bolest ili multipla skleroza. Sljedeći korak primjene Thy1 soja u eksperimentalnom radu bi mogla biti analiza aksonalne degeneracije na životinjskom modelu bolesti. Korištenjem stanica Thy1-YFP pozitivnog soja moguće je vizualizirati i sinapse, uključujući i neuromišićnu spojnicu. To otvara mogućnost proučavanja promjena same neuromišićne spojnice u bolestima donjeg motoneurona kao što je ALS (55).

7. ZAKLJUČCI

1. Fluorescentni signal Thy1-YFP pozitivnih stanica omogućuje prepoznavanje neurona te proučavanje morfologije cijele stanice.
2. Fluorescentni signal Thy1 se pojavljuje na živčanim progenitorima te raste sa stupnjem diferencijacije neurona.
3. Dodavanje egzogene boje PKH26 stanicama koje nose konstrukt Thy-YFP ne ometa očitavanje oba signala.
4. Kombiniranje Thy1-YFP i PKH26 omogućuje praćenje svih stanica u kulturi, te prepoznavanje živčanih stanica, kao podskupa ukupne stanične populacije.

8. ZAHVALE

Zahvaljujem mentoru, izv. prof. dr. sc. Dinku Mitrečiću , na pruženoj prilici izrade ovog diplomskog rada te na pomoći prilikom pisanja rada. Također zahvaljujem dipl.ing.med.lab. Željki Punčec na tehničkoj podršci prilikom izrade rada.

Zahvaljujem svojim bližnjima i prijateljima na podršci tijekom školovanja.

POPIS LITERATURE

1. Maldonado-Soto A, Oakley D, Wichterle H, Stein J, Doetsch F, Henderson C. Stem Cells in the Nervous System. Am J Phys Med Rehabil. 2014 November; 93(1103): p. 132-144. https://doi.org/10.1097/PHM.0000000000000111.

2. Monti M, Perotti C, Del Fante C, Cervio M, Redi C. Stem cells: sources and therapies. Biol Res. 2012 June; 45: p. 207-214. https://doi.org/10.4067/S0716-97602012000300002.

3. MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services. Stem Cell Information. [Online].; 2016 [cited 2017 April 15]. Available from: https://stemcells.nih.gov/.

4. Evans MJ KM. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. 1981 July; 292(5819): p. 154-156.

5. Martin G. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1981 December; 78(12): p. 7634-7638.

6. Shamblott M, Axelman J, Wang S, Bugg E, Littlefield J, Donovan P, i sur. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. Proc Natl Acad Sci. 1998 November; 95: p. 13726–13731.

7. Research ISfSC. A Closer Look at Stem Cells. [Online].; 2015 [cited 2017 April]. Available from: http://www.closerlookatstemcells.org/.

8. Spangrude G. Stem Cells and Tissue Regeneration. When is a stem cell really a stem cell? Bone Marrow Transplantation. 2003; 32: p. 7-11. https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1703936.

9. Jones R, Lebkowski J, McNiece I. Stem Cells. Biol Blood Marrow Transplant. 2010 January; 16(1 Suppl): p. 115-118. https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2009.10.035.

10. Dexter T. Stromal cell associated haemopoesis. J Cell Physiol Suppl. 1982; 1: p. 87-94.

11. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Cell. 2006 August; 126: p. 663-676. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024.

12. Cheng L, Wenxiang H, Binlong Q, Zhao J, Yu Y, Guan W, i sur. Generation of neural progenitor cells by chemical coctails and hypoxia. Cell Research. 2014 March; 24: p. 665-679. https://doi.org/10.1038/cr.2014.32.

13. Bergstrom T, Forsberg-Nilsson K. Neural stem cells: Brain building blocks and beyond. Upsala Journal of Medical Sciences. 2012 February; 117: p. 132-142. https://doi.org/10.3109/03009734.2012.665096.

14. Eriksson P, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn A, Nordborg C, Peterson D, i sur. Neurogenesis in the adult human hippocampus. Nat Med. 1998; 4: p. 1313-1317.

15. Johansson C, Momma S, Clarke D, Risling M, Lendahl U, Frisen J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. Cell. 1999; 96: p. 23-24.

16. Song S, Song S, Zhang H, Cuevas J, Sanchez-Ramos J. Comparison of Neuron-Like Cells Derived from Bone Marrow Stem Cells to Those Differentiated from Adult Brain Neural Stem Cells. Stem cells and development. 2007; 16: p. 747-756. https://doi.org/10.1089/scd.2007.0027.

17. Pollard S, Conti L, Sun Y, Goffredo D, Smith A. Adherent neural stem (NS) cells from fetal and adult forebrain. Cereb Cortex. 2006 July; 16(Suppl 1): p. 112-120. https://doi.org/10.1093/cercor/bhj167.

18. Johe K, Hazel T, Muller T, Dugich-Djordjevic M, McKay R. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. Genes Dev. 1996 December; 10(24): p. 3129-3140.

19. Jandial R, Singec I, Ames C, Snyder E. Genetic Modification of Neural Stem Cells. Molecular Therapy. 2008 March; 16(3): p. 450-457. https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300402.

20. Bai Y, Hu Q, Li X, Wang Y, Lin C, Shen L, i sur. Telomerase immortalization of human neural progenitor cells. Neuroreport. 2004 February; 15(2): p. 245-249.

21. Cepko C, Fields-Berry S, Ryder E, Austin C, Golden J. Lineage analysis using retroviral vectors. Curr Top Dev Biol. 1998; 36: p. 51-74.

22. Takahashi J, Palmer T, Gage F. Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. J Neurobiol. 1999 January; 38(1): p. 65-81.

23. Yamashita T, Ninomiya M, Hernandez Acosta P, i sur. Subventricular-zone derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. J Neurosci. 2006 June; 26(24): p. 6627-6636. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0149-06.2006.

24. Kameda M, Shingo T, Takahashi K, i sur. Adult neural stem and progenitor cells modified to secrete GDNF can protect, migrate and integrate after intracerebral transplantation in rats with transient forebrain ischemia. Eur J Neurosci. 2007 September; 26(6): p. 1462-1478. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05776.x.

25. Kelly S, Bliss T, Shah A, i sur. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. Proc Natl ACad Sci USA. 2004 August; 101(32): p. 11839-11844. https://doi.org/10.1073/pnas.0404474101.

26. Sullivan R, Duncan K, Dailey T, Kaneko Y, Tajiri N, Borlongan C. A possible new focus for stroke treatmen - migrating stem cells. Expert Opin Biol Ther. 2015 July; 15(7): p. 949-958. https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1043264.

27. Tajiri N, Kaneko Y, Shinozuka K, i sur. Stem cell recruitment of newly formed host cells via a successful seduction? Filling the gap between neurogenic niche and injured brain site. PLoS One. 2013 September; 8(9): p. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074857.

28. Ourednik J, Ourednik V, Lynch W, Schachner M, Snyder E. Neural stem cells display an inherent mechanism for rescuing dysfunctional neurons. Nat Biotechnol. 2002 November; 20(11): p. 1103-1110. https://doi.org/10.1038/nbt750.

29. Azizi S, Stokes D, Augelli B, Digirolamo C, Prockop D. Engrafment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats - similarities to astrocyte graft. Proc Natl Acad Sci USA. 1998 March; 95(7): p. 3908-3913.

30. Mitrečić D, Gajović S, Pochet R. Toward the Treatments with Neural Stem Cells: Experiences from Amyotrophic Lateral Sclerosis. The Anatomical Record. 2009 June; 292: p. 1962–1967. https://doi.org/10.1002/ar.20971.

31. Ebert A, Yu J, Rose F, i sur. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. Nature. 2009 January; 457(7227): p. 277-280. https://doi.org/10.1038/nature07677.

32. Marchetto M, Carromeu C, Acab A, i sur. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. Cells. 2010 November; 143(4): p. 527-539. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.016.

33. Brennand K, Simone A, Jou J, i sur. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. Nature. 2011 May; 473(7346): p. 221-225. https://doi.org/10.1038/nature09915.

34. Yamanaka K, Chun S, Boilee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann D, i sur. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited ALS. Nat Neurosci. 2008 March; 11(3): p. 251-253. https://doi.org/10.1038/nn2047.

35. Nagai M, Re D, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell T, Wichterle H, i sur. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. Nat Neurosci. 2007 May; 10(5): p. 615-622. https://doi.org/10.1038/nn1876.

36. Dimos J, Rodolfa K, Niakan K, Weisenthal L, Mitsumoto H, Chung W, i sur. Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Patients with ALS Can Be

Differentiated into Motor Neurons. Science. 2008 August; 321: p. 1218-1221. https://doi.org/10.1126/science.1158799.

37. Bjorklund L, Sanchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen I, McNaught K, i sur. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. Proc Natl Acad Sci USA. 2002 February; 99(4): p. 2344-2349. https://doi.org/10.1073/pnas.022438099.

38. Guo L, Yin F, Meng H, Ling L, Hu-He T, Fan H, i sur. Differentiation of mesenchymal stem cells into dopaminergic neuron-like cells in vitro. Biomed Environ Sci. 2005 February; 18(1): p. 36-42.

39. Uccelli A, Zappia E, Benvenuto F, Frassoni F, Mancardi G. Stem cells in inflammatory demyelinating disorders: a dual role for immunosupression and neuroprotection. Expert Opin. Biol. Ther. 2006 January; 6(1): p. 17-22. https://doi.org/10.1517/14712598.6.1.17.

40. Konig N, Trolle C, Kapuralin K, Adameyko I, Mitrecic D, Aldskogius H, i sur. Murine neural crest stem cells and embryonic stem cell-derived neuron precursor survive and differentiate after transplantation in a model of dorsal root avulsion. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. 2014;: p. https://doi.org/10.1002/term.1893.

41. Qiao L, Huang F, Zhao M, Xie J, Shi J, Wang J, i sur. A Two-Year Follow-Up Study of Contransplantation With Neural Stem/Progenitor Cells and Mesenchymal Stromal Cells in Ischemic Stroke Patients. Cell Transplantation. 2014 October; 23(Suppl 1): p. 65-72. https://doi.org/10.3727/096368914X684961.

42. Amariglio N, Hirsberg A, Scheithauer B, Cohen Y, Loewenthal R, Trakhtenbrot L, i sur. Donor-Derived Brain Tumor Following Neural Stem Cell Transplantation in an Ataxia Teleangiectasia Patient. PLoS Med. 2009 February; 6(2): p. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000029.

43. Honmou O, Houkin K, Matsunaga T, Niitsu Y, Ishiai S, Onodera R, i sur. Intravenous administration of auto serum-expanded autologus mesenchymal

stem cells in stroke. Brain. A Journal of Neurology. 2011 April; 134: p. 1790-1807. https://doi.org/10.1093/brain/awr063.

44. Lige L, Zengmin T. Transplantation of Neural Precursor Cells in the Treatment of Parkinson's Disease: An Efficacy and Safety Analysis. Turk Neurosurg. 2016 378-383; 26(3): p. https://doi.org/10.5137/1019-5149.JTN.10747-14.4.

45. Feldman E, Boulis N, Hur J, Johe K, Ruzkove S, Federici T. Intraspinal Neural Stem Cell Transplantation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Phase 1 Trial Outcomes. Annals of Neurology. 2014 March; 75(3): p. 363-373. https://doi.org/10.1002/ana.24113.

46. Mazzini L, Gelati M, Profico D, Sgaravizzi G, Projetti Pensi M, Muzi G, i sur. Human neural stem cell transplantation in ALS: initial results from a phase I trial. Journal of Translational Medicine. 2015;: p. https://doi.org/10.1186/s12967-014-0371-2.

47. Chen G, Wang Y, Xu Z, Fang F, Xu R, Wang Y, i sur. Neural stem cell-like cells derived from autologous bone mesenchymal stem cells for the treatment of patients with cerebral palsy. 2013 January;: p. https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-21.

48. Shin J, Kim K, Yoo J, Kim I, Yun S, Lee H, i sur. Clinical Trial of Human Fetal Brain-Derived Neural Stem/Progenitor Cell Transplantation in Patients with Traumatic Cervical Spine Cord Injury. Neural Plasticity. 2015 October; 2015.

49. Hong Yu Y, Narayanan G, Sankaran S, Ramasamy S, Chan S, Lin S, i sur. Purification, Visualization, and Molecular Signature of Neural Stem Cells. Stem Cells and Development. 2016 October; 25(2): p. 189-201. https://doi.org/10.1089/scd.2015.0190.

50. Van Strien M, Sluijs J, Reynolds B, Steindler D, Aronica E, Hol E. Isolation of Neural Progenitor Cells from the Human Adult Subventricular Zone Based on Expression of the Cell Surface Marker CD271. Stem Cells Translational Medicine. 2014 March; 3(4): p. 470-480. https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0038.

51. Alić I, Kapuralin K, Gorup D, Gajović S, Pochet R, Mitrečić D. Neural stem cells from mouse strain Thy1 YFP-16 are a valuable tool to monitor and evaluate neuronal differentiation and morphology. Neuroscience Letters. 2016 October; 634: p. 32-41. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.10.001.

52. LLC. SAC. Sigma-Aldrich. [Online].; 2017 [cited 2017 May 02]. Available from: http://www.sigmaaldrich.com/european-export.html.

53. Spanopoulou E, Giguere V, Grosveld F. The Functional Domains of the Murine Thy-1 Gene Promoter. Molecular and Cellular Biology. 1991 April; 11(4): p. 2216-2228.

54. Josvay K, Winter Z, Katona R, Pecze L, Marton A, Buhala A, i sur. Besides neuro-imaging, the Thy1-YFP mouse could serve for visualizing experimental tumours, inflammation and wound-healing. Scientific Reports. 2014 October; 4: p. https://doi.org/10.1038/srep06776.

55. Blizzard C, Lee K, Dickson T. Inducing Chronic Excitotoxicity in the Mouse Spinal Cord to Investigate Lower Motor Neuron Degeneration. Frontiers in Neuroscience. 2016 March; 10(76): https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00076.

ŽIVOTOPIS

Željka Vujin rođena je 28.kolovoza 1990. godine u Rijeci. Godine 2009. maturirala je u gimnaziji u Srednjoj školi Markantuna de Dominisa Rab. Završila je Osnovnu glazbenu školu Mirković Rab, smjer gitara. Godine 2011. upisala je Medicinski fakultet u Zagrebu. Tijekom fakulteta sudjelovala je u nastavi kao demonstrator u Zavodu za histologiju i embriologiju te u Katedri za kirurgiju. Dobitnica je Dekanove nagrade za 5. godinu u akademskoj godini 2015./2016.