

Utjecaj matičnih stanica na nekroptozu stanica živčanog sustava in vitro uzrokovanu hipoksijom

Hribljan, Valentina

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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:105:243257>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Valentina Hribljan

**Utjecaj matičnih stanica na nekroptozu
stanica živčanog sustava *in vitro*
uzrokovanu hipoksijom**

DISERTACIJA



Zagreb, 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Valentina Hribljan

**Utjecaj matičnih stanica na nekroptozu
stanica živčanog sustava *in vitro*
uzrokovanu hipoksijom**

DISERTACIJA

Zagreb, 2023.

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za matične stanice Hrvatskog instituta za istraživanje mozga na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj: prof. dr. sc. Dinko Mitrečić

Doktorska disertacija je napravljena u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost: „Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“, pod mentorstvom prof. dr. sc. Dinka Mitrečića.

Hvala prof. dr. sc. Dinku Mitrečiću na potpori, razumijevanju i strpljenju.

Hvala obitelji i prijateljima na ljubavi i podršci.

Sadržaj

1. Uvod i svrha rada.....	1
1.1. Matične stanice	1
1.1.1. Definicija i vrste matičnih stanica.....	1
1.1.2. Primjena matičnih stanica u istraživanjima i u liječenju	3
1.2. Živčani sustav	5
1.2.1. Razvoj i ustroj živčanog sustava.....	5
1.2.2. Hipoksijsko-ishemijska ozljeda središnjeg živčanog sustava.....	6
1.3. Stanična smrt	8
1.3.1. Vrste stanične smrti	8
1.3.1.1. Nekroptoza.....	11
2. Hipoteza	14
3. Ciljevi rada.....	15
3.1. Opći cilj	15
3.2. Specifični ciljevi	15
4. Materijali i metode.....	16
4.1. Postupci sa životinjama.....	16
4.1.1. Parenje životinja i određivanje starosti zametaka	16
4.1.2. Žrtvovanje životinja i izolacija zametaka	16
4.2. Postupci sa stanicama	16
4.2.1. Izolacija živčanih matičnih stanica i uzgoj neurosfera.....	16
4.2.2. Zamrzavanje živčanih matičnih stanica	18
4.2.3. Odmrzavanje živčanih matičnih stanica i priprema za pokuse.....	19
4.2.4. Nasađivanje stanica za diferencijaciju	19
4.2.5. Izlaganje nezrelih stanica živčanog sustava hipoksiji, odnosno deprivaciji kisika i glukoze (OGD) - <i>in vitro</i> modelu hipoksije-ishemije	20
4.2.6. Fiksacija stanica za imunocitokemiju	21
4.2.7. Izolacija proteina iz stanica i mjerenje koncentracije proteina uz pomoć Bradford metode	21
4.2.8. Izolacija RNA iz stanica	22
4.3. Imunocitokemija	22
4.4. Western blot	24
4.5. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu	26

4.6. Određivanje intenziteta stanične smrti mjerenjem oslobađanja laktat dehidrogenaze	27
4.7. Statistička obrada rezultata	28
5. Rezultati.....	29
5.1. Potvrda identiteta živčanih matičnih stanica biljezima Nestin i SOX2	29
5.2. Usporedba nekoliko načina diferencijacije živčanih matičnih stanica je pokazala kako je za zadovoljavajuće preživljenje stanica potreban fetalni goveđi serum	30
5.3. Usporedba diferencijacije živčanih matičnih stanica u ambijentalnoj i tkivnoj normoksiji.....	34
5.3.1. Usporedba morfoloških osobina živčanih matičnih stanica u diferencijaciji u ambijentalnoj i tkivnoj normoksiji nije pokazala vidljive razlike.....	35
5.3.2. Usporedba izražaja gena koji sudjeluju u određivanju smjera diferencijacije te nekroptozi u ambijentalnoj i tkivnoj normoksiji	40
5.3.2.1. Diferencijacija stanica u uvjetima tkivne normoksije povećava izražaj biljega matičnosti.....	41
5.3.2.2. Diferencijacija stanica u uvjetima tkivne normoksije povećava izražaj biljega neurona.....	41
5.3.2.3. Diferencijacija stanica u uvjetima tkivne normoksije povećava izražaj biljega astrocita	41
5.3.2.4. U ranom stadiju diferencijacije stanica u uvjetima tkivne normoksije smanjen je izražaj gena Mkl1, biljega nekroptoze	41
5.3.3. Mjerenje oslobođene laktat dehidrogenaze (LDH) kao pokazatelja stanične smrti u ambijentalnoj i tkivnoj normoksiji.....	49
5.3.3.1. Diferencijacija živčanih matičnih stanica u ambijentalnoj i tkivnoj normoksiji nije pokazala značajne razlike u razini odumiranja stanica	49
5.4. Stanična smrt i aktivnost nekroptoze u <i>in vitro</i> kulturi nezrelih stanica živčanog sustava izloženih hipoksiji te deprivaciji kisika i glukoze (OGD).....	51
5.4.1. Mjerenje oslobođene laktat dehidrogenaze pokazalo je da deprivacija kisika i glukoze (OGD) izaziva mnogo veće oštećenje nezrelih stanica živčanog sustava u usporedbi s deprivacijom kisika (hipoksija).....	53
5.4.2. Izražaj biljega nekroptoze značajno je povećan u nezrelim stanicama živčanog sustava izloženima deprivaciji kisika i glukoze (OGD) u usporedbi sa stanicama izloženima samo deprivaciji kisika (hipoksija).....	54
5.5. Utjecaj egzogenih živčanih matičnih stanica, kondicioniranog medija te Necrostatina-1s na stanice izložene deprivaciji kisika i glukoze (OGD) tijekom kratke (6 h) i duge (24 h) reoksigenacije.....	55

5.5.1.	Tretiranje nezrelih stanica živčanog sustava oštećenih 24-satnom deprivacijom kisika i glukoze živčanim matičnim stanicama, kondicioniranim medijem te Necrostatinom-1s, nije utjecalo na aktivnost nekroptoze, mjereno izražajem proteina p-MLKL.....	57
5.5.2.	Utjecaj kondicioniranog medija na oslobađanje laktat dehidrogenaze.....	60
5.5.3.	Utjecaj tretmana na izražaj proteina SOX2, TUBB3 te GFAP, biljega živčanih matičnih stanica, neurona, odnosno astrocита.....	61
5.6.	Imunocitokemijska analiza stanica izloženih deprivaciji glukoze i kisika te kratkoj (6 h), odnosno dugoj (24 h) reoksigenaciji.....	70
5.6.1.	Morfološka analiza stanica izloženih deprivaciji kisika i glukoze otkriva manji broj neurona s kraćim nastavcima te astrocitate koji su skupljeni	70
5.6.2.	Imunocitokemijska analiza nekroptoze nije pouzdana zbog postojanja vjerojatnog nespecifičnog vezanja protutijela	74
6.	Rasprava	78
6.1.	Osmodnevni uzgoj živčanih matičnih stanica miša u mediju s dodatkom 1 % FBS-a predstavlja dobar model nezrelog živčanog sustava	78
6.2.	Razina kisika utječe na smjer diferencijacije živčanih matičnih stanica, ali ne i na intenzitet stanične smrti.....	79
6.3.	Izazivanje nekroptoze u modelu nezrelih stanica živčanog sustava zahtjeva istovremenu deprivaciju kisika i glukoze	82
6.4.	Necrostatin-1s ne smanjuje izražaj proteina p-MLKL u modelu nezrelih stanica živčanog sustava	82
6.5.	Tretman živčanim matičnim stanicama ne utječe na izražaj proteina p-MLKL, ali utječe na TUBB3 i SOX2.....	83
6.6.	Imunocitokemijska analiza otkriva očekivane morfološke razlike između kontrolnih stanica i stanica izloženih deprivaciji kisika i glukoze	87
6.7.	Imunocitokemijska analiza s anti-p-MLKL protutijelom nije pouzdana zbog postojanja vjerojatnog nespecifičnog vezanja na western blotu.....	88
7.	Zaključci.....	91
8.	Sažetak.....	92
9.	Summary	93
10.	Popis literature	94
11.	Životopis	104

POPIS KRATICA

ASC – adultne matične stanice (engl. *adult stem cells*)

cDNA – komplementarna deoksiribonukleinska kiselina (engl. *complementary deoxyribonucleic acid*)

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol

EMA – Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*)

ESC – embrionalne matične stanice (engl. *embryonic stem cells*)

FBS – fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum*)

FDA – Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*)

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

GFAP – engl. *glial fibrillary acidic protein*, biljeg astrocita

HIE – hipoksijsko-ishemijska encefalopatija (engl. *hypoxic-ischemic encephalopathy*)

HSC – hematopoetske matične stanice (engl. *hematopoietic stem cells*, HSC)

ICC – imunocitokemija

iPSC – inducirane pluripotentne matične stanice (engl. *induced pluripotent stem cells*)

LDH – laktat dehidrogenaza

MAP2 – engl. *Microtubule-associated protein 2*, biljeg neurona

mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina (engl. *messenger ribonucleic acid*)

MSC – mezenhimalne matične stanice (engl. *mesenchymal stem cells*)

OGD – deprivacija kisika i glukoze (engl. *oxygen-glucose deprivation*)

PBS – fiziološka otopina puferirana fosfatom (engl. *phosphate-buffered saline*)

p-MLKL – biljeg nekroptoze (engl. *phosphorylated mixed lineage kinase domain-like protein*)

RIPK1 – protein koji sudjeluje u signalnom putu nekroptoze (engl. *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*)

RIPK3 – protein koji sudjeluje u signalnom putu nekroptoze (engl. *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3*)

SDS – natrijev dodecil sulfat (prema engl. *sodium dodecil sulphate*)

SOX2 – engl. *SRY-Box Transcription Factor 2*, biljeg živčanih matičnih stanica

TUBB3 – β 3-Tubulin, biljeg neurona

ŽMS – živčane matične stanice

NF-H, NF-M – dvije podjedinice neurofilamenta koje se nalaze u aksonima neurona
(engl. *Neurofilament heavy, medium*)

1. Uvod i svrha rada

1.1. Matične stanice

1.1.1. Definicija i vrste matičnih stanica

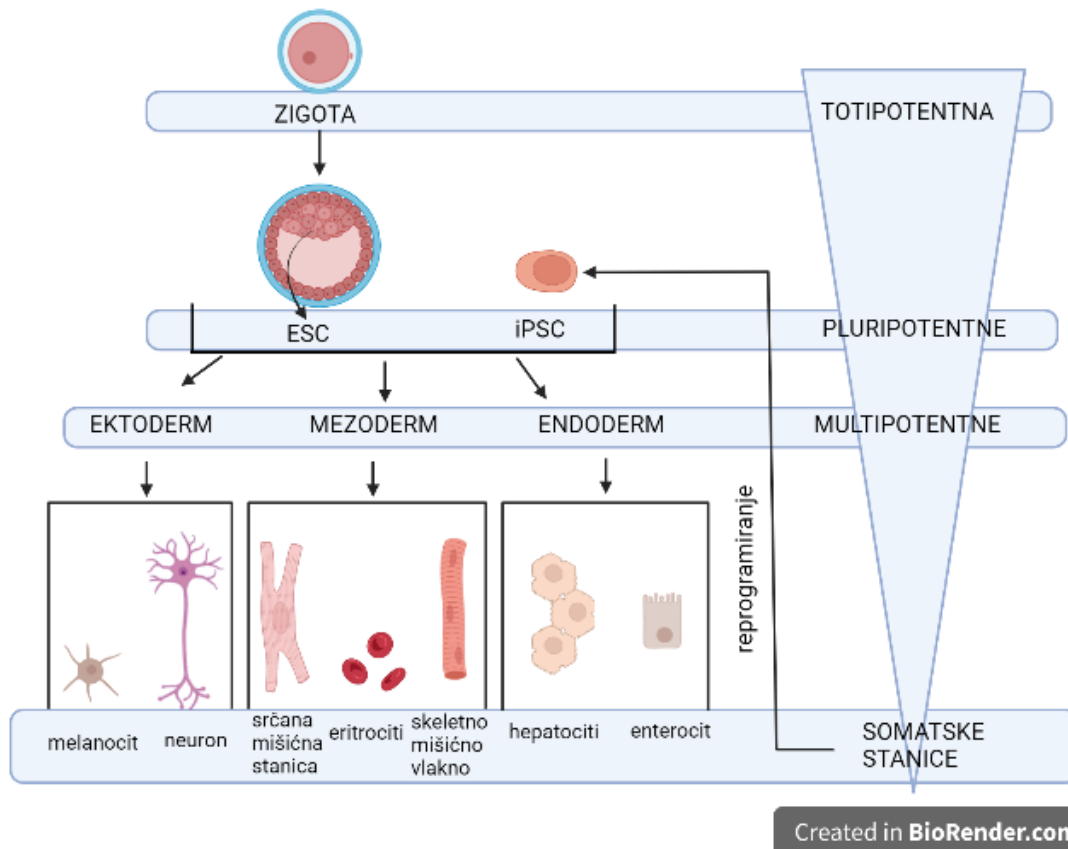
Matične stanice su stanice koje imaju sposobnost samoobnove i diferencijacije. Samoobnova se postiže diobom matičnih stanica kojom nastaju nove matične stanice, dok diferencijacijom nastaju različite vrste specijaliziranih stanica. O vrsti matičnih stanica ovisi i broj različitih tipova specijaliziranih stanica u koje se one mogu diferencirati.

Matične stanice mogu se podijeliti prema podrijetlu, te prema potentnosti. Prema podrijetlu, matične stanice se dijele na **embrionalne**, **adultne** i **inducirane pluripotentne**, dok se prema potentnosti dijele na **totipotentne**, **pluripotentne** i **multipotentne** (slika 1.).

Embriogeneza je biološko zbivanje kojim iz oplođene jajne stanice (zigote) nastaje cijeli organizam, a tijekom tog procesa stanice postaju sve diferenciranije, odnosno sve specijaliziranije za obavljanje specifičnih zadataka. Zigota i blastomere dvostaničnog embrija koje nastaju diobom zigote su po svojem potencijalu totipotentne. To znači da se mogu diferencirati u sve tipove stanica odraslog organizma, te u stanice koje sudjeluju u oblikovanju posteljice (1). Kako embriogeneza napreduje, iz stanica morule, koje su međusobno morfološki i funkcionalno identične, diobom i diferencijacijom nastati će stanice trofoblasta te stanice embrioblasta. Stanice trofoblasta čine osnovu za razvoj posteljice, dok su stanice embrioblasta pluripotentne, što znači da iz njih mogu nastati svi tipovi stanica odraslog organizma (slika 1.). Iz embrioblasta nastaju tri zametna listića: ektoderm, mezoderm te endoderm. Od svaka od tri zametna listića razviti će se određeni organski sustavi. Tako npr. iz ektoderma nastaje koža i živčani sustav, iz mezoderma masno tkivo, a iz endoderma dijelovi probavnog sustava. Stanice ektoderma, mezoderma i endoderma više nisu pluripotentne, već multipotentne, tj. iz stanica pojedinog zametnog listića ne može nastati cijeli organizam već samo određeni organski sustavi. Drugim riječima, kako embriogeneza napreduje, stanice postaju sve specijaliziranije, tj. manje potentne, a specijalizacijom poprimaju svoju funkciju koju će obavljati u odraslom organizmu.

Osnovna zadaća embrionalnih matičnih stanica je izgraditi organizam, dok je uloga adultnih matičnih stanica (ASC, engl. *adult stem cells*) nadomještati dotrajale diferencirane stanice koje se ne mogu dijeliti. Mnoga tkiva sadrže adultne matične stanice, ali u značajno različitom broju. Tako su npr. koštana srž, masno tkivo i koža bogati matičnim stanicama, dok su one malobrojnije u mišićima ili živčanom tkivu (2–5). Većina ASC su multipotentne, pa se tako npr. hematopoetske stanice koštane srži mogu diferencirati u različite tipove krvnih stanica.

U odraslom organizmu ne postoje pluripotentne matične stanice koje se mogu diferencirati u bilo koju somatsku stanicu. Međutim, danas vladamo tehnologijama koje nam omogućuju da u laboratoriju somatske stanice pretvorimo u pluripotentne matične stanice (slika 1.). Reprogramiranje somatskih stanica u pluripotentne matične stanice otkriveno je 2006.g kada su Takahashi i Yamanaka iz mišjih embrionalnih i adultnih fibroblasta uz pomoć četiriju transkripcijskih faktora, Oct3/4, Sox2, c-Myc, i Klf4, dobili pluripotentne stanice koje su diferencirali u stanice sva tri zametna listića (6). Samo godinu dana kasnije, uz pomoć istih transkripcijskih faktora su dobili pluripotentne stanice iz adultnih ljudskih fibroblasta (7). iPSC su se pokazale kao dobra zamjena za ljudske embrionalne matične stanice čije je korištenje u pretkliničkim i kliničkim istraživanjima etički problematično. Također, iPSC su otvorile mogućnost autologne transplantacije čime bi se spriječila potencijalna imunološka reakcija na transplantirane stanice donora. Nadalje, znanstvenici su iz iPSC u laboratoriju uspjeli dobiti razmjerno kompleksne trodimenzionalne modele brojnih organa, kao što su mozak, jetra te srce - takozvane organoide (8–10). Organoidi su u brojnim istraživanjima postali važan model jer se radi o ljudskim stanicama koje predstavljaju bolji model ljudske fiziologije u usporedbi s modelom miša ili štakora. Iz tog razloga, iPSC i organoidi danas su iznimno važni u istraživanjima novih lijekova (11,12). O epohalno velikoj važnosti ovih otkrića govori i činjenica da su Yamanaka i Gurdon nagrađeni Nobelovom nagradom 2012., samo 6 godina nakon prve publikacije o iPSC.



Slika 1. Podjela matičnih stanica prema potentnosti.

1.1.2. Primjena matičnih stanica u istraživanjima i u liječenju

Potencijalna dobrobit matičnih stanica u regenerativnoj medicini uključuje zamjenu oštećenih stanica, ali i poticanje endogenih mehanizama popravka i obnove. Poticanje obnove tkiva postiže se izlučivanjem različitih faktora i drugih bioaktivnih komponenti upakiranih u izvanstanične mjehuriće (vezikule), od kojih su najbolje istraženi tzv. egzosomi (13,14). Zbog niza pokazanih koristi, tj. sposobnosti matičnih stanica za regeneraciju ili popravak tkiva, matične stanice se već koriste u određenim područjima regenerativne medicine, dok se u drugima njihov potencijal još istražuje.

U posljednjih 50 godina objavljeno je više od 40 000 znanstvenih članaka koji govore o terapijskoj primjeni matičnih stanica (15), što je dobar temelj za klinička istraživanja. Trenutno u kliničkim istraživanjima prednjače mezenhimalne matične stanice (MSC, engl. *mesenchymal stem cells*). Mezenhimalne matične stanice su multipotentne matične stanice podrijetla mezoderma ili neuralnog grebena (16). Identificirane su i

izolirane iz mnogih tkiva uključujući koštanu srž, masno tkivo, pulpu zuba, amnionsku tekućinu, pupkov tračak, jetru, tetive i srce (17). Do srpnja 2020. g. registrirano je ukupno 1138 kliničkih studija koje uključuju MSC (18). Većina ih se nalazi u fazi 2 ili 1, te su fokusirane na područja traumatologije, neurologije, kardiologije te imunologije (18). Istovremeno, iPSC su u nekim područjima medicine ušle u kliničku fazu istraživanja, a to posebno vrijedi za područje oftalmologije (19). Također, živčane matične/progenitorne stanice dobivene iz ljudskih iPSC uskoro će ući u kliničko istraživanje kao terapija za subakutnu potpunu ozljedu kralježnične moždine (20). Zahvaljujući uspjehu kliničkih istraživanja, neki tipovi matičnih stanica ušli su u kliničku primjenu.

Trenutno postoji 21 proizvod temeljen na matičnim stanicama koji je odobren za upotrebu u liječenju, od čega ih je 12 odobreno od strane američke FDA (engl. *Food and Drug Administration*) ili europske EMA-e (engl. *European Medicines Agency*), dok su ostali odobreni u drugim državama, posebno u Aziji (21). Trenutno odobrene terapije matičnim stanicama uključuju hematopoetske matične stanice (HSC), mezenhimalne matične stanice (MSC), te limbalne matične stanice. Hematopoetske matične stanice su najbolje okarakterizirane adultne matične stanice i jedini tip matičnih stanica koje se rutinski primjenjuju za liječenje različitih hematoloških bolesti (22). Hematopoetske matične stanice se mogu izolirati iz koštane srži, periferne krvi ili iz krvi pupkovine (engl. *umbilical cord blood*) (23). Mezenhimalne matične stanice su odobrene od strane KFDA (engl. *Korea Food and Drug Administration*) za liječenje akutnog infarkta miokarda, repetitivnu i/ili traumatsku degeneraciju hrskavice te subkutane tkivne defekte, dok je EMA odobrila terapiju alogenih MSC za tretiranje kompleksnih perianalnih fistula u Crohnovoj bolesti (21). Limbalne matične stanice nalaze se u uskom području na granici (limbusu) rožnice i konjunktive, imaju važnu ulogu u obnovi i popravku epitela rožnice, a njihovo korištenje i za tretiranje fizičkih i kemijskih opekline oka odobreno je od strane EMA-e 2015. godine (24).

Za neurološke bolesti kao što su moždani udar, Alzheimerova bolest, multipla skleroza, i Parkinsonova bolest, ne postoji rutinska klinička primjena terapije matičnim stanicama. Međutim, postoje brojne kliničke studije (25–31), ali također još uvijek i brojne

prekliničke studije kojima se nastoji doprinijeti boljem razumijevanju djelovanja matičnih stanica i molekula koje izlučuju na živčani sustav zahvaćen nekim patološkim zbivanjem.

1.2. Živčani sustav

1.2.1. Razvoj i ustroj živčanog sustava

Razvoj svih organskih sustava, pa tako i živčanog, vrlo je precizno reguliran. Svaka faza razvoja se događa u zadanom vremenskom okviru, a kontrolirana je na molekularnoj razini. Živčani sustav nastaje od ektoderma, jednog od triju zametnih listića. Oko trećeg tjedna intrauterinog razvoja ispod ektoderma pojavljuje se notokord (32) – struktura građena od mezodermalnih stanica koja ima ključnu ulogu u indukciji diferencijacije ektoderma u neuroektoderm. Neuroektoderm u početnoj fazi razvoja oblikuje neuralnu ploču, koja se, kako razvoj napreduje, savija te stvara neuralni žlijeb. Neuralni žlijeb se naposljetku zatvara čime nastaje neuralna cijev - osnova iz koje će se razviti mozak i kralježnična moždina. Iz tri primarna mjehurića u rostralnom dijelu neuralne cijevi: *prosencephalon*, *mesencephalon* i *rhombencephalon*, nastati će mozak. Dok se *mesencephalon* daljnjim razvojem ne dijeli, *prosencephalon* se dijeli na *telencephalon* i *diencephalon*, a *rhombencephalon* na *metencephalon* i *myelencephalon* (33). *Telencephalon* čine kortikalne i subkortikalne strukture kao što su bazalni gangliji; *diencephalon* čine strukture poput talamusa, hipotalamusa, subtalamusa; u *mesencephalonu* se nalaze strukture poput crne jezgre (*substantia nigra*) i periakveduktalne sive tvari; *metencephalon* čine most i mali mozak, dok *myelencephalon* čini produljena moždina. Neke strukture u mozgu poput hipotalamusa su evolucijski starije te su uključene u regulaciju osnovnih funkcija poput regulacije tjelesne temperature (34), dok su druge strukture poput frontalnog korteksa evolucijski mlađe te sudjeluju u evolucijski novijim funkcijama poput kognicije.

Mozak čine dva osnovna tipa stanica: neuroni i glija stanice. Neuroni su stanice koje međusobno komuniciraju posebnim vezama koje se nazivaju sinapse. Sve uloge koje neuroni obavljaju su omogućene preciznom regulacijom međudjelovanja koje ostvaruju u kompleksnim staničnim mrežama. Ono što u mozgu nazivamo siva tvar je primarno građeno od nakupine tijela neurona, dok bijelu tvar primarno čine mijelinizirani aksoni. Komunikacija neurona u pojedinoj regiji mozga, ali i između regija odvija se

zahvaljujući aksonima koji mogu biti vrlo dugački. Tako se akson neurona koji se nalazi u jednoj regiji mozga može protezati do druge regije mozga prenoseći signale neuronima koji se tamo nalaze. U glija stanice se svrstavaju astrociti, oligodendrociti i mikroglia. Astrociti su najbrojnije stanice živčanog sustava koje pružaju strukturnu i metaboličku potporu neuronima. Oligodendrociti mijeliniziraju aksone neurona omogućujući brzi prijenos signala, dok mikroglia ima imunološku ulogu. Astrociti i oligodendrociti, kao i neuroni, nastaju iz neuroepitelnih živčanih matičnih stanica, dok mikroglia nastaje iz primitivnih makrofaga u žumanjčanoj vreći koji nasele živčani sustav u razvoju (35).

Neuroni su metabolički vrlo zahtjevne stanice te se procjenjuje da ih mozgu ima oko 86 milijardi (36). Jedan od razloga zašto je regeneracija središnjeg živčanog sustava vrlo ograničena nalazi se u činjenici da su neuroni stanice koje se ne dijele. Drugi razlog je u aksonima, koji u većini situacija u kojima se prekine njihova veza s ciljanom stanicom, tu vezu više ne mogu ponovno uspostaviti. Zanimljivo je uočiti kako postoje razlike između središnjeg i perifernog živčanog sustava. Dok periferni živčani sustav posjeduje intrinzičnu sposobnost regeneracije i popravka, u središnjem živčanom sustavu je ta sposobnost vrlo ograničena (37). Naime, složena povezanost neurona nastaje tijekom embrionalnog razvoja, a tada su svi procesi u mozgu podređeni uspostavljanju kompleksne organizacije. U tom području i fazi razvoja, izvanstanični okoliš te različite molekule koje proizvode druge stanice navode aksone do njihovih ciljanih stanica (38). S druge strane, u razvijenom središnjem živčanom sustavu, u kojem je sve podređeno komunikaciji među neuronima, sastav izvanstaničnog matriksa je drukčiji, a dostupnost molekula za navođenje aksona je znatno manja. Time je u središnjem živčanom sustavu ograničen rast aksona te je uspostavljanje prvobitnih veza nakon staničnog oštećenja značajno otežano.

1.2.2. Hipoksijsko-ishemijska ozljeda središnjeg živčanog sustava

Ishemijski moždani udar i perinatalna hipoksijsko-ishemijska encefalopatija (engl. *hypoxic-ischemic encephalopathy*, HIE) svrstavaju se u najčešće bolesti živčanog sustava. U oba slučaja ozljeda nastaje uslijed prekida opskrbe krvlju središnjeg živčanog sustava, a ovisno o veličini zahvaćene regije te intenziteta ozlijede, posljedice variraju. U

slučajevima kada ozljeda nije intenzivna može doći do potpunog oporavka, dok intenzivne ozljede mogu dovesti do smrtnih posljedica ili do oštećenja koja značajno narušavaju funkciju živčanog sustava. Kako mozak u perinatalnom periodu još uvijek nije u potpunosti razvijen, endogena sposobnost obnove nakon ozljede je veća u usporedbi s odraslim razvijenim mozgom. Istovremeno, osobine mozga u razvoju kao što je još nerazvijeni sustav obrane protiv antioksidansa, čine ga ranjivijim (39,40). Ishemijske ozljede mogu nanijeti značajno oštećenje mozgu u perinatalnom periodu, a obrazac oštećenja ovisi o stupnju razvijenosti mozga i jačini ozljede (41). Iako istraživanja govore o velikoj varijaciji zahvaćenih anatomskih područja u HIE, uglavnom se opisuju predominantne ili značajne ozljede cerebralnog korteksa, bazalnih ganglija i talamusa (40). Hipoksijsko-ishemijska ozljeda korteksa i bazalnih ganglija često dovode do problema s jezikom i motorikom koji se javljaju u djetinjstvu (40).

S obzirom na to da se odgovor tkiva odnosno stanica na perinatalnu hipoksiju-ishemiju razlikuje u ovisnosti od toga koliko je vremena prošlo od izazivanja ozljede, razvoj patološkog procesa može se podijeliti u faze (42). U početku, kada dođe do smanjenog protoka krvi u fetalni mozak, u tkivu dolazi do primarnog energetskog poremećaja (engl. *energy failure*), što dovodi do stanične smrti zbog redukcije ATP-a (adenozin trifosfat) i glukoze, povećanja unutarstaničnog kalcija, a time i do povećanog izvanstaničnog glutamata (42). Nakon reoksigenacije slijedi latentna faza u kojoj se pokušava uspostaviti „normalno“ stanje (42). U sekundarnoj fazi koja nastupa 6-12 sati nakon hipoksije-ishemije, nastupa snažni val stanične smrti, te dolazi do razvoja upale, oksidativnog stresa i oštećenja mitohondrija (42). Ovisno o intenzitetu ozljede, faza tercijarnog energetskog poremećaja može trajati mjesecima, a karakterizira ju remodeliranje, popravak i astroglioza (42).

Za sada jedina terapija za HIE koja se koristi u klinici je hipotermija (43). Hipotermija se primjenjuje u slučajevima srednje teške i teške ozljede kod novorođenčadi rođenih u terminu ili blizu termina. Trenutni protokol hipotermije za srednje tešku i tešku HIE uključuje početak hlađenja čim prije moguće, a unutar 6 h od poroda na 34.5°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) za selektivno hlađenje glave, ili 33.5°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) za hlađenje cijelog tijela sa kontinuitetom hlađenja od 72 h (44,45). Iako terapija hipotemijom značajno smanjuje

smrtnost i invaliditet, skoro polovica novorođenčadi s HIE liječenih hipotermijom umire ili prežive sa značajnim invaliditetom (44,46). Iz tog razloga postoji potreba za pronalaženjem novih pristupa kojima bi se poboljšalo liječenje HIE. Od nekoliko trenutno istraživanih pristupa, ističe se potencijalna primjena eritropoetina. Eritropoetin je molekula koja je dobila naziv po tome što potiče eritropoezu, a pokazano je i da stimulira angiogenezu, neurogenezu i neuronalnu plastičnost nakon ishemijske ozljede novorođenčadi (43,47). Kliničke studije otkrile su kako je intravenozna ili subkutana administracija eritropoetina sigurna, dobro tolerirana te pokazuje dobrobit u obliku smanjenja smrtnosti i izraženosti neuroloških simptoma (43). Kao potencijalna terapija za HIE razmatraju se i matične stanice. Od 58 pretkliničkih istraživanja u kojima su matične stanice korištene kao potencijalna terapija za HIE, oko 80 % istraživanja pokazalo je značajno poboljšanje kognitivnih i/ili senzorno-motornih funkcija kao i smanjeno oštećenje mozga (48). Također, pretkliničke i kliničke studije pokazale su kako su umbilikalne matične stanice i mezenhimalne matične stanice dovoljno sigurne i efikasne te se testiraju kao potencijalna opcija za terapiju HIE (49).

1.3. Stanična smrt

Stanična smrt važno je zbivanje u razvoju i oblikovanju organizma, ali i u fiziologiji odraslog organizma u kojem stanice umiru i zamjenjuju se novima. Tijekom razvoja, stanična smrt se odvija u mnogim organskim sustavima u nastanku, pa tako i u živčanom. Stanična smrt u razvoju živčanog sustava važna je za uklanjanje viška neurona čime se omogućuje oblikovanje funkcionalnih neuronalnih krugova (50). S druge strane, stanična smrt pridonosi patofiziologiji mnogih bolesti živčanog sustava kao što su moždani udar, Alzheimerova bolest i Parkinsonova bolest (51). Prema tome, razumijevanje okidača i tijeka stanične smrti vrlo je važno za razumijevanje fizioloških i patofizioloških stanja.

1.3.1. Vrste stanične smrti

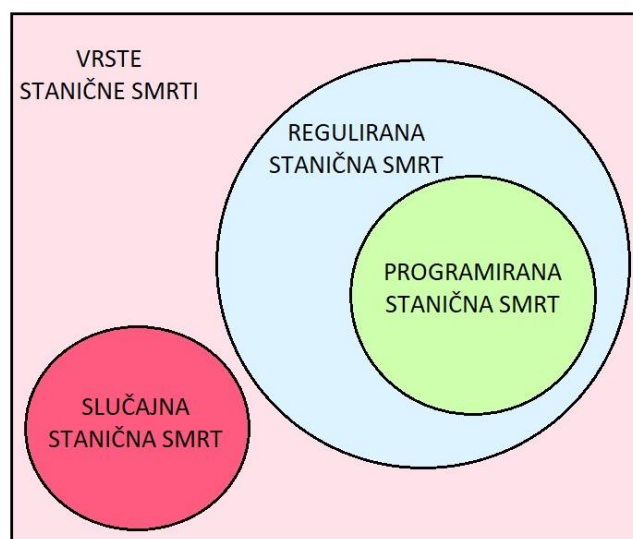
Vrste stanične smrti su se u starijim klasifikacijama dijelile prema izgledu opaženih promjena. Morfološka podjela stanične smrti uključivala je tri različita tipa (52). **Tip I stanične smrti ili apoptoza** je obilježena sakupljanjem citoplazme, kondenzacijom kromatina, fragmentacijom jezgre te pupanjem stanične membrane što rezultira

nastankom malih vezikula (apoptotička tjelešca) (52). Apoptotička tjelešca fagocitiraju stanice koje imaju fagocitoznu sposobnost te ih degradiraju uz pomoć lizosoma. **Tip II stanične smrti ili autofagija** je obilježena vakuolizacijom citoplazme, a ovaj tip stanične smrti također može kulminirati fagocitozom i lizosomalnom degradacijom (52). **Tip III stanične smrti ili nekroza**, uključuje rupturu stanične membrane te raspadanje stanice bez očite fagocitičke aktivnosti (52,53). Budući da se u nekrozi stanice nekontrolirano raspadaju, taj oblik smrti je uvijek praćen nekom razinom upale.

Prema još jednoj, sada sve više zastarjeloj podjeli, postojale su 2 tipa stanične smrti: programirana staničnu smrt ili apozozna te neregulirana staničnu smrt ili nekroza. Apoptoza je posredovana kaspazama, tj. za ovaj oblik smrti postoji definiran signalni put. S druge strane, za nekrozu se smatralo da je u potpunosti neregulirana, odnosno da nastaje kao posljedica ekstremnog fizičkog ili kemijskog stresa koji dovodi do ruptore stanične membrane i izlivanja staničnog sadržaja u izvanstanični prostor. Međutim, zadnjih dvadesetak godina je otkriveno više tipova stanične smrti koje karakterizira nekrotička morfologija, a koje su posredovane određenim signalnim putevima (53). Prema tome, stanična smrt nekrotičke morfologije također može biti regulirana. Isto tako, iako su morfološka obilježja i dalje važan element u klasifikaciji različitih oblika stanične smrti, napretkom istraživanja u staničnoj molekularnoj biologiji, sve bolje poznajemo molekularne puteve koji su specifični za određene oblike smrti stanica.

Zbog potrebe za razjašnjavanjem pojedinih tipova stanične smrti, ali i praćenjem najnovijih otkrića, urednici časopisa *Cell Death and Differentiation* oformili su vijeće za nomenklaturu stanične smrti (engl. *Nomenclature Committee on Cell Death*, NCCD). Od 2005. do danas, NCCD svakih nekoliko godina objavljuje smjernice za klasifikaciju te novosti vezane uz signalne puteve za pojedine tipove stanične smrti (53–57). Od 2012., u skladu sa značajnim napretkom u biokemijskom i genetičkom istraživanju stanične smrti, NCCD predlaže da se morfološka klasifikacija stanične smrti zamijeni molekularnom (56). Također, predlažu generalnu podjelu stanične smrti na „slučajnu staničnu smrt“ (eng. *accidental cell death*, ACD) izazvanu ekstremnim fizičkim, kemijskim ili mehaničkim stimulusima čija je posljedica trenutni gubitak integriteta stanične membrane, te „reguliranu staničnu smrt“ (engl. *regulated cell death*, RCD) koja uključuje

genetski programiranu molekularnu mašineriju (57). Regulirana stanična smrt može biti aktivirana kao adaptivni odgovor na promjene u mikrookolišu. Također, može biti i dio fiziološkog programa, a u tom slučaju se govori o programiranoj staničnoj smrti (engl. *programmed cell death*, PCD) (slika 2.). Nekada je termin PCD bio sinonim za apoptozu što je i dalje ispravno ako se govori o apoptozi u kontekstu razvoja i održavanja homeostaze u organizmu. Međutim, kada je apoptoza prisutna u određenim patofiziološkim okolnostima, govorimo o reguliranoj staničnoj smrti (57). S druge strane i neke vrste stanične smrti koje ne karakterizira apoptotička morfologija mogu biti važne u fiziološkim uvjetima i održavanju homeostaze, pa se svrstavaju u programiranu staničnu smrt. Tako npr. degradaciju žlijezda slinovnica u vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) karakterizira stanična smrt autofagijske morfologije, dok se remodeliranje kostiju u zonama rasta (engl. *growth plates*) povezuje sa staničnom smrću nekrotičke morfologije (57,58).



Slika 2. Vrste stanične smrti. Slučajnom staničnom smrću umiru stanice izložene ekstremnim fizičkim, kemijskim ili mehaničkim stimulusima koji uzrokuju gubitak strukturalnog identiteta. Takav način odumiranja je nekontroliran i trenutno. S druge strane, stanična smrt može biti započeta genetski kodiranom mašinerijom, a u tom slučaju radi se o reguliranoj staničnoj smrti. Na tijek regulirane stanične smrti do neke mjere se može utjecati specifičnim farmakološkim ili genetičkim intervencijama. Termin programirana stanična smrt odnosi se na reguliranu staničnu smrt koja se odvija kao dio razvojnog programa ili kako bi se očuvala fiziološka homeostaza tkiva odraslog organizma. Izrađeno na temelju Galluzzi i sur. 2015. (57).

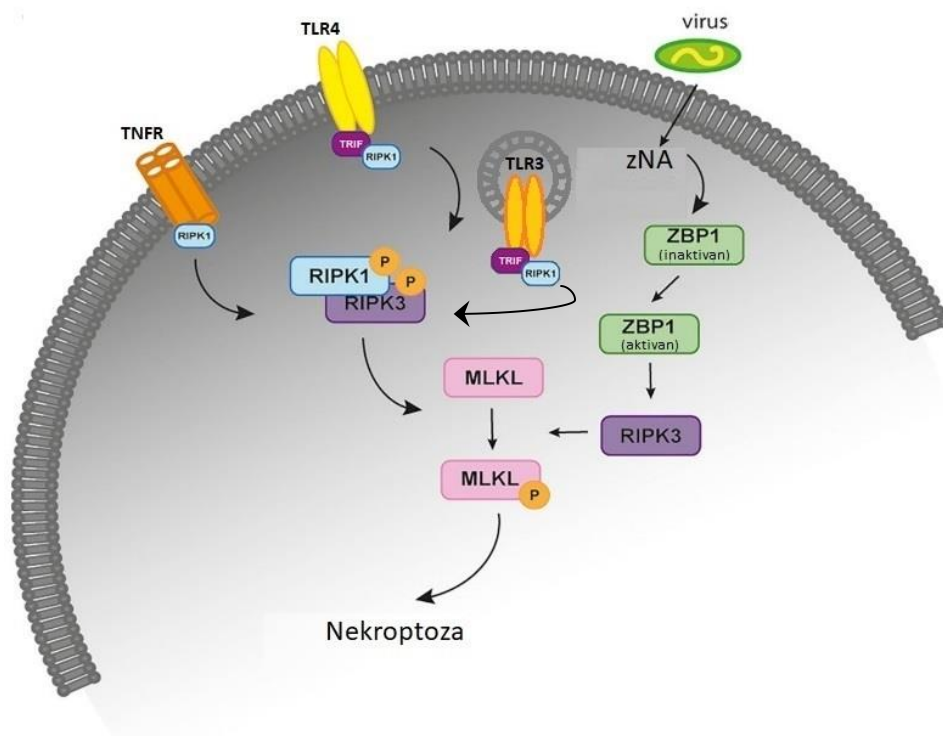
Prema zadnjim preporukama NCCD iz 2018. godine, ovo su vrste stanične smrti koje se mogu molekularno definirati: intrinzična apoptoza (engl. *intrinsic apoptosis*), ekstrinzična apoptoza (engl. *extrinsic apoptosis*), MPT-posredovana nekroza (engl. *mitochondrial permeability transition (MPT)-driven necrosis*), nekroptoza (engl. *necroptosis*), ferroptoza (engl. *ferroptosis*), piroptoza (engl. *pyroptosis*), partanatos (engl. *parthanatos*), entotička stanična smrt (engl. *entotic cell death*), NETotička stanična smrt (engl. *NETotic cell death*), stanična smrt ovisna o lizosomima (engl. *lysosome-dependent cell death*), stanična smrt ovisna o autofagiji (engl. *autophagy-dependent cell death*), imunogena stanična smrt (engl. *immunogenic cell death*) i mitotička katastrofa (engl. *mitotic catastrophe*) (53). Od navedenih tipova stanične smrti, uz ferroptozu i piroptozu, nekroptoza je najpoznatiji tip tzv. regulirane nekroze, tj. stanične smrti nekrotičke morfologije posredovane signalnim putem.

1.3.1.1. Nekroptoza

Stanična smrt nekrotičke morfologije pokrenuta stimulacijom receptora iz porodice Fas/TNFR (engl. *Tumor necrosis factor receptor*), neovisna o kaspazi-8, a posredovana kinazom RIPK1 (engl. *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*), otkrivena je 2000. g. (59). Pet godina kasnije, otkriven je Necrostatin-1 (Nec-1), inhibitor kinazne aktivnosti RIPK1, a taj tip stanične smrti nazvan je nekroptoza (60). Slijedila su brojna istraživanja koja su rasvijetlila druge komponente signalnog puta nekroptoze. Pokazano je kako se kinaza RIPK3 (engl. *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3*) nalazi nizvodno od RIPK1 te tvori kompleks s RIPK1 (61–63). Nedugo nakon toga otkriveno je da se pseudokinaza MLKL (engl. *Mixed lineage kinase domain-like*) fosforilira od strane RIPK3 te da je ključna komponenta nekroptoze, a istovremeno je otkrivena i mala molekula Necrosulfonamide (NSA) koja inhibira ljudski, ali ne i mišji MLKL (64–66). Kada se MLKL fosforilira od strane RIPK3, tvori oligomere koji odlaze na staničnu membranu te ju permeabiliziraju uzrokujući staničnu smrt (67–69).

Osim putem TNFR i drugih receptora smrti, nekroptoza može biti aktivirana i putem TLR3 (engl. Toll-like receptor 3) i TLR4 (engl. Toll-like receptor 4), te ZBP1 (slika 3.). TLR3 detektirajući dvolančanu RNA i TLR4 detektirajući lipopolisaharide patogena, induciraju nekroptozu aktivirajući RIPK3 preko proteina TRIF (engl. *TIR-domain-*

containing adapter-inducing interferon- β) (70). Treći način aktivacije RIPK3 uključuje njegovu interakciju sa ZBP1 (engl. *Z-DNA-binding protein 1*) koji detektira virusnu nukleinsku kiselinu Z konformacije (zNA) (71,72). Također, pokazano je da ZBP1 može biti aktiviran endogenom dvolančanim RNA nastalim od retroelemenata u epidermisu kože (73), te endogenim retrovirusima u upalnoj bolesti crijeva (engl. IBD, *inflammatory bowel disease*) (74), što je u oba slučaja rezultiralo nekroptozom. U sva tri puta inicijacije nekroptoze, RIPK1, TRIF, odnosno ZBP1, preko RHIM (engl. *RIP homotypic interaction motif*) domena hetero-oligomeriziraju s RIPK3 i tako tvore komplekse koji su važni za aktivaciju MLKL i egzekuciju nekroptoze (75). Nekroptoza sudjeluje u patofiziologiji bolesti mnogih organskih sustava, kao što su bolesti pluća, jetre, bubrega, mozga, gastrointestinalnog i kardiovaskularnog sustava, te maligne bolesti (76,77).



Slika 3. Signalni put nekroptoze. Pojednostavljeni shematski prikaz signalnog puta nekroptoze aktiviranog putem TNFR (engl. *tumor necrosis factor receptor*), TLR3, TLR4 (engl. *toll-like receptor*) ili infekcijom virusima. Svi signali koji induciraju nekroptozu dolaze do na kinaze RIPK3 (engl. *receptor-interacting protein kinase 3*), koja je aktivirana homotipskom interakcijom s RIPK1 (engl. *receptor-interacting protein kinase 1*) ili drugim proteinima koji sadrže RHIM domenu kao što su TRIF (engl. *TIR-domain-containing adaptor-inducing IFN β*) i ZBP1. Kada je aktivnost kaspaze-8 inhibirana, vezanje TNF-a na TNFR1 dovodi do fosforilacije i aktivacije RIPK1 koji se preko RHIM domene veže na RIPK3 formirajući proteinski kompleks (nekrosom). Aktivirani RIPK3 fosforilira MLKL (engl. *mixed-lineage kinase domain like*) koji oligomerizira te se premješta na staničnu membranu koju čini propusnom. U nekroptozi induciranoj preko TLR3 i TLR4, za aktivaciju RIPK3 potreban je TRIF. U prisutnosti virusne nukleinske kiseline Z

konformacije (zNA) za aktivaciju RIPK3 potreban je ZBP1 (engl. *Z-DNA binding protein*). Preuzeto i prilagođeno na temelju Águeda-Pinto i sur. 2021. (78).

Kako je nekroptoza tip regulirane nekroze, što znači da postoji određeni signalni put kojim je posredovana, određenim farmakološkim i genetičkim manipulacijama moguće je utjecati na njen ishod (57). Zahvaljujući istraživanjima koja uključuju manipulaciju signalnog puta nekroptoze, otkrivaju se mehanizmi koji su važni za nekroptozu, ali isto tako otvaraju se mogućnosti za inhibiciju nekroptoze kojom bi se potencijalno poboljšao ishod mnogih bolesti u koje se svrstavaju i bolesti živčanog sustava.

Nekroptoza sudjeluje u patofiziologiji brojnih bolesti živčanog sustava uključujući moždani udar, perinatalnu-neonatalnu hipoksiju-ishemiju, te neurodegenerativne bolesti poput Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti i multiple skleroze. U istom radu u kojem se prvi puta koristi riječ „nekroptoza“, pokazano je da administracija Nec-1, inhibitora RIPK1, smanjuje volumen ozljede u mišjem modelu ishemijskog moždanog udara (60). Brojna istraživanja potvrdila su prisutnost nekroptoze u ishemijskom moždanom udaru (79–81), a inhibicija nekroptoze dovela je do poboljšanja u ishodu bolesti na animalnim modelima (82,83). Aktivacija nekroptoze pokazana je u post mortem mozgovima pacijenata oboljelih od Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti te multiple skleroze (84–87). Nec-1 poboljšao je kognitivne deficite te smanjio poremećaje povezane s amiloidom- β i tau proteinom u mišjem modelu Alzheimerove bolesti (88). Genetska ablacija RIPK3 i MLKL, te farmakološka inhibicija RIPK1 u mišjem modelu Parkinsonove bolesti smanjila je degeneraciju dopaminergičkih neurona poboljšavajući motornu funkciju (85). Iako se za sada zna malo o uključenosti nekroptoze u perinatalnoj-neonatalnoj hipoksiji-ishemiji, nedavno istraživanje pokazalo je protektivni učinak Nec-1s u kombinaciji s hipotermijom u štakorskom modelu neonatalne hipoksije-ishemije koji se očitovao u smanjenju razine fosforiliranog MLKL te u smanjenju gubitka volumena mozga nakon ozljede (89).

2. Hipoteza

Egzogene živčane matične stanice smanjuju intenzitet i trajanje nekroptoze stanica živčanog sustava te tako pozitivno djeluju na stanično preživljenje nakon hipoksijskog oštećenja.

3. Ciljevi rada

3.1. Opći cilj

Cilj ove disertacije je istražiti aktivnost nekroptoze u stanicama živčanog sustava, u normoksijskim i hipoksijskim uvjetima, te utjecaj egzogenih živčanih matičnih stanica na smanjenje smrti stanica živčanog sustava uzrokovano nekroptozom nakon hipoksije.

3.2. Specifični ciljevi

1. Usporediti diferencijaciju živčanih matičnih stanica u uvjetima ambijentalne i tkivne normoksije (20 %, odnosno 5 % kisika) analizom biljega pojedinih staničnih tipova.
2. Usporediti intenzitet stanične smrti tijekom diferencijacije živčanih matičnih stanica te u *in vitro* kulturi nezrelih stanica živčanog sustava u uvjetima ambijentalne i tkivne normoksije (20 %, odnosno 5 % kisika).
3. Odrediti intenzitet stanične smrti te aktivnost nekroptoze u *in vitro* kulturi nezrelih stanica živčanog sustava izloženih hipoksiji (1 % kisika) te deprivaciji kisika i glukoze (OGD) - *in vitro* modelu hipoksije-ishemije.
4. Istražiti pretpostavljen utjecaj egzogenih živčanih matičnih stanica na smanjenje smrti nezrelih stanica živčanog sustava uzrokovano nekroptozom nakon deprivacije kisika i glukoze (OGD).
5. Usporediti utjecaj egzogeno dodanih živčanih matičnih stanica s učinkom kemijskog inhibitora nekroptoze (Necrostatin-1) na nekroptozu u *in vitro* kulturi nezrelih stanica živčanog sustava izloženih deprivaciji kisika i glukoze (OGD).

4. Materijali i metode

4.1. Postupci sa životinjama

Za potrebe dobivanja mišjih zametaka starih 14.5 dana, korištene su tri skotne ženke visokosrođene linije B6 Albino (B6N-*Tyr^{c-Brd}*/BrdCrCrI). Eksperimentalni postupci na laboratorijskim životinjama odobreni su od nadležnog Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Ur. Broj: 380-59-10106-17-100/27). Laboratorijske životinje uzgajane su u Nastambi za laboratorijske životinje (HRPOK-006), a eksperimentalni postupci odrađeni su u Laboratoriju za regenerativnu neuroznanost (HRPOK-006). U istraživanju se slijedila Direktiva 2010/63/EU, Zakon o zaštiti životinja RH (NN br. 102/2017), FELASA smjernice, te odluke, preporuke i postupci nadležnog Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

4.1.1. Parenje životinja i određivanje starosti zametaka

Kako bi dobili zametke odgovarajućeg stadija, tri ženke su stavljene u kavez s jednim mužjakom preko noći. Sljedeće jutro pregledana je rodnica sparenih ženki kako bi se utvrdila prisutnost sjemene tekućine u obliku vaginalnog čepa, što odgovara početku skotnosti. Nalaz vaginalnog čepa ujutro, budući da se miševi pare noću, označio je 0.5 dana razvoja zametka.

4.1.2. Žrtvovanje životinja i izolacija zametaka

Mišice skotne 14.5 dana žrtvovane su postupkom cervikalne dislokacije kojom se kod životinja izaziva trenutna smrt. Nakon žrtvovanja, skotne ženke položene su na leđa, a područje oko abdomena očišćeno je 70 %-tnim etanolom. Trbušna šupljina je otvorena te su izolirani rogovi maternice sa zamecima koji su stavljeni u sterilnu Petrijevu posudicu napunjenu HBSS-om (Gibco, 14175095). Petrijeva posudica sa zamecima prenesena je u laminar u kojem su nastavljeni postupci u sterilnim uvjetima. Zameci su odvojeni od svojih ovojnica te žrtvovani dekapitacijom, što dovodi do trenutne smrti.

4.2. Postupci sa stanicama

4.2.1. Izolacija živčanih matičnih stanica i uzgoj neurosfera

Nakon dekapitacije zametaka, izolirani su telencefaloni koji su stavljani u novu Petrijevu posudicu s čistim HBSS-om. Telencefaloni su zatim mehanički usitnjeni

škaricama. Odstranjen je višak HBSS-a, a komadići tkiva prebačeni su u sterilnu Falcon epruvetu od 50 ml (Corning™,352070) u koju je dodano 1 ml akutaze (StemPro®Accutase® Cell Dissociation Reagent, Gibco by life Technologies, A11105-01) po jednom telencefalonu. Uz pomoć akutaze tkivo se proteolitički razgrađuje čime se pospješuje oslobađanje pojedinačnih stanica. Usitnjeno tkivo inkubirano je u akutazi 20 min u vodnoj kupelji na 37 °C. Tijekom tih 20 minuta, tkivo je u dva navrata 10-ak puta nježno provučeno kroz nastavak pipete od 1 ml kako bi se pospješilo odvajanje stanica. Nakon 20 minuta inkubacije, kako bi se neutraliziralo djelovanje akutaze, suspenzija stanica prebačena je u novu epruvetu u kojoj se nalazio kompletni medij za proliferaciju. Medij za proliferaciju sastojao se od medija DMEM/F12 + Glutamax (Gibco, 31331-093) s dodatkom: 1 % N2 Supplement 100 x (Gibco, 17502-048), 1 % Pen/Strep (Penicillin/Streptomycin, 5 000 U/ml, Gibco, 15070063), 2 % B27 Supplement 50 x (Gibco, 17502), 20 ng/ml EGF (Epidermal growth factor, Gibco, PMG8041), 10 ng/ml bFGF (fibroblast growth factor basic, Gibco, PMG0035) 5 mM HEPES (Sigma-Aldrich, H0887). Omjer akutaze i medija iznosio je najmanje 1:3, tj. 1 ml akutaze neutralizirano je s minimalno 3 ml medija. Kako bi se stanice odvojile iz otopine akutaze i medija, centrifugirane su na 200 g, 6 min. Nakon centrifugiranja, supernatant je otklonjen, a talog stanica resuspendiran je u 1 ml kompletnog medija za proliferaciju uz pomoć pipete i nastavka od 1 ml. Stanice dobivene iz 2-3 telencefalona prebačene su u posudu za uzgoj stanica površine 75 cm² (T75, BD Falcon, 353110) u kojoj je bilo 12 ml kompletnog medija za proliferaciju. Stanice su tako uzgajane su u inkubatoru na 37 °C i 5 % CO₂ s vlagom od minimalno 90 %. Čimbenici rasta dodani su nakon 2 dana.

Diobom stanica, ali i spajanjem susjednih stanica u suspenziji nastale su neurosfere, tj. okruglaste nakupine živčanih matičnih stanica (90). Kada su neurosfere dosegnule promjer 150-200 µm, što odgovara 3-4 danu nakon izolacije, disocirane su uz pomoć akutaze. U ovoj fazi smo pažljivo pratili rast neurosfera, jer ukoliko neurosfere previše narastu, kisik i hranjive tvari iz medija ne mogu prodrijeti do stanica u unutrašnjosti neurosfera. To bi uzrokovalo umiranje stanica, što se pod mikroskopom može vidjeti kao tamniji dio u unutrašnjosti neurosfera. Kada su neurosfere dovoljno velike za disocijaciju, sadržaj iz posude za uzgoj stanica prebačen je u Falcon epruvetu od 50 ml i centrifugiran na 200 g, 1 min. Supernatant je odbačen, a na talog stanica dodan 1 ml akutaze za

neurosphere iz jedne posude za uzgoj stanica. Neurosphere u akutazi nježno su resuspendirane nekoliko puta pipetom s nastavkom od 1 ml kako bi se rabio talog, te je suspenzija inkubirana na 37 °C oko 8 min. Nakon 7-8 min, stanice su ponovno resuspendirane lagano 10-ak puta čime se dobila suspenzija pojedinačnih stanica. Dobivena suspenzija stanica prebačena je u kompletni medij za proliferaciju u omjeru akutaze i medija od minimalno 1:3, kao i kod izolacije stanica, kako bi se akutaza neutralizirala, nakon čega je slijedilo centrifugiranje na 200 g, 6 min. Supernatant je odbačen, a na talog stanica dodan 1 ml kompletnog medija za proliferaciju u kojemu su stanice nježno resuspendirane. Stanice su prebrojane uz pomoć Neubauerove komorice, te je po jednoj posudi za uzgoj stanica T75 nasađeno 600 000 stanica u 12 ml (50 000 stanica/ml). Tako nasađene stanice su u pasaži 1 (P1). Stanice u posudama za uzgoj stanica držane su u inkubatoru na 37 °C i 5 % CO₂ s vlagom od minimalno 90 % dva dana, kada su se stvorile male neurosphere koje su spremne za zamrzavanje.

4.2.2. Zamrzavanje živčanih matičnih stanica

Budući da postupkom izolacije dobivamo velik broj stanica koje ne trebamo istovremeno za pokuse, stanice su zamrznute. Zahvaljujući zamrzavanju žrtvovan je manji broj životinja te je također omogućena fleksibilnost pokusa jer stanice možemo odmrznuti kada god ih trebamo, što nije slučaj sa ženkama skotnim 14 dana. Stanice su bile zamrznute u pasaži 1 (P1). Nakon izolacije (P0), stanice su uzgajane u posudama za uzgoj stanica 3-4 dana kako bi stvorile sfere veličine 150-200 µm, a koje su zatim disocirane na pojedinačne stanice (P1). Dva dana nakon disocijacije, kada su se stvore male neurosphere (cca 50 µm), stanice su zamrznute. Sadržaj iz posuda za uzgoj stanica u kojem su male neurosphere prebačen je u Falcon epruvetu od 50 ml i centrifugiran na 200 g, 5 min. Supernatant je odbačen, a na talog je dodan medij za smrzavanje koji je prethodno pripremljen i držan na ledu. Medij za smrzavanje sastojao se od proliferacijskog medija s 20 % DMSO-a (D2650, Sigma-Aldrich) te duplo više B27 suplementa (4 %). DMSO je krioprotektant koji povećava poroznost staničnih membrana što omogućava slobodnije prolaženje vode, te također pomaže prevenirati formaciju kristalića vode (91). Pelet u kojem su male neurosphere lagano je resuspendiran uz pomoć pipete s nastavkom od 1 ml u mediju za smrzavanje, a sadržaj je prebačen u kriotube

(Thermo Scientific, Nunc, 368632). U jednoj kriotubi zamrznute su male neurosfere iz jedne flaske u koju je bilo nasađeno 600 000 stanica u 12 ml medija (50 000 stanica/ml) u jednom mililitru medija za smrzavanje. Kriotube su stavljene u konteiner za smrzavanje (Corning,CLS432004) koji je prethodno bio ohlađen na +4 °C, a konteiner zajedno sa stanicama u kriotubama prebačen je na -80 °C. Drugi dan, stanice su prebačene iz -80 °C u tekući dušik za dugotrajno skladištenje.

4.2.3. Odmrzavanje živčanih matičnih stanica i priprema za pokuse

Kriotuba sa stanicama organiziranim u obliku malih sfera u pasaži 1 (P1), uz pridržavanje svih sigurnosnih mjera, izvađena je iz tekućeg dušika i stavljena u vodenu kupelj na 37 °C kako bi se ubrzao proces otapanja i minimiziralo štetno djelovanje DMSO-a na stanice. Otapanje je trajalo otprilike 1 min, a odmah čim se otope, 1 ml stanica u mediju za zamrzavanje prebačeno je u 10 ml medija za proliferaciju te centrifugirano na 200 g, 5 min. Supernatant je odbačen, talog nježno resuspendiran u 1 ml medija za proliferaciju uz pomoć pipete i nastavka od 1 ml, te su stanice prebačene u ostalih 11 ml pripremljenog medija za proliferaciju ispuštanjem kap po kap neposredno iznad površine medija u epruvetu od 50 ml. Ukupno 12 ml medija u kojem su se nalazile odmrznute male neurosfere uz pomoć serološke pipete od 10 ml prebačeno je u posudu za uzgoj stanica T75, koja je stavljena u inkubator na 37 °C i 5 % CO₂ s vlagom od minimalno 90 % na 1-2 dana kada su sfere spremne za disocijaciju. Postupak disocijacije, tj. pasažiranja, isti je kao što je opisano u poglavlju 4.2.1. Dva dana nakon disocijacije stanicama u posudi za uzgoj stanica dodani su čimbenici rasta, a sfere veličine 150-200 µm, koje su narasle nakon 3-4 dana od prethodne disocijacije, spremne za novu disocijaciju. Za pokuse su korištene stanice između pasaža 2 i 4 (P2-P4).

4.2.4. Nasađivanje stanica za diferencijaciju

Za pokuse diferencijacije korištene su pojedinačne stanice P2-P4. Stanice su nasađene u sterilne pločice s bunarićima koji su prethodno presvučeni poly-D-lizinom (PDL, Sigma-Aldrich, P6407) i lamininom (Sigma-Aldrich, L2020). Za potrebu imunocitokemije, stanice su nasađene u pločice s 24 bunarića (Falcon, 351147) u koje su stavljena okrugla stakalca promjera 12 mm (Menzel, CB00120RA1). PDL je otopljen

u sterilnoj dvostruko destiliranoj (dd) vodi u koncentraciji 50 µg/ml, volumena dovoljnog da pokrije površinu, te je inkubiran preko noći. Drugi dan, PDL je ispran 3 x 10 min s dd vodom te je zatim dodan laminin u koncentraciji 10 µg/ml otopljen u DPBS-u (engl. *Dulbecco's phosphate-buffered saline*) bez Ca²⁺ i Mg²⁺ (Gibco, 14190144). Izmjena otopina izvršena je brzo kako ne bi došlo do sušenja površine. Laminin je inkubiran oko 2 h u inkubatoru na 37 °C. Nakon inkubacije, laminin je ispran s kompletnim medijem koji je aspiriran, te je u bunariće ponovno stavljen kompletni medij za nasađivanje nakon čega su pločice vraćene u inkubator na 37 °C do uporabe, a ne više od nekoliko sati. Kompletni medij za nasađivanje istog je sastava kao i medij za proliferaciju samo što u mediju za nasađivanju nema faktora rasta (EGF i bFGF), dodano je 1 % FBS-a (engl. *fetal bovine serum*, Gibco, 15070063) te je umjesto B27 suplementa korišten B27 plus suplement 50 x (Gibco, A3582801). Volumen kompletnog medija u pločicama spremnim za nasađivanje stanica iznosio je: za pločice s 6 bunarića (Falcon 353046) 2 ml, 24 bunarića 0.5 ml te 96 bunarića (Falcon, 353072) 0.1 ml po bunariću. Prije nasađivanja, stanice su disocirane kako je opisano u poglavlju 4.2.1., prebrojane, te nasađene u pločice s 6, 24 ili 96 bunarića u volumenu od 2 ml, 0.5 ml ili 0.1 ml, prilikom čega je ukupan volumen medija u pločici s 6 bunarića bio 4 ml, 24 bunarića 1 ml te 96 bunarića 0.2 ml. Broj stanica po bunariću pločice od 6 bunarića iznosio je 700 000 – 1 000 000, 24 bunarića 60 000 – 70 000, te 96 bunarića 10 000 – 20 000. Stanice su stavljene u inkubator na 37 °C i 5 % CO₂ s vlagom od minimalno 90 %. Svakih 3-4 dana diferencijacije, stanicama je pola medija zamijenjeno s medijem istog sastava kao i za nasađivanje samo je umjesto DMEM/F12 (1:1)(1x) + Glutamax korišten Neurobasal CST (Gibco, A13712-01).

4.2.5. Izlaganje nezrelih stanica živčanog sustava hipoksiji, odnosno deprivaciji kisika i glukoze (OGD) - *in vitro* modelu hipoksije-ishemije

Stanice živčanog sustava koje su nastale diferencijacijom ŽMS tijekom 8 dana, izložene su hipoksiji (1 % O₂), odnosno deprivaciji kisika i glukoze (OGD) – *in vitro* modelu hipoksije-ishemije. Stanicama koje su rasle u pločicama sa 6 bunarića izvađen je medij u kojemu su rasle te je stavljeno 2 ml medija bez glukoze (DMEM, no glucose, Gibco, 11966025), odnosno 2 ml kompletnog Neurobasala sa suplementima za stanice koje su izložene samo hipoksiji, te također za one koje su služile kao kontrola. Stanice su zatim

stavljene u inkubator u kojemu je razina kisika održavana na 1 % na 24 h, dok su kontrolne stanice držane u inkubatoru u kojemu je bila ambijentalna razina kisika. Mjereno sensorima inkubatora, razina kisika se kretala između 18 i 20 %. Nakon hipoksijske ozljede, odstranjen je medij, na stanice je stavljeno 3 ml kompletnog Neurobasala sa suplementima, te je isto napravljeno s kontrolnim stanicama. Razlog zašto su stanice u reoksigenaciji bile u 3 ml medija su inserti (Merck Millipore, PICM03050) koji su korišteni za ko-kultivaciju ŽMS sa ozlijeđenim nezrelim stanicama živčanog sustava, a koju su zahtijevali da u samom bunariću prije dodavanja inserta bude minimalno 1.5 ml medija, te da se na bunarić doda još minimalno 1.5 ml što je ukupno 3 ml. Zbog navedenog razloga volumen od 3 ml korišten je za sve stanice u reoksigenaciji bez obzira na to je li na njima bio insert. Za stanice koje su rasle u pločicama s 24 bunarića, tretman je bio isti, a volumen medija u hipoksiji, odnosno deprivaciji kisika i glukoze (*in vitro* modelu hipoksije-ishemije), te reoksigenaciji iznosio je 0.5 ml.

4.2.6. Fiksacija stanica za imunocitokemiju

Prvi, četvrti i osmi dan diferencijacije, stanice na stakalcima u pločici s 24 bunarića, fiksirane su fiksativom volumena 500 µl po bunariću. Ovisno o karakteristikama antigena koji se detektira, stanice su fiksirane ili sa svježe pripremljenim 4 % paraformaldehidom (PFA) u PBS-u ili sa ledeno hladnim metanolom. Fiksacija je trajala 10 – 15 min nakon čega su stanice isprane 3 x 10 min s 500 µl PBS-a. Fiksacija s PFA bila je učinjena na sobnoj temperaturi, dok su pločice u kojima su stanice fiksirane metanolom cijelo vrijeme držane na ledu. Metanolom su fiksirane stanice koje na kojima je rađena imunocitokemija (ICC) na p-MLKL (*phospho Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein*) jer je pokazano da fiksacija s PFA daje nespecifični signal (92). Ukoliko stanice nisu korištene za imunocitokemiju isti dan, pločica je zatvorena parafilmom kako bi se smanjilo isparavanje vode, te spremljena na +4 °C do najviše tjedan dana.

4.2.7. Izolacija proteina iz stanica i mjerenje koncentracije proteina uz pomoć Bradford metode

Za izolaciju proteina korištene su stanice nasađene u pločice sa 6 bunarića. Pločica s bunarićima stavljena je na led, medij je aspiriran, stanice su isprane s 1 ml

hladnog PBS-a (+4 °C), te je u jedan bunarić dodano 130-150 µl RIPA pufera za lizu stanica (Millipore, 20-188) s proteinaznim (Roche, 11836170001) i fosfataznim (Roche 4906837001) inhibitorima. Stanice su sastrugane uz pomoć strugača za stanice (Falcon, 353086), te je lizat premješten u 1.5 ml tubicu (Thermo Scientific, 3451) koja je držana na ledu. Proteinski lizat soniciran je 10-15 s na 20-30 % jačine sonikatora (Qsonica CL188). Nakon soniciranja, stanični lizat je centrifugiran na 14 000 g, 10 min, na +4 °C. Nakon centrifugiranja, supernatant je pažljivo odvojen od taloga i spremljen na -20 °C do uporabe.

Za mjerenje koncentracije proteina korišten je Bradford reagens (Thermo Scientific, 1863028) prema uputama proizvođača. Apsorbancija je mjerena na uređaju GloMax® Explorer System na 600 nm.

4.2.8. Izolacija RNA iz stanica

Za izolaciju RNA iz stanica korišten je RNeasy kit (Qiagen, 74104). Stanicama u pločicama od 6 bunarića aspiriran je medij, na stanice je dodano 600 µl RLT pufera iz kita te su stanice sastrugane uz pomoć strugača za stanice. Lizat je premješten u 1.5 ml tubicu te prebačen na -80 °C. Kada je skupljen veći broj lizata, lizati s -80 °C naglo su otopljeni u vodnoj kupelji na 37 °C te je nastavljena izolacija RNA prema uputama proizvođača. Koncentracija RNA izmjerena je na spektrofotometru (Thermo Scientific, NanoDrop ND-1000).

4.3. Imunocitokemija

Fiksirane stanice permeabilizirane su 10 min s 500 µl otopine za permeabilizaciju (0.2 % Triton X-100 (Sigma Aldrich, T8787) u PBS-u), nakon čega su isprane 3 x po 10 min s PBS-om. Zatim je na stanice stavljeno 500 µl otopine za blokiranje sačinjene od 3 % kozjeg seruma (Thermo Fisher Scientific, 16210064) u PBS-u, koja je inkubirana na sobnoj temperaturi 1-3 h. Nakon blokiranja, stanicama je dodano 75 µl otopine primarnog protutijela u 3 % kozjeg seruma u PBS-u te su stavljene na +4 °C preko noći. Podrijetlo, ciljani protein, razrjeđenje, proizvođač i kataloški broj primarnih protutijela upotrijebljenih u ovom istraživanju navedeni su u tablici 1.

Idući su dan primarna protutijela isprana s PBS-om 3 x po 5-10 min. Na stanice je zatim stavljena pripremljena otopina sekundarnih protutijela u 3 %-tnom kozjem serumu u PBS-u te su stanice inkubirane dva sata na sobnoj temperaturi zaštićene od svjetla. Podrijetlo, ciljani protein, razrjeđenje, proizvođač i kataloški broj sekundarnih protutijela upotrijebljenih u ovom istraživanju navedena su u tablici 2. Nakon dva sata inkubacije, sekundarna protutijela su isprana s PBS-om 3 x po 5-10 min. Na stanice je zatim stavljena otopina DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole, Roche, 10236276001) boje u PBS-u u koncentraciji 0.1 µg/ml. Nakon deset minuta, DAPI je ispran, 3 x 5-10 min, te su stanice poklopljene medijem za poklapanje fluorescentnih preparata (*Dako Fluorescent Mounting Medium*, Agilent S3023). Poklopljeni preparati ostavljeni su da se osuše nekoliko sati na sobnoj temperaturi te su zatim spremljeni na +4 °C do mikroskopiranja na konfokalnom mikroskopu (Olympus, FV 3000). Obrada slika rađena je u ImageJ softveru (NIH, National Institutes of Health, SAD).

Tablica 1 . Primarna protutijela korištena za imunocitokemiju.

Podrijetlo	Ciljani protein	Razrijeđenje	Proizvođač	Kataloški broj
Miš	Nestin	1:200	Milipore	MAB353
	NF-H, NF-M, (<i>pan axonal</i>)	1:200	Biologend	837904
Pile	GFAP	1:1000	Abcam	ab4674
	MAP2	1:10 000	Abcam	ab5392
Kunić	SOX2	1:200	Cell Signallig	#23064S
	TUBB3	1:300	Biologend	802001
	p-MLKL	1:200	Abcam	ab196436

Tablica 2. Sekundarna protutijela korištena za imunocitokemiju.

Protutijelo	Razrjeđenje	Proizvođač	Kataloški broj
Alexa Fluor 488 koza anti - miš IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen	A28175
Alexa Fluor 546 koza anti - pile IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen	A-11040
Alexa Fluor 633 koza anti - kunić IgG (H+L)	1:500	Invitrogen	A-21070

4.4. Western blot

Proteinski lizati stanica pripremljeni kako je opisano u poglavlju 4.2.7., otopljeni su na ledu, te su pomiješani sa puferom za uzorke (NuPAGE™ LDS Sample Buffer, Invitrogen™, NP0007) i agensom za reduciranje disulfidnih veza (NuPAGE™ Sample Reducing Agent, Invitrogen™, NP0009) prema uputama proizvođača, te stavljeni u termalni blok (Eppendorf, ThermoMixer C) na 95 °C na 10 min uz vorteksiranje. Pripremljeni uzorci stavljeni su u jažice 12 %-tnog akrilamidnog gela (Bio-Rad, 1610185) koji je prethodno pripremljen prema uputama proizvođača te je u njega stavljen češljic za 15 jažica. Gel se sastojao od dijela za sabijanje proteina u kojem se nalazio češljic za 15 jažica, te dijela za razdjeljivanje proteina. Gel je stavljen u kadicu za vertikalnu elektroforezu (Bio-Rad). U kadicu za vertikalnu elektroforezu (Mini PROTEAN Tera Cell, Bio-Rad) stavljen je i pufer za razdjeljivanje proteina sastava: 3 g Trizma base (Sigma-Aldrich, T8524), 14.4 g Glicin (Sigma-Aldrich, G8898), 1 g natrijev dodecil sulfat (SDS, Sigma-Aldrich, L4390) u 1 l demineralizirane (demi) vode. Kada je aparatura postavljena, češljici su pažljivo izvađeni. U svaku od jažica stavljeno je 15 µl pripremljenog uzorka koji je sadržavao 7-10 µg proteina. Elektroforeza se u početku izvodila pri naponu 80 V 20 min dok uzorci nisu došli do gela za razdvajanje, te je nakon toga napon povećan na 100 V otprilike 70 min što predstavlja vrijeme potrebno da se proteinski uzorci razdvoje na gelu. Gelovi su zatim isprani u demi vodi te složeni u kutiju za prijenos na membranu zajedno s PVDF membranom (poliviniliden fluorid, Merck Millipore, IPVH15150) koja je

prethodno aktivirana u metanolu 30 s i isprana u demi vodi. Prijenos proteina s gela na membranu odvijao se u ledeno hladnom puferu za transfer sastava 3 g Trizma base, 14.4 g glicin, 0.2 l metanol i demi voda do 1 l. Prijenos se odvijao u kadici tijekom 60 min pri stalnom naponu od 30 V. Membrana je zatim isprana u demi vodi, te stavljena u otopinu za blokiranje sastava 5 % mlijeko smanjene masti (Sigma-Aldrich, 70166) u TBST-u (*tris-buffered saline* + 0.1 % Tween 20 (Sigma-Aldrich, P1379)). Nakon 1-2 h u otopini za blokiranje, membrane su kratko isprane u TBST-u (2 x po 5 min) te stavljene u otopinu s primarnim protutijelom sastava 5 % BSA (Sigma-Aldrich, A7906) u TBST-u, u kojoj su inkubirane na +4 °C preko noći uz lagano ljuhanje na klackalici. Drugi dan, primarno protutijelo isprano je 3 x 10 min s TBST-om, te je zatim na membranu stavljeno sekundarno protutijelo razrjeđenja 1: 200 000 ili 1: 400 000 te inkubirano 30 min na sobnoj temperaturi uz lagano ljuhanje. Sekundarno protutijelo isprano je 3 x 10 min s TBST-om nakon čega je slijedila vizualizacija proteina na membrani. Proteini su vizualizirani uz pomoć substrata za kemiluminiscenciju (Thermo Scientific, 34095) prema uputama proizvođača na uređaju ChemiDoc MP (Bio-Rad). Primarna i sekundarna protutijela korištena za western blot, razrjeđenja, proizvođač i kataloški broj navedeni su u tablicama 3 i 4.

Tablica 3. Primarna protutijela korištena za western blot.

Podrijetlo	Ciljani protein	Razrjeđenije	Proizvođač	Kataloški broj
Pile	GFAP	1:10 000	Abcam	ab4674
Kunić	SOX2	1:5000	Cell Signalling	#23064S
	TUBB3	1:5000	Biolegend	802001
	p-MLKL	1:40 000	Abcam	ab196436
Miš	β -Aktin	1:60 000	Sigma-Aldrich	M5441

Tablica 4. Sekundarna protutijela korištena za western blot.

Protutijelo	Razrjeđenje	Proizvođač	Kataloški broj
Kunić anti - miš IgG H&L (HRP)	1:200 000	Abcam	ab6728
Koza anti - pile IgG H&L (HRP)	1:200 000	Abcam	ab6877
Koza anti - kunić IgG H&L (HRP)	1:400 000	Abcam	ab6721

4.5. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

RNA je prepisana u cDNA pomoću komercijalno dostupnog kita High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, 4374966) prema uputama proizvođača, korištenjem uređaja Thermal Cycler (Applied Biosystems, 27020). Kombinacije proba i početnica (engl. assays) korištenih u ovom istraživanju prikazane su u tablici 5., dok je ekspresija gena analizirana s obzirom na 3 endogene kontrole *Rpl13a*, *GusB*, *Bact* (*TaqMan Gene Expression Assays*). Svi uzorci rađeni su u triplikatima sa 20 ng cDNA u ukupnom volumenu 20 μ l, a lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu napravljena je prema uputama proizvođača u uređaju 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). U navedenom volumenu od 20 μ l, 10 μ l činio je *TaqMan™ Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems™, 4369016), 1 μ l određene kombinacije proba i početnica, a ostatak je bila cDNA razrijeđena u vodi bez RNAza do željene koncentracije. Analiza ekspresije gena napravljena je na način da je od CT (*threshold cycle*) vrijednosti za određeni gen oduzet prosjek CT vrijednosti endogenih kontrola te je tako dobivena Δ CT vrijednost. Relativna ekspresija gena dobivena je pomoću formule $2^{-\Delta CT}$.

Tablica 5. Popis korištenih kombinacija proba i početnica (engl. assay) za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu.

Kombinacija proba i početnica (assay)	Kataloški broj
<i>Nestin</i>	Mm00450205_m1
<i>Pax6</i>	Mm00443081_m1
<i>Notch1</i>	Mm00435245_m1
<i>Gfap</i>	Mm01253033_m1
<i>S100b</i>	Mm00485897_m1
<i>Dcx</i>	Mm00438400_m1
<i>Map2</i>	Mm00485230_m1
<i>Mapt</i>	Mm00521988_m1
<i>Ripk1</i>	Mm00436354_m1
<i>Ripk3</i>	Mm00444947_m1
<i>Mkl1</i>	Mm01244222_m1
<i>Gusb</i>	Mm01197698_m1
<i>Actb</i>	Mm00607939_s1
<i>Rpl13a</i>	Mm05910660_g1

4.6. Određivanje intenziteta stanične smrti mjerenjem oslobađanja laktat dehidrogenaze

Laktat dehidrogenaza (LDH) je enzim neophodan za metabolizam glukoze. LDH se oslobađa prilikom stanične smrti popraćene gubitkom integriteta stanične membrane pa se iz tog razloga koncentracija LDH u mediju u kojem rastu stanice koristi kao pokazatelj stanične smrti (93). U ovom istraživanju korišten je LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay (Promega, J2380), a postupak je izvođen prema uputama proizvođača.

U prvom dijelu istraživanja u kojemu je uspoređivana diferencijacija ŽMS u ambijentalnoj (18-20 % O₂) i tkivnoj normoksiji (5 % O₂), na dane diferencijacije 1, 4 i 8 (D1, D4, D8), iz po tri bunarića pločice s 96 bunarića u kojemu su rasle stanice uzet je medij za mjerenje oslobođene LDH. Također, za dobivanje ukupne LDH u stanicama u tri bunarića stavljeno je 4 µl 10 % Triton X-100 na volumen medija 400 µl, a nakon resuspendiranja i 15 min inkubacije uzet je medij. Na temelju ukupne i oslobođene LDH izračunat je postotak oslobođene LDH koji je dao uvid u intenzitet stanične smrti stanica diferenciranih u ambijentalnoj odnosno tkivnoj normoksiji.

U drugom dijelu istraživanja u kojemu je mjereno oslobađanje LDH tijekom hipoksije odnosno deprivacije kisika i glukoze (OGD), uzet je medij na početku prije ozljede, odnosno prije reoksigenacije što je služilo kao početna točka, te na kraju nakon ozljede odnosno 24 h reoksigenacije na temelju čega je izračunata koncentracija oslobođene LDH tijekom same ozljede odnosno tijekom reoksigenacije.

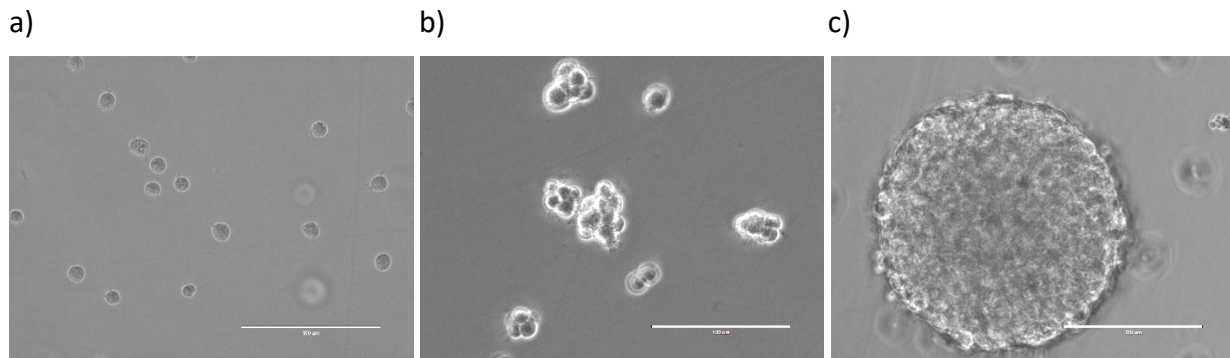
4.7. Statistička obrada rezultata

Za rezultate na kojima je rađena statistička obrada pokusi su ponovljeni najmanje 3 puta. Kako su uvijek bila uspoređivana dva uvjeta, pod pretpostavkom normalne distribucije podataka, korišten je Studentov T- test. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). Značajnima su smatrane vrijednosti $p < 0.05$. U svakom od poglavlja u rezultatima u kojem je korištena statistička analiza navedeni su i detalji tih analiza. Statistička analiza i grafički prikaz rađeni su u programu GraphPad Prism verzija 9.4.1. (681) za Windows operativni sustav (GraphPad Software, San Diego, California, SAD).

5. Rezultati

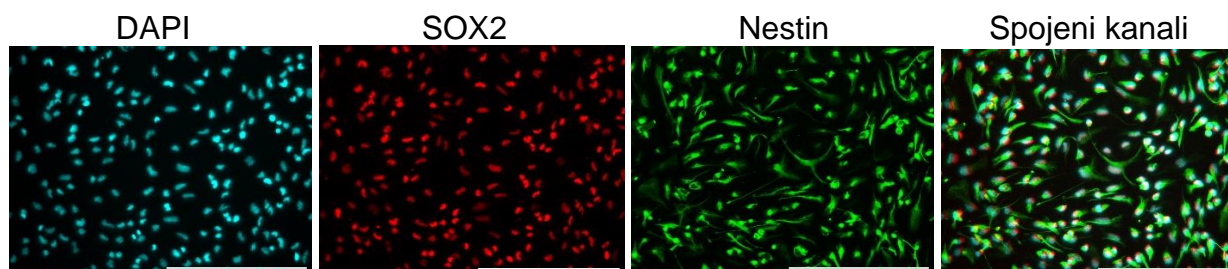
5.1. Potvrda identiteta živčanih matičnih stanica biljezima Nestin i SOX2

Živčane matične stanice (ŽMS) izolirane i uzgojene kako je opisano u poglavlju o materijalima i metodama rastle su u suspenziji, a dijeleći se stvarale su kuglaste nakupine (neurosfera). Kada je promjer neurosfera dosegnuo oko 150-200 μm , ponovno su disocirane na pojedinačne stanice (slika 4.). Pojedinačne stanice nasađene su ili za daljnju pasažu za uzgoj novih ŽMS ili za diferencijaciju na površinama presvučenim poli-D-lizinom i lamininom u mediju za diferencijaciju.



Slika 4. Prikaz rasta živčanih matičnih stanica (ŽMS) u kulturi. Pojedinačne ŽMS nastale disocijacijom tkiva mozga embrija miša starih 14.5 dana ili disocijacijom već uzgojenih neurosfera (a), dijeleći se stvaraju kuglaste nakupine - neurosfere. Nakon 2 dana u kulturi neurosfere su male (b), ali nakon 3-4 dana većina njih doseže promjer od oko 150-200 μm (c) kada se ponovno disociraju u pojedinačne stanice. Slikano na EVOS sustavu za slikanje stanica. Crta mjerila 100 μm .

Za potvrdu identiteta dobivenih stanica korištena je imunocitokemija (ICC) na Nestin i SOX2, biljege ŽMS. Pojedinačne stanice nasađene na stakalca presvučena poli-D-lizinom i lamininom u mediju za proliferaciju fiksirane su nakon jednog dana, a ICC analiza pokazala je da preko 95 % stanica eksprimira Nestin i SOX2 (slika 5.). Na taj je način, kombinacijom promatranja ponašanja stanica u kulturi i definiranim biljezima, potvrđen identitet stanica koje su korištene u ovom istraživanju.

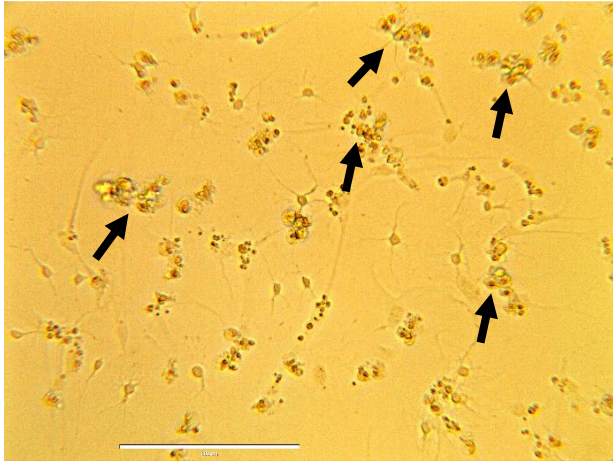


Slika 5. Uzgojene stanice ekspimiraju Nestin (zeleno) i SOX2 (crveno), biljege živčanih matičnih stanica. DAPI prikazuje jezgre. Slikano na EVOS sustavu za slikanje stanica. Crta mjerila 200 μm .

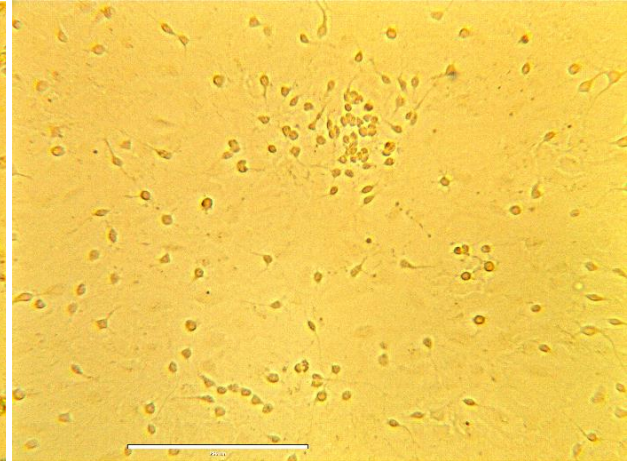
5.2. Usporedba nekoliko načina diferencijacije živčanih matičnih stanica je pokazala kako je za zadovoljavajuće preživljenje stanica potreban fetalni goveđi serum

Prvobitni plan je bio diferencirati živčane matične stanice (ŽMS) u mediju koji je po sastavu isti kao i onaj za uzgoj stanica osim što ne sadrži čimbenike rasta EGF i bFGF. To je protokol koji smo redovito koristili kod raznih prijašnjih analiza (94). Ipak, brojni pokusi u kojima smo se držali tog protokola su nam pokazali kako takav način diferencijacije dovodi do odumiranja značajnog broja stanica (slika 6.). Kako je naš cilj bio diferencirati ŽMS te ih 8. dana diferencijacije izložiti hipoksiji s ciljem izazivanja stanične smrti po tipu nekroptoze, prekomjeren gubitak stanica tijekom same diferencijacije u normalnim uvjetima bi nam značajno otežao usporedbu intenziteta stanične smrti u testiranim uvjetima. Stoga smo testirali nekoliko različitih protokola s ciljem poboljšanja stupnja preživljenja stanica. To je uključivalo medij koji sadrži samo suplement N2, samo suplement B27 plus, oba suplementa, fetalni goveđi serum (FBS) te nasađivanje malih sfera u usporedbi s pojedinačnim stanicama. Usporedba nekoliko različitih varijanta protokola nam je pokazala kako najbolji stupanj preživljenja dobivamo dodavanjem 1 % FBS-a u medij za diferencijaciju. Puni sastav korištenog medija za diferencijaciju kao i način nasađivanja stanica opisano je u poglavlju o materijalima i metodama. Slika 6. pokazuje utjecaj FBS-a na značajno smanjenje stanične smrti tijekom diferencijacije. Također, imunocitokemijom je potvrđen pozitivan učinak FBS-a na preživljenje i morfologiju stanica 4 i 8 dan diferencijacije (slika 7. i 8.)

a)

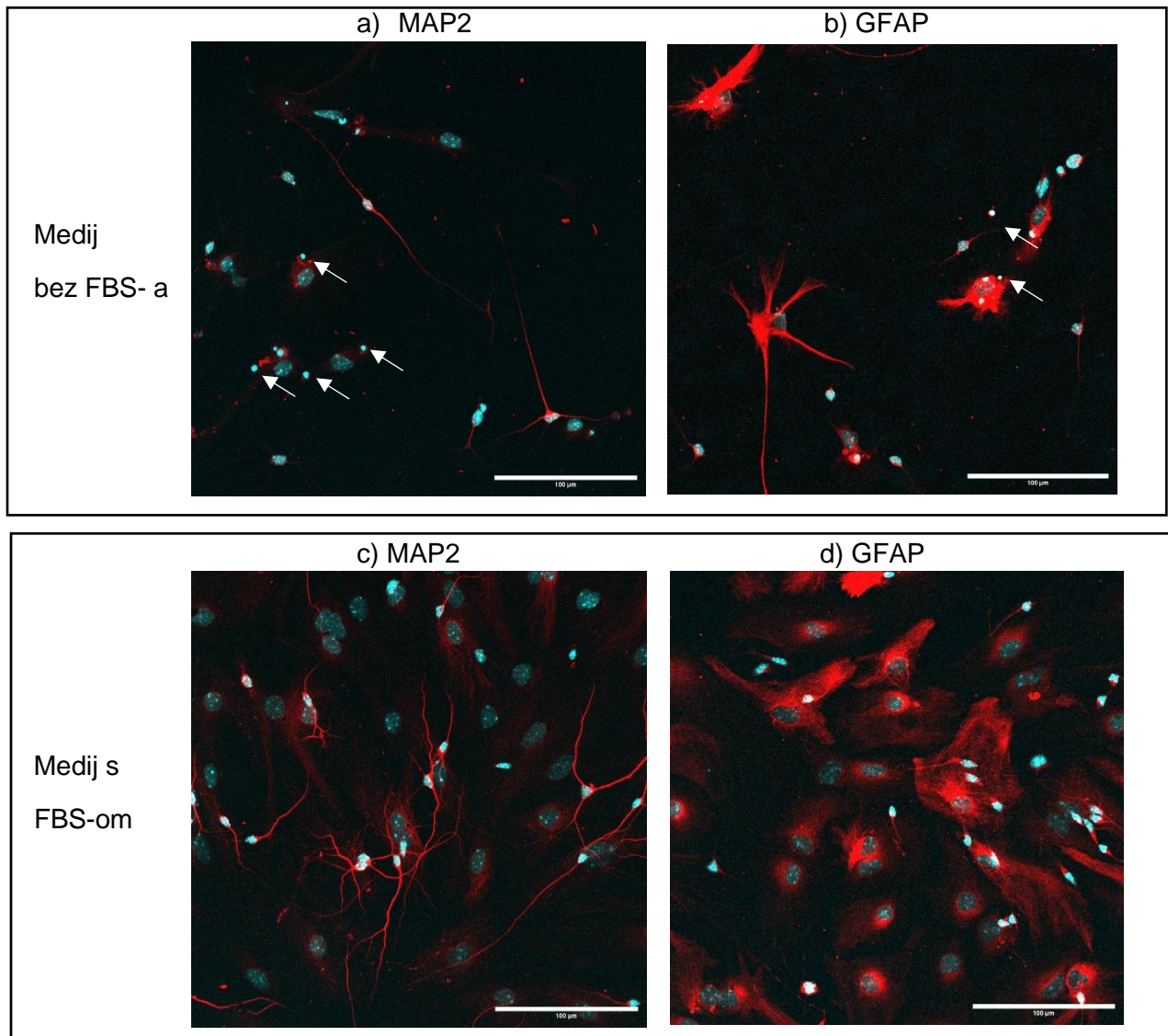


b)



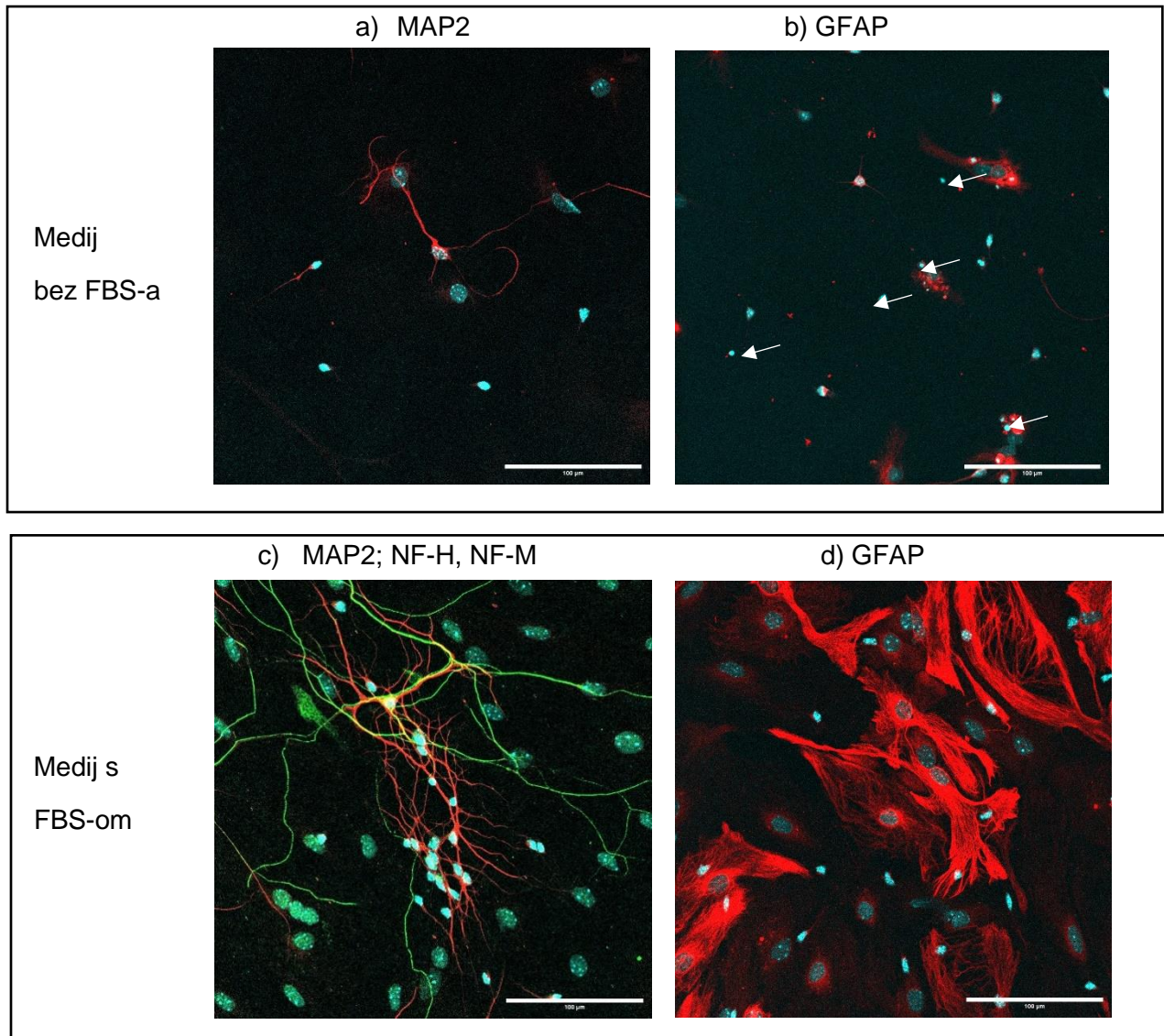
Slika 6. Izgled stanica treći dan diferencijacije u mediju bez (a) i s (b) FBS-om. Diferencijacija u mediju bez FBS-a (a) nakon 3 dana diferencijacije rezultirala je velikim odumiranjem stanica, a velike nakupine ostataka odumrlih stanica bile su jasno vidljive (strelice). S druge strane, stanice koje su se diferencirale uz dodatak 1 % FBS-a (b) pokazale su znatno bolje preživljenje. Slikano na EVOS sustavu za slikanje stanica. Crtica mjerila 200 μm .

D4



Slika 7. Imunocitokemijska analiza živčanih matičnih stanica (ŽMS) četvrtog dana diferencijacije (D4) u mediju bez (a i b) i s FBS-om (c i d). Stanice diferencirane bez FBS-a su malobrojnije i jezgre su im često fragmentirane (strelice) (a, b). S druge strane, stanice diferencirane u mediju s FBS-om (c, d) su brojnije, s prirodnijom morfologijom, vidljivom u obliku razgranatijih nastavaka neurona (MAP2, a i c, crveno), te s pravilnijom morfologijom astrocita (GFAP, b i d, crveno). Plavo su prikazane DAPI obojane jezgre. Crta mjerila 100 μm.

D8



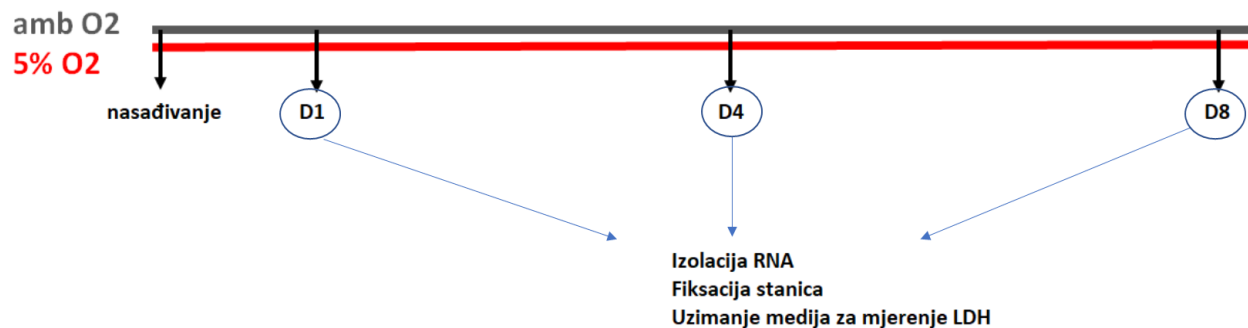
Slika 8. Imunocitokemijska analiza živčanih matičnih stanica (ŽMS) osmog dana diferencijacije (D8) u mediju bez (a i b) i s FBS-om (c i d). Kao i četvrti dan diferencijacije, stanice diferencirane bez FBS-a (a, b) su malobrojnije i imaju fragmentirane jezgre na koje pokazuju strelice. S druge strane, stanice diferencirane u mediju s FBS-om (c, d) su brojnije i pokazuju mnogo bolju morfologiju u vidu razgranatijih nastavaka neurona prikazanih uz pomoć anti-MAP2 (dendriti, a i c crveno) i anti-NF-H, NF-M, (aksoni, c, zeleno). Morfologija astrocita prikazana uz pomoć anti-GFAP protutijela (b i d, crveno) mnogo je pravilnija u mediju s FBS-om u usporedbi s medijem bez FBS-a gdje (kao i DAPI jezgre), signal izgleda fragmentirano što je dodatna potvrda pojačane stanične smrti. Plavo su DAPI obojane jezgre. Crta mjerila 100 μm.

Kako smo pokazali da je u našem slučaju dodavanje 1 % FBS-a nužno za visok stupanj preživljenja ŽMS tijekom diferencijacije, te za postizanje zadovoljavajuće

morfologije stanica, za sve pokuse koji su slijedili stanice su diferencirane u mediju s 1 % FBS-a.

5.3. Usporedba diferencijacije živčanih matičnih stanica u ambijentalnoj i tkivnoj normoksiji

U većini istraživanja koja se temelje na uzgoju stanica u inkubatorima se još uvijek koristi ambijentalna razina kisika od oko 20 %. Ipak, sve je više dokaza kako je takva koncentracija kisika, koja je nekoliko puta viša od razine kisika u živčanom tkivu čimbenik koji potencijalno negativno djeluje na brojna zbivanja u stanicama. Stoga je prvi cilj našeg istraživanja bio usporediti diferencijaciju živčanih matičnih stanica (ŽMS) u ambijentalnoj razini kisika (ambijentalna normoksija) s razinom kisika koja je bliže uvjetima u živom organizmu (tkivna normoksija, 5 % O₂). Ova dva uvjeta uzgoja, tj. stanične diferencijacije, uspoređena su promatranjem njihovog utjecaja na biljege pojedinih staničnih tipova te na intenzitet stanične smrti. ŽMS su nasađene u mediju za diferencijaciju te je jedna skupina stanica uzgajana u inkubatoru s ambijentalnom razinom kisika koja se, mjereno sensorima u našim inkubatorima, kretala između 18 i 20 % volumnog udjela u zraku, dok je druga skupina uzgajana u inkubatoru s 5 % volumnog udjela kisika u zraku. Kako je ovo istraživanje posvećeno zbivanjima u periodu od ranog do umjereno diferenciranog stadija u ciklusu nastanka stanica živčanog sustava, stanice su analizirane na dane 1, 4 i 8 (D1, D4, D8) diferencijacije u dva navedena uvjeta kisika. U navedenim danima izolirana je RNA za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu, uzeti su uzorci medija iz kojih je analizirano oslobađanje lakat dehidrogenaze (LDH) kao pokazatelja stanične smrti, te su stanice fiksirane kako bi se na tim stadijima napravila imunocitokemijska analiza (slika 9.).

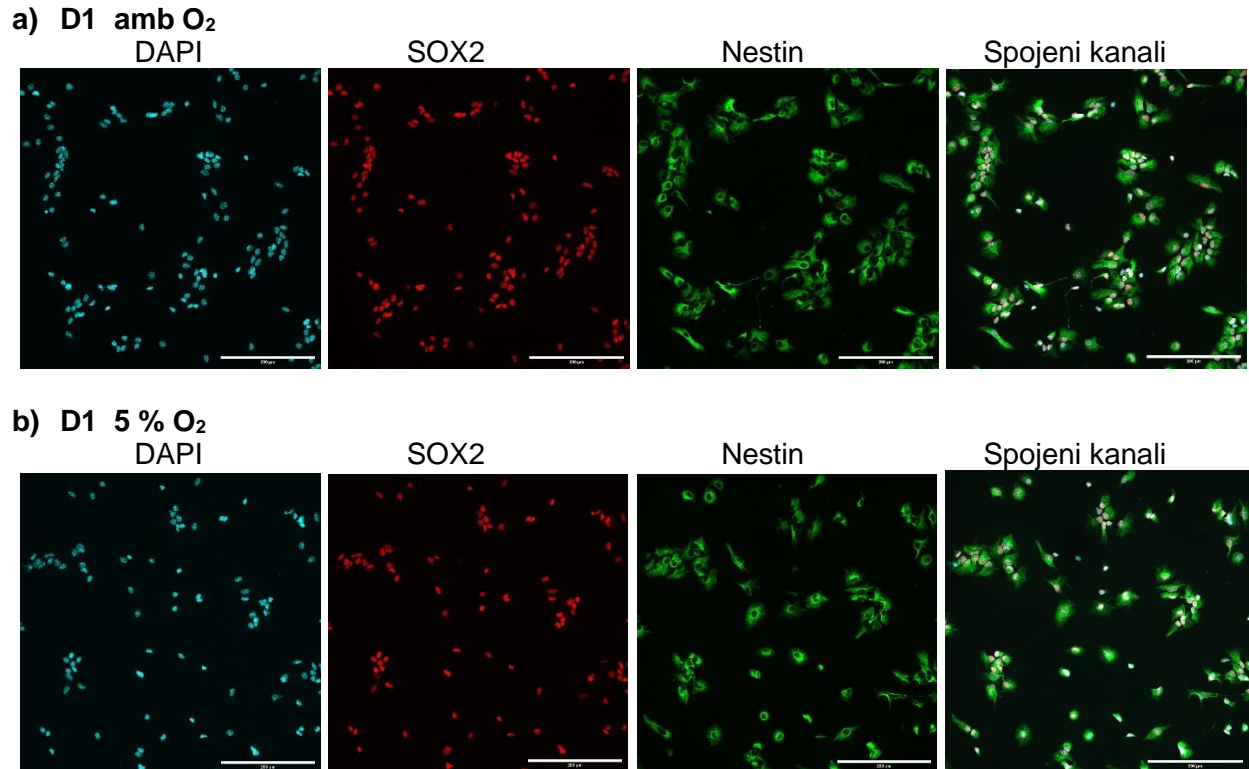


Slika 9. Shema pokusa te postupaka analize živčanih matičnih stanica diferenciranih u ambijentalnoj i tkivnoj (5 % O₂) normoksiji. Stanice su analizirane prvi (D1), četvrti (D4) i osmi dan (D8) diferencijacije.

5.3.1. Usporedba morfoloških osobina živčanih matičnih stanica u diferencijaciji u ambijentalnoj i tkivnoj normoksiji nije pokazala vidljive razlike

Za morfološku i molekularnu karakterizaciju stanica u diferencijaciji, ŽMS u diferencijaciji fiksirane su 4 %-tnim paraformaldehidom (PFA) na dane 1, 4 i 8 te je napravljena imunocitokemijska analiza na markere živčanih matičnih stanica (Nestin, SOX2), neurona (MAP2, TUBB3), te astrocita (GFAP). Molekularne razlike između stanica uzgajanih u ambijentalnom i 5 % kisiku kvantificirane su uz pomoć lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real-time PCR*) što je prikazano u idućem poglavlju (5.3.2.).

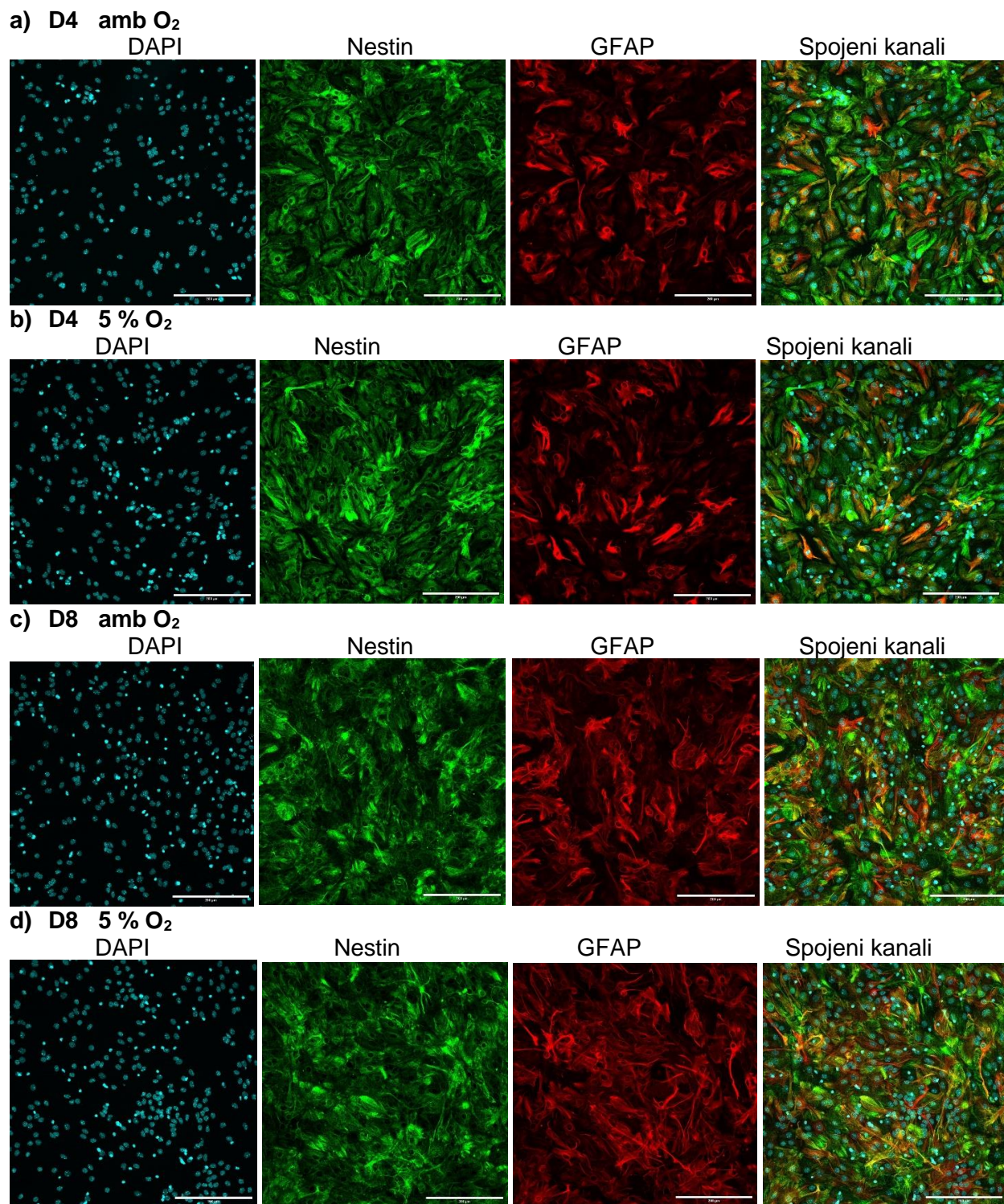
Prvi dan diferencijacije stanice u obje skupine izgledaju podjednako. Skoro sve stanice izražavaju biljege ŽMS (Nestin, SOX2) (slika 10.). SOX2 je transkripcijski faktor i lokaliziran je u jezgri dok je Nestin tip intermedijatnog neurofilamenta koji je lokaliziran u citoplazmi što je i prikazano na slici.



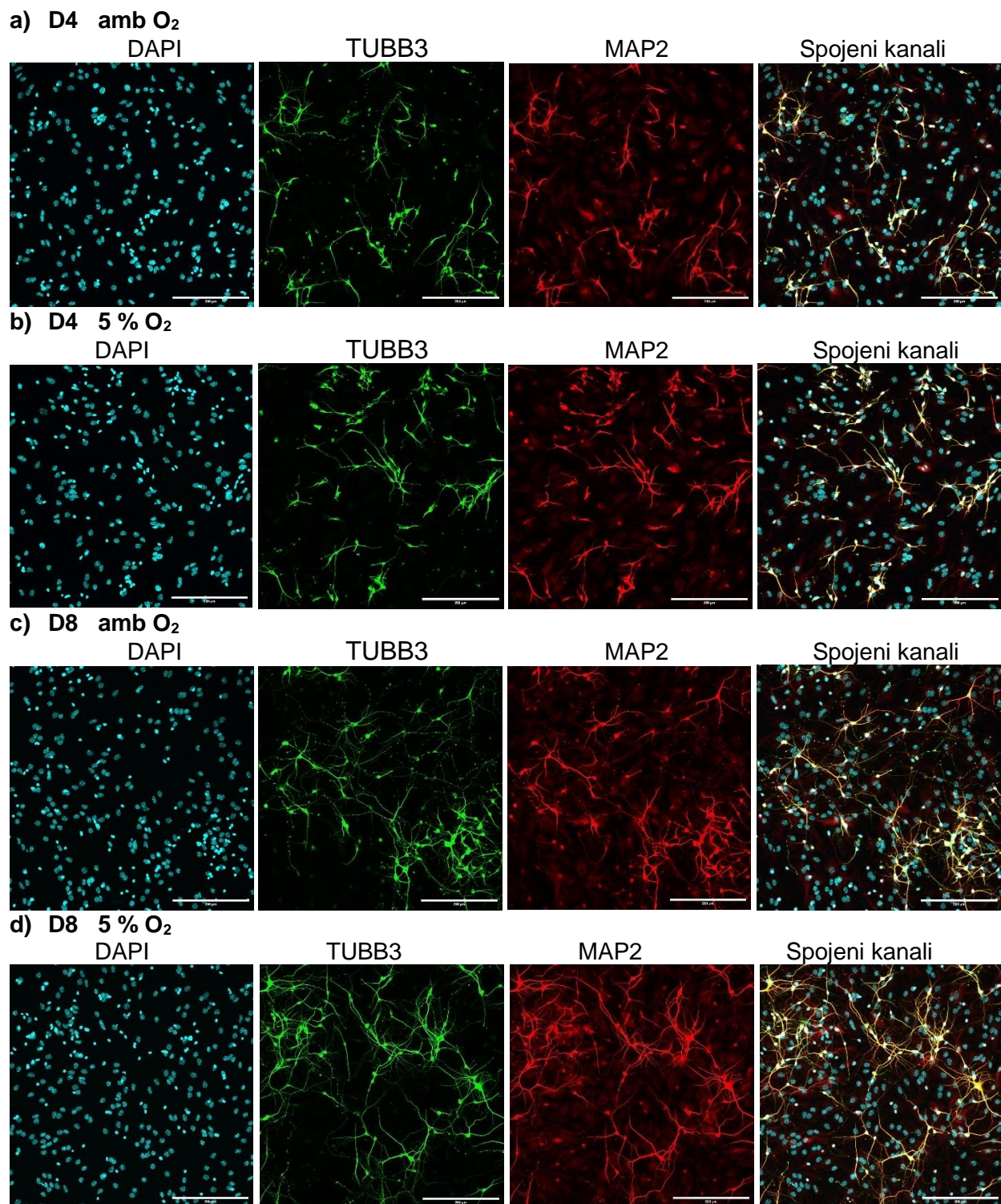
Slika 10. Imunocitokemijska analiza ŽMS prvi dan diferencijacije (D1). Stanice eksprimiraju SOX2 (crveno) i Nestin (zeleno), markere ŽMS. Plavo su prikazane DAPI obojane jezgre. Prikazana je reprezentativna slika od najmanje 3 ponovljena pokusa. Crta mjerila 200 μ m.

Kako diferencijacija napreduje, stanice se počinju izduživati te mijenjaju morfologiju. Četvrti dan diferencijacije (slika 11. a) prisutne su stanice koje eksprimiraju GFAP, marker astrocita, a osmi dan diferencijacije izražaj navedenog markera je još intenzivniji (slika 11. b). Također, četvrti dan diferencijacije (slika 12. a) prisutne su stanice s tipičnom morfologijom neurona. Te su stanice pozitivne na neuronalne biljege (MAP2, TUBB3). Osmi dan diferencijacije stanični nastavci neurona su još razvijeniji, tj. izduženiji (Slika 12. b). Iako s diferencijacijom izražaj markera astrocita (GFAP) i neurona (MAP2, TUBB3) postaje sve izraženiji, stanice koje eksprimiraju Nestin prisutne su cijelo vrijeme. Dakle, u populaciji stanica nakon 8 dana diferencijacije pronađene su stanice koje izražavaju markere astrocita (GFAP), neurona (MAP2, TUBB3), ali također još uvijek značajan broj stanica izražava biljeg ŽMS (Nestin).

Morfološka analiza i usporedba stanica uzgajanih u dvije različite razine kisika, u tri vremenske točke nije otkrila jasno vidljive razlike u izgledu stanica uzgajanih na ambijentalnoj (oko 20 %) i tkivnoj (5 %) razini kisika.



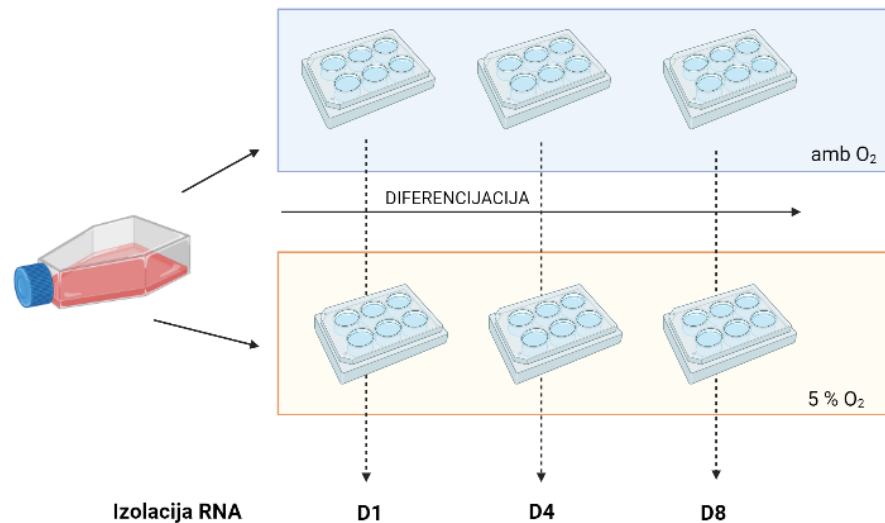
Slika 11. Imunocitokemijska analiza ŽMS četvrti (a, b, D4) i osmi (c, d, D8) dan diferencijacije na biljeg ŽMS (Nestin, zeleno), te biljeg astrocita (GFAP, crveno). Na D4 (a) stanice imaju izduženiju morfolgiju u odnosu na prvi dan (slika 10.). Neke od stanica ekspimiraju GFAP (crveno), a značajan broj stanica i dalje ekspimiraju Nestin (zeleno). Na D8 (c, d), u skladu s napretkom diferencijacije, izražaj biljega GFAP-a postaje intenzivniji u odnosu na D4. Prikazane su reprezentativne slike iz jednog od najmanje dva ponovljena pokusa. Crta mjerila 200 μm.



Slika 12. Imunocitokemijska analiza ŽMS četvrti (a, b, D4) i osmi (c,d, D8) dan diferencijacije na biljege neurona (TUBB3 - zeleno, MAP2 - crveno). Na D4 (a, b) postoje stanice koje ekspimiraju MAP2 i TUBB3, a na D8 (c, d), u skladu s napretkom diferencijacije, neuronalni nastavci prikazani navedenim biljezima postaju razvijeniji, tj. dulji. Prikazane su reprezentativne slike iz jednog od najmanje dva ponovljena pokusa. Crta mjerila 200 μ m.

5.3.2. Usporedba izražaja gena koji sudjeluju u određivanju smjera diferencijacije te nekroptozi u ambijentalnoj i tkivnoj normoksiji

Budući da morfološka analiza stanica diferenciranih u dvije različite koncentracije kisika nije pokazala jasno vidljive razlike, odlučili smo biljege diferencijacije analizirati na razini mRNA. Također, analizirali smo i neke od gena koji kodiraju proteine uključene u nekroptozu. Stoga je za usporedbu diferencijacije ŽMS u ambijentalnom i 5 % kisiku, metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real-time PCR*) analizirana ekspresija gena vezanih uz matičnost (*Nestin*, *Pax6*, *Notch1*), astrocite (*Gfap*, *S100b*), neurone (*Map2*, *Mapt*, *Dcx*) te nekroptozu (*Ripk1*, *Ripk3*, *Mkl1*). Izražaj svih gena analiziran je 1., 4., i 8. dan diferencijacije ŽMS (D1, D4, D8) (slika 13.).



Created in BioRender.com bito

Slika 13. Shematski prikaz dizajna pokusa za usporedbu diferencijacije ŽMS u ambijentalnom i 5 % kisiku. Populacija ŽMS nasađena je u 6 pločica, 3 pločice stavljene su u inkubator s ambijentalnom razinom kisika, dok su istovremeno preostale 3 pločice stavljene u inkubator s 5 % volumnog udjela kisika u zraku. Za izolaciju RNA uzeta je po jedna pločica iz svakog inkubatora, prvi (D1), četvrti (D4) te osmi dan (D8) diferencijacije. Kako se radi o stanicama nasađenima iz iste populacije, za statističku obradu podataka, pod pretpostavkom normalne distribucije, korišten je dvosmjerni Studentov T-test za parove.

5.3.2.1. Diferencijacija stanica u uvjetima tkivne normoksije povećava izražaj biljega matičnosti

Usporedba između ambijentalnog i 5 % kisika na prvi dan diferencijacije je pokazala da je *Nestin* bio pojačano eksprimiran u 5 % kisika, dok ostala dva analizirana gena, *Pax6* i *Notch1* nisu pokazali statistički značajnu razliku (slika 14. a). S druge strane, četvrti (D4) i osmi (D8) dan diferencijacije (slika 14. b i c), *Pax6* je jedini od analiziranih gena vezanih uz matičnost koji je pokazao statistički značajnu pojačanu ekspresiju u stanicama uzgajanima u 5 % kisiku.

5.3.2.2. Diferencijacija stanica u uvjetima tkivne normoksije povećava izražaj biljega neurona

Prvi (D1) i osmi (D8) dan diferencijacije (slika 15. a i c) ŽMS svi analizirani geni vezani uz neurone (*Map2*, *MapT*, *Dcx*) pokazali su pojačanu ekspresiju u stanicama uzgajanima u 5 % kisiku (slika 15.). Iako su i četvrti dan diferencijacije analizirani geni biljezi neurona pokazali tendenciju pojačane ekspresije u 5 % kisiku, statistički značajno povećanje imao je jedino *MapT* (slika 15. b).

5.3.2.3. Diferencijacija stanica u uvjetima tkivne normoksije povećava izražaj biljega astrocita

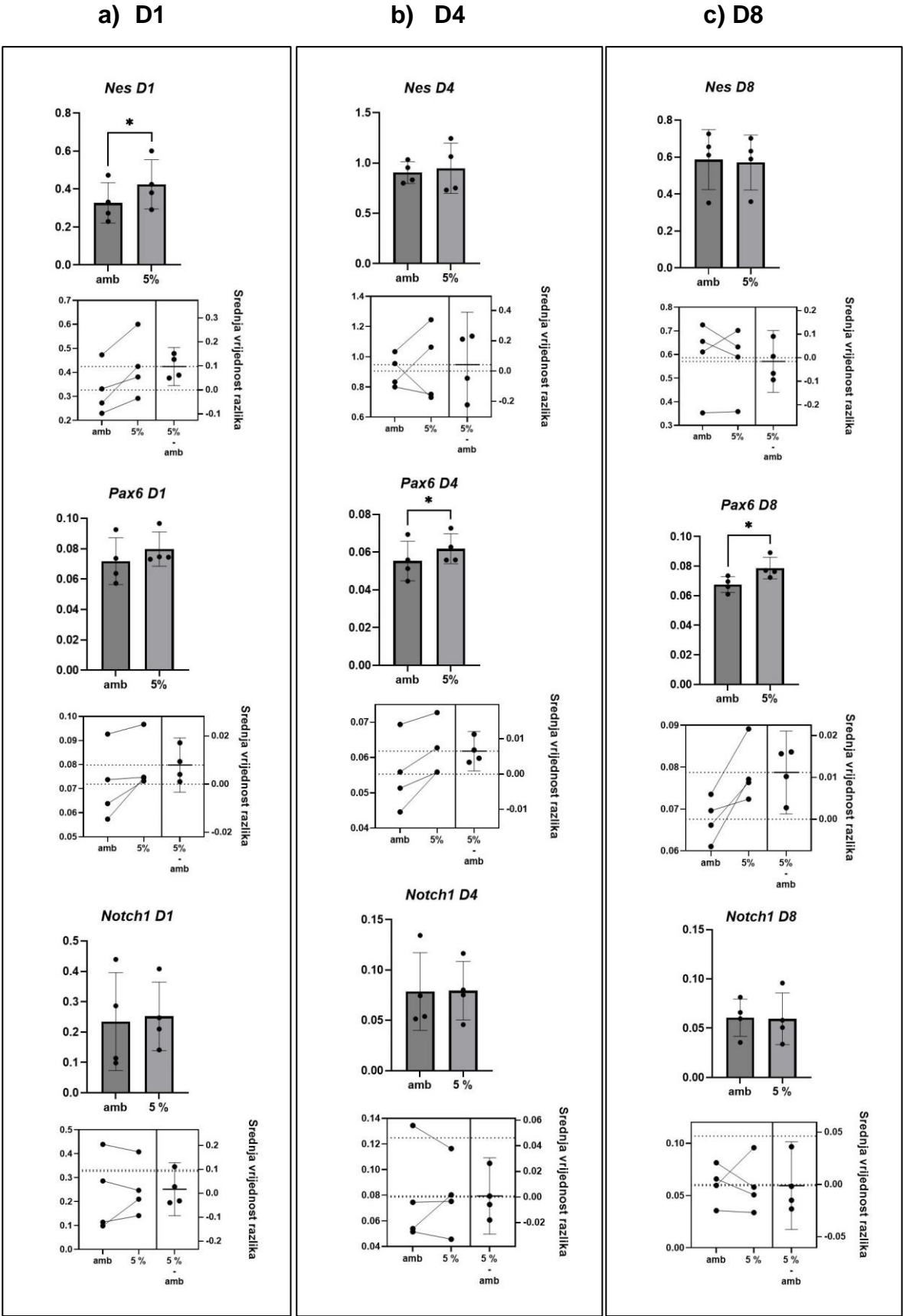
Prvi dan diferencijacije ŽMS (D1), jedino je *S100b* pokazao statistički značajnu pojačanu ekspresiju u 5 % kisiku, istovremeno *Gfap* je s p vrijednošću 0.0667 bio vrlo blizu postizanja statističke značajnosti (slika 16.). Četvrti dan diferencijacije (D4) oba su gena, *S100b* i *Gfap*, bili statistički značajno povećano eksprimirani u stanicama diferenciranim u 5 % kisiku. Osmi dan diferencijacije nije postignuta statistički značajna razlika u ekspresiji između dva promatrana uvjeta, iako je *S100b* pokazao tendenciju povećane ekspresije u 5 % kisiku s p vrijednošću 0.0531 (slika 16.).

5.3.2.4. U ranom stadiju diferencijacije stanica u uvjetima tkivne normoksije smanjen je izražaj gena *Mkl1*, biljega nekroptoze

Mkl1 je jedini od ukupno tri analizirana gena (*Ripk1*, *Ripk3*, *Mkl1*) vezanih uz nekroptozu koji je pokazao statistički značajnu razliku u obliku smanjenja ekspresije u

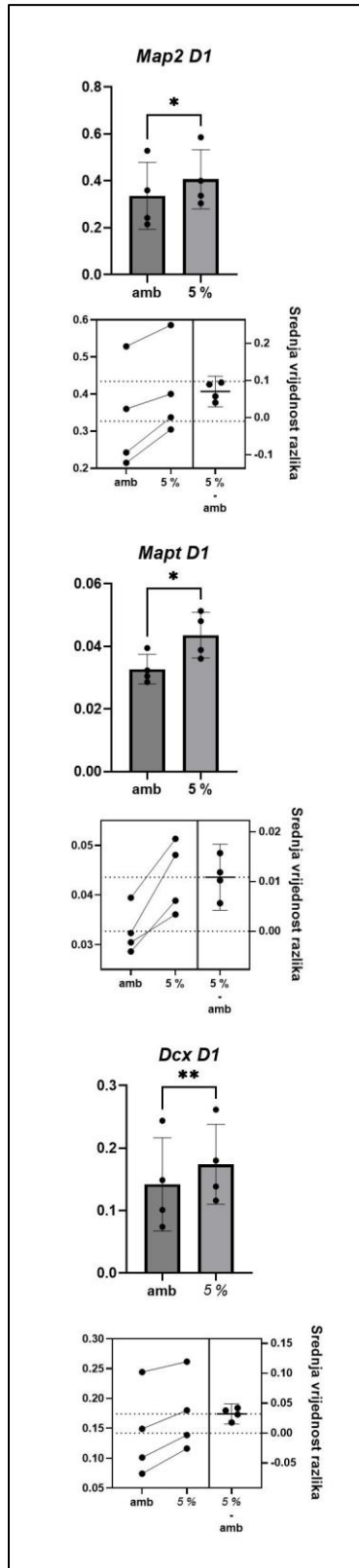
stanicama uzgajanima u 5 % kisika prvi dan diferencijacije (slika 17.). Četvrti, kao i osmi dan diferencijacije ekspresija niti jednog od tri analizirana gena vezana uz nekroptozu nije bila značajno različita u stanicama uzgajanima u ambijentalnom i 5 % kisiku.

Sumarizirano, diferencijacija ŽMS u 5 % kisika (tkivna normoksija) u usporedbi s uobičajenim ambijentalnim kisikom (ambijentalna normoksija) je pokazala kako su neki od gena koji određuju matičnost te smjer diferencijacije jače izraženi u nekim od promatranih vremenskih točki, dok je *Mkl1*, gen koji kodira protein koji je glavni efektor nekroptoze, manje izražen prvi dan diferencijacije na koncentraciji kisika od 5 %.

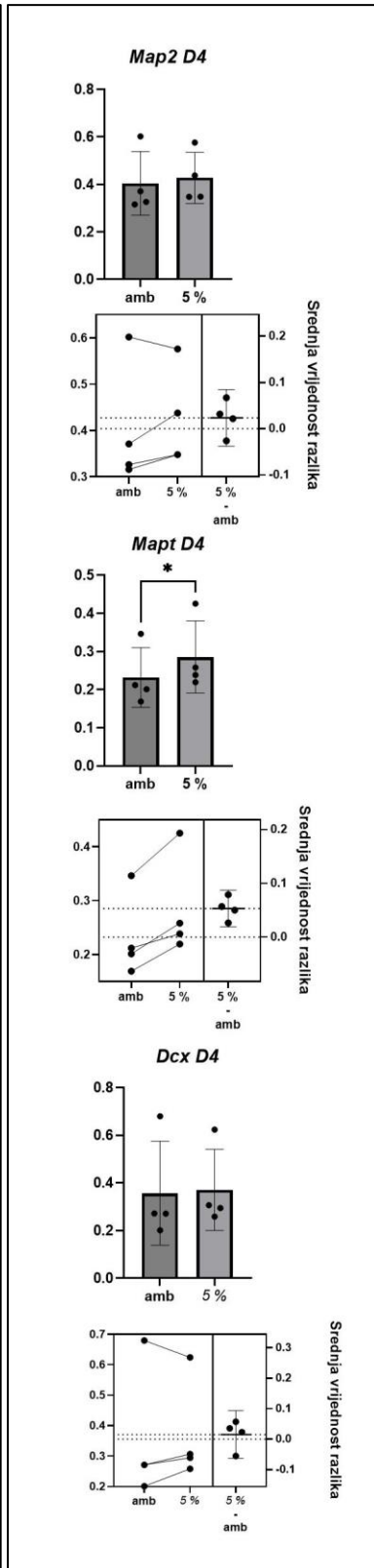


Slika 14. Relativni izražaj biljega ŽMS (*Nes*, *Pax6*, *Notch1*) stanica diferenciranih u ambijentalnom i 5 % kisiku prvi (a, D1), četvrti (b, D4) i osmi (c, D8) dan diferencijacije. Stupčasti grafikoni prikazuju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju. Ispod svakog grafikona nalazi se prikaz veličine efekta zajedno s intervalima pouzdanosti na kojemu je svaki analizirani par povezan crtama. Jedan par čine stanice koje dolaze od iste populacije stanica koje su nasađene u različite pločice s bunarićima, a jedina razlika je u tome što je jedna pločica bila u inkubatoru u ambijentalnom (amb), a druga u 5 % kisika. Kako se radi o parovima, pod pretpostavkom normalne distribucije, korišten je Studentov T-test za parove. Statistička značajnost smatrana je ukoliko je $p < 0.01$ (**) ili $p < 0.05$ (*).

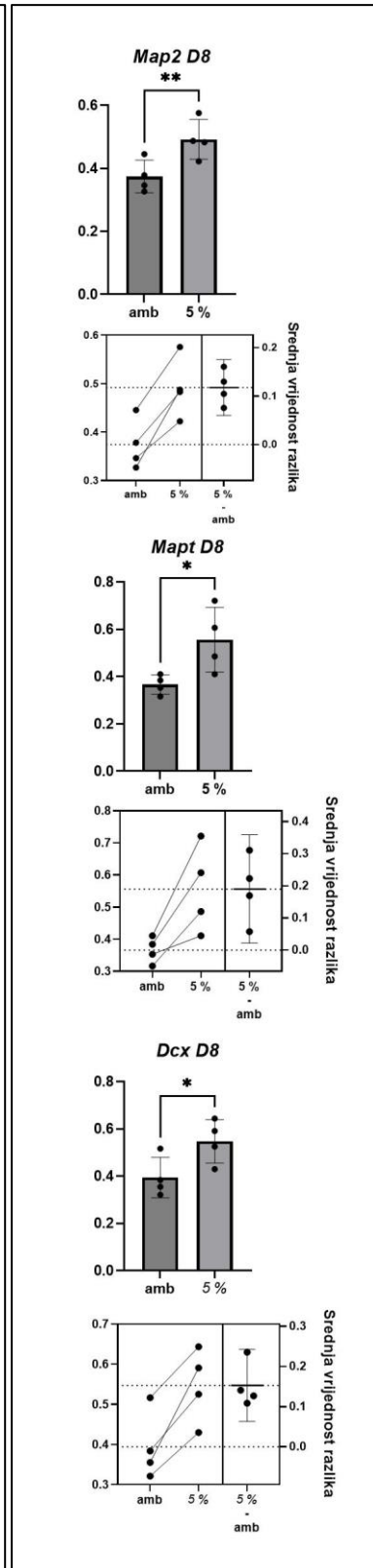
a) D1



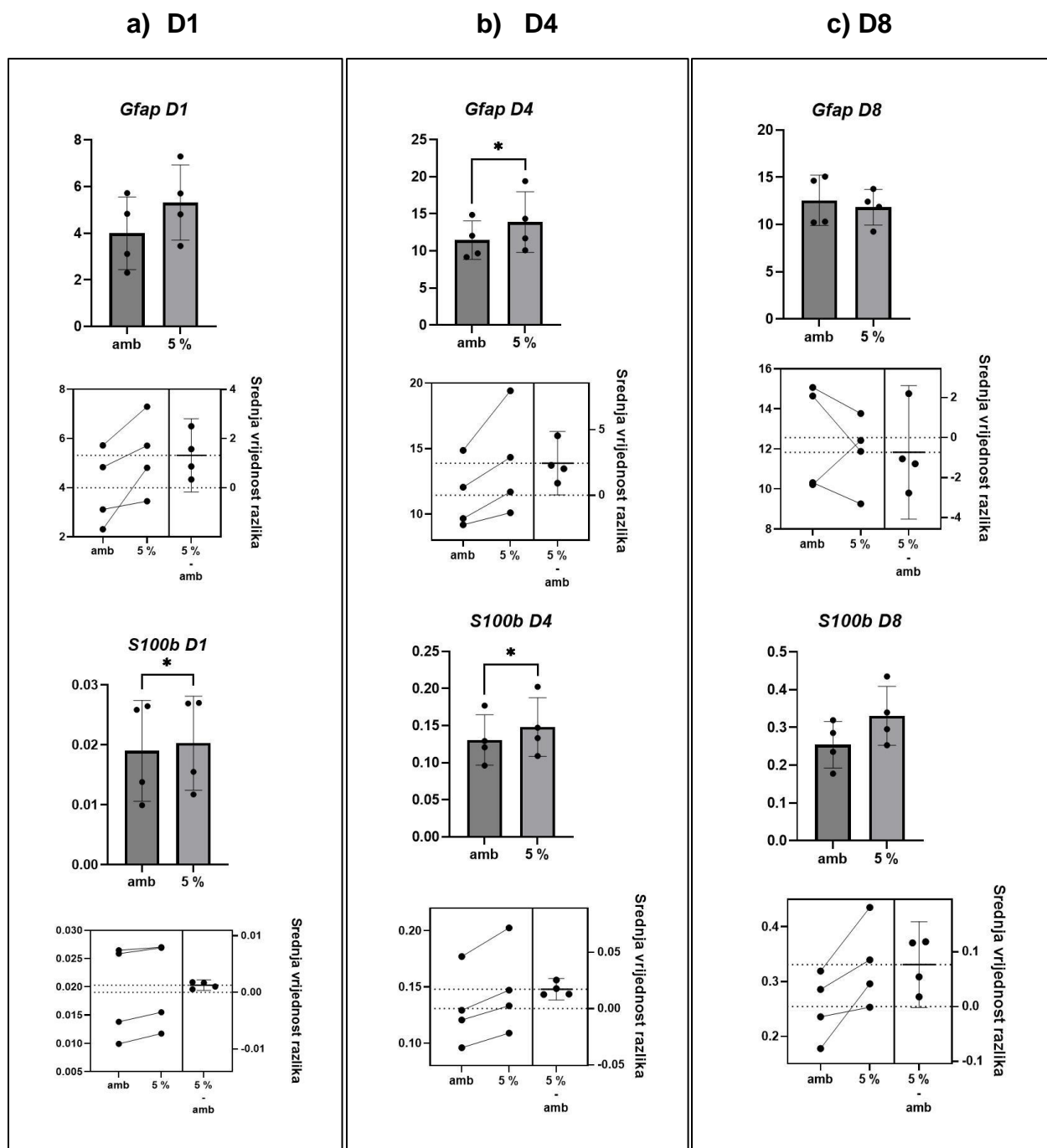
b) D4



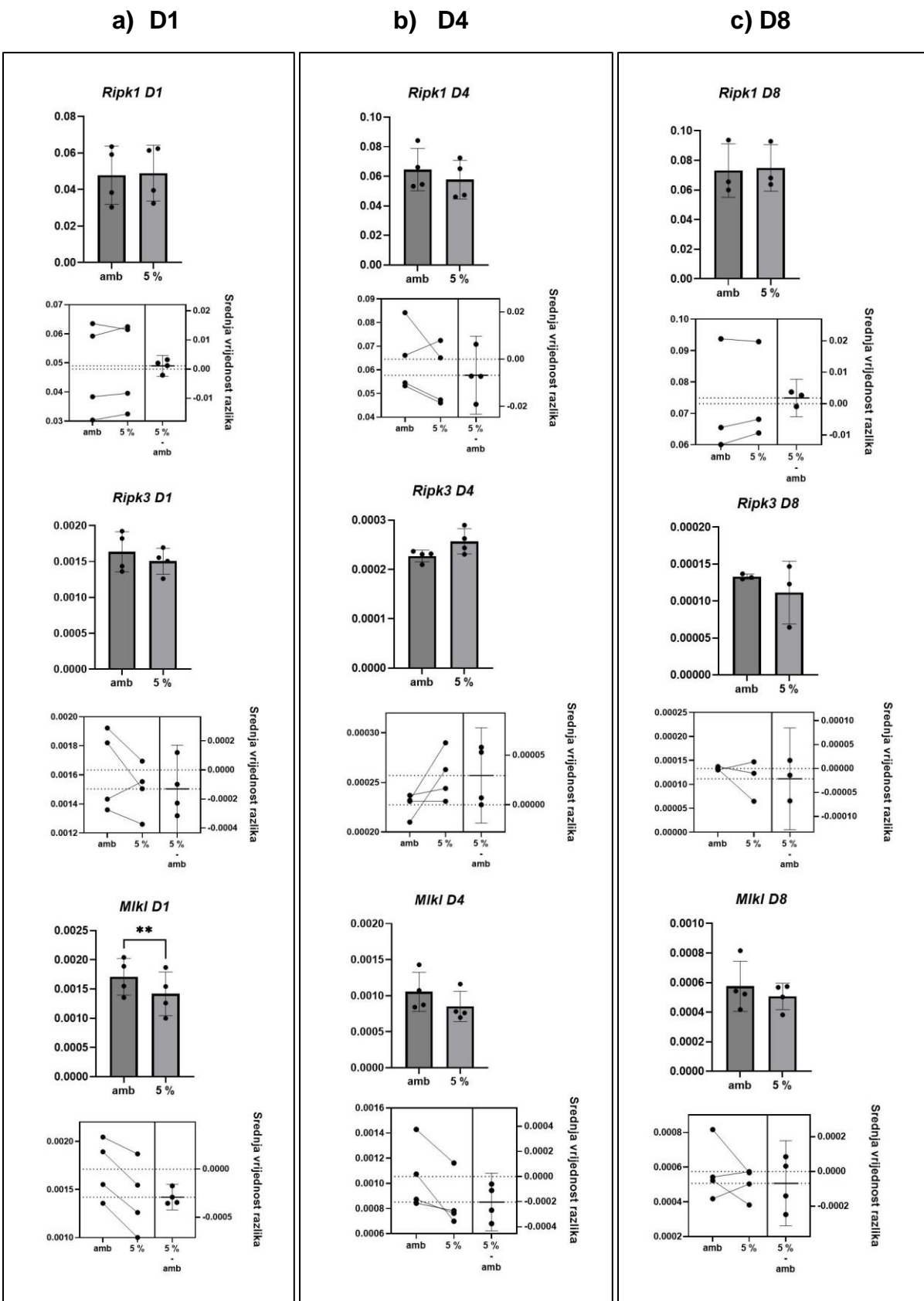
c) D8



Slika 15. Relativni izražaj biljega neurona (*Map2*, *Mapt*, *Dcx*) stanica diferenciranih u ambijentalnom i 5 % kisiku prvi (a, D1), četvrti (b, D4) i osmi (c, D8) dan diferencijacije. Stupčasti grafikoni prikazuju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju. Ispod svakog grafikona nalazi se prikaz veličine efekta zajedno s intervalima pouzdanosti na kojemu je svaki analizirani par povezan crtama. Jedan par čine stanice koje dolaze od iste populacije stanica koje su nasađene u različite pločice s bunarićima, a jedina razlika je u tome što je jedna pločica bila u inkubatoru u ambijentalnom (amb), a druga u 5 % kisika. Kako se radi o parovima, pod pretpostavkom normalne distribucije korišten je Studentov T-test za parove. Statistička značajnost smatrana je ukoliko je $p < 0.01$ (**), $p < 0.05$ (*).



Slika 16. Relativni izražaj biljega astrocita (*Gfap*, *S100b*) stanica diferenciranih u ambijentalnom i 5 % kisiku prvi (a, D1), četvrti (b, D4) i osmi (c, D8) dan diferencijacije. Stupčasti grafikoni prikazuju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju. Ispod svakog grafikona nalazi se prikaz veličine efekta zajedno s intervalima pouzdanosti na kojemu je svaki analizirani par povezan crtama. Jedan par čine stanice koje dolaze od iste populacije stanica koje su nasađene u različite pločice s bunarićima, a jedina razlika je u tome što je jedna pločica bila u inkubatoru u ambijentalnom (amb), a druga u 5 % kisika. Kako se radi o parovima, pod pretpostavkom normalne distribucije, korišten je Studentov T-test za parove. Statistička značajnost smatrana je ukoliko je $p < 0.01$ () ili $p < 0.05$ (*).**



Slika 17. Relativni izražaj biljega nekroptoze (*Ripk1*, *Ripk3*, *Mkl*) stanica diferenciranih u ambijentalnom i 5 % kisiku prvi (a, D1), četvrti (b, D4) i osmi (c, D8) dan diferencijacije. Stupčasti grafikoni prikazuju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju. Ispod svakog grafikona nalazi se prikaz veličine efekta zajedno s intervalima pouzdanosti na kojemu je svaki analizirani par povezan crtama. Jedan par čine stanice koje dolaze od iste populacije stanica koje su nasađene u različite pločice s bunarićima, a jedina razlika je u tome što je jedna pločica bila u inkubatoru u ambijentalnom (amb), a druga u 5 % kisika. Kako se radi o parovima, pod pretpostavkom normalne distribucije, korišten je Studentov T-test za parove. Statistička značajnost smatrana je ukoliko je $p < 0.01$ (**) ili $p < 0.05$ (*).

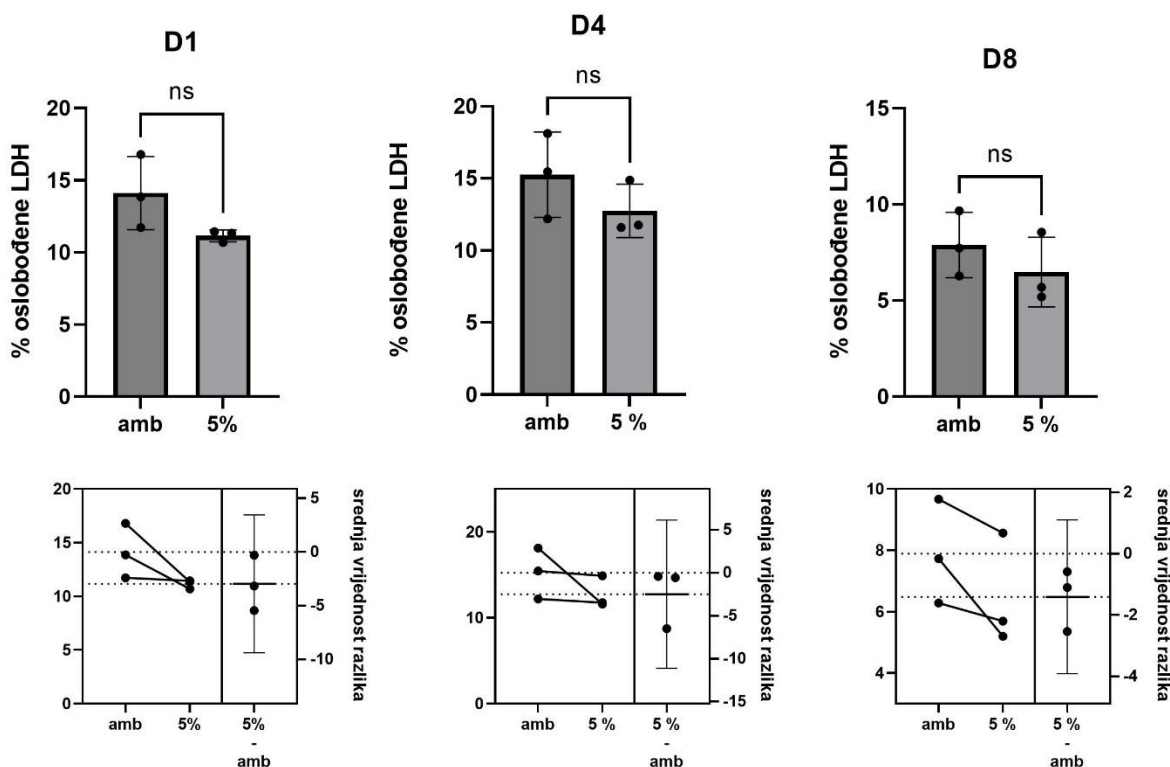
5.3.3. Mjerenje oslobođene laktat dehidrogenaze (LDH) kao pokazatelja stanične smrti u ambijentalnoj i tkivnoj normoksiji

Za usporedbu intenziteta smrti stanica diferenciranih u ambijentalnom i 5 % kisiku korišten je LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay (Promega, J2380) prema uputama proizvođača. U svakoj od 3 analizirane vremenske točke (D1, D4, D8) uzeta je mala količina medija (10 μ l) u kojemu su uzgajane stanice iz ukupno 3 bunarića pločice s 96 bunarića (tehničke replike) kako bi se izmjerila oslobođena LDH, a također 3 bunarića su tretirana s detergentom TritonX-100 prema uputama proizvođača kako bi se inducirala ruptura membrana svih stanica te tako izmjerila koncentracija ukupne LDH. Uzet je i medij u kojemu nisu uzgajane stanice, a koji je služio za oduzimanje LDH koja je prisutna u mediju i uglavnom dolazi iz FBS-a. Za mjeru stanične smrti izračunat je postotak oslobođene LDH s obzirom na ukupnu LDH dobivenu tretiranjem stanica s detergentom.

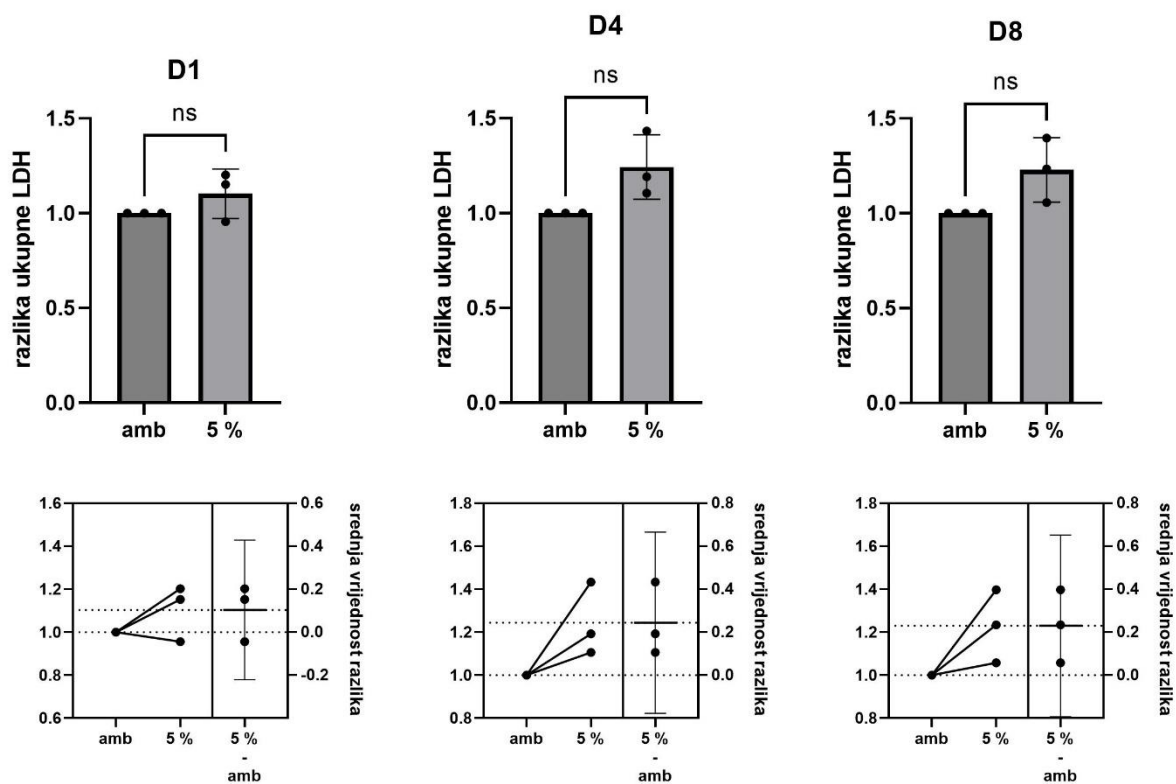
5.3.3.1. Diferencijacija živčanih matičnih stanica u ambijentalnoj i tkivnoj normoksiji nije pokazala značajne razlike u razini odumiranja stanica

Rezultati na slici 18. pokazuju da niti u jednom od analiziranih dana (D1, D4, D8) nije bilo statistički značajne razlike u postotku oslobođene LDH kao pokazatelju intenziteta stanične smrti u dva promatrana uvjeta. Iako nije bilo statistički značajne razlike, stanice uzgajane u 5 % kisiku pokazale su tendenciju smanjenja postotka oslobođene LDH u odnosu na stanice iz ambijentalnog kisika što je prikazano na slici 18. S druge strane, ako se uzme u obzir da je ukupna izmjerena LDH imala tendenciju povećanja u 5 % kisiku (slika 19.), treba biti oprezan sa zaključkom da tendencija smanjenja postotka oslobođene LDH u 5 % kisika znači i tendenciju smanjenja intenziteta stanične smrti.

Budući da uzgoj u 5 % kisika nije pokazao značajne prednosti u odnosu na ambijentalne uvijete, a budući da se prigodom izmjene medija stanice koje iz tkivne normoksije dolaze u ambijentalne uvjete izlažu fluktuacijama u razini kisika, što donosi značajnu ne-fiziološku varijablu, odlučili smo za daljnje pokuse u kojima smo proučavali staničnu smrt koristiti samo ambijentalnu razinu kisika.



Slika 18. Postotak oslobođene laktat dehidrogenaze (LDH) s obzirom na ukupnu LDH stanica uzgajanih u ambijentalnom (amb) i 5 % kisiku prvi (D1), četvrti (D4), i osmi (D8) dan diferencijacije ŽMS. Stupčasti grafikoni prikazuju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju. Ispod svakog grafikona nalazi se prikaz veličine efekta zajedno s intervalima pouzdanosti na kojemu je svaki analizirani par povezan crtama. Jedan par čine stanice koje dolaze od iste populacije stanica koje su nasađene u različite pločice s bunarićima, a jedina razlika je u tome što je jedna pločica bila u inkubatoru s ambijentalnim, a druga u 5 % kisika. Kako se radi o parovima, pod pretpostavkom normalne distribucije, korišten je Studentov T-test za parove. Statistička značajnost smatrana je ukoliko je $p < 0.05$ (*), a odsutnost statističke značajnosti prikazana je kao „ns“ (engl. *non-significant*).



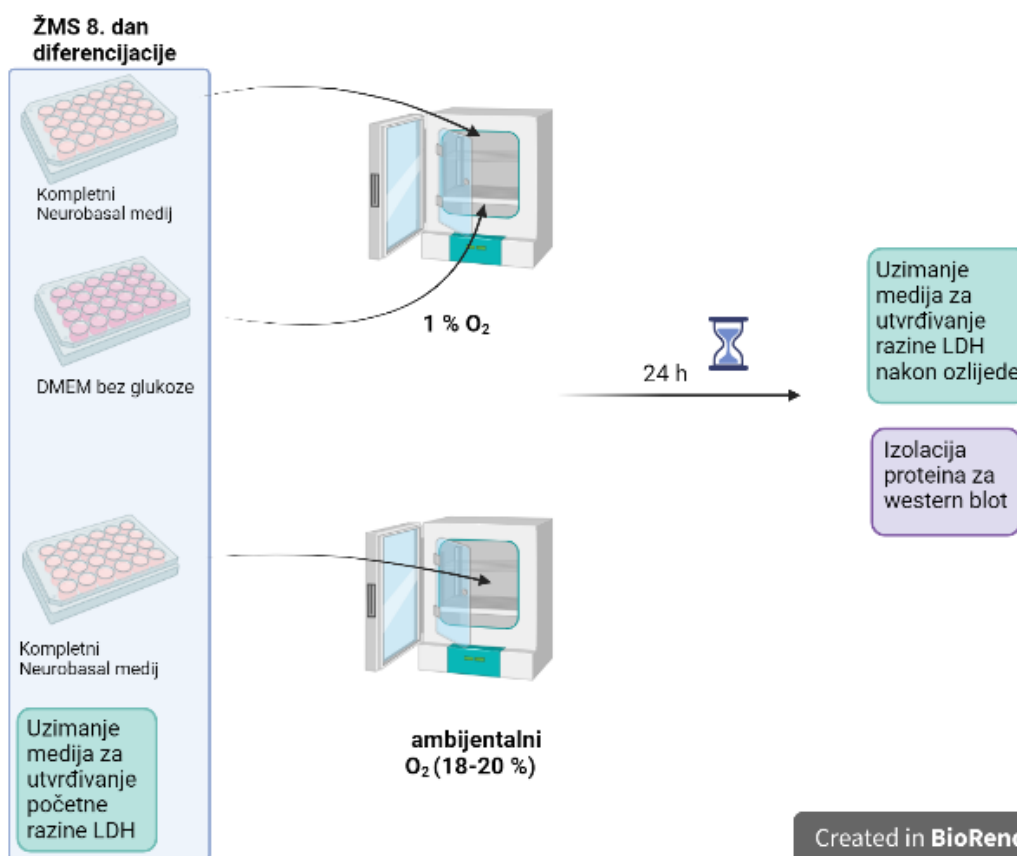
Slika 19. Ukupna laktat dehidrogenaza (LDH) u ambijentalnom (amb) i 5 % kisiku prvi (D1), četvrti (D4), i osmi (D8) dan diferencijacije ŽMS. Prikazana je razlika oslobođene LDH za svaki od tri ponovljena pokusa gdje su vrijednosti dobivene u stanicama iz 5 % kisika normalizirane s odgovarajućim vrijednostima para stanica iz ambijentalnog kisika čija je vrijednost prikazana kao 1. Ispod svakog stupčastog grafikona nalazi se prikaz veličine efekta zajedno s intervalima pouzdanosti na kojemu je svaki analizirani par povezan crtama. Kako se radi o parovima, pod pretpostavkom normalne distribucije korišten je Studentov T-test za parove. Statistička značajnost smatrana je ukoliko je $p < 0.05$ (*), a odsutnost statističke značajnosti prikazana je kao „ns“ (engl. *non-significant*).

5.4. Stanična smrt i aktivnost nekroptoze u *in vitro* kulturi nezrelih stanica živčanog sustava izloženih hipoksiji te deprivaciji kisika i glukoze (OGD)

Jedan od ciljeva ovog istraživanja je bio proučiti kako nezrele stanice živčanog sustava odumiru u uvjetima smanjene razine kisika. Stoga smo nezrele stanice živčanog sustava nastale diferencijacijom ŽMS tijekom 8 dana izložili 1 % kisiku u periodu od 24 h. Osim izazivanja staničnog odumiranja, cilj je bio postići stabilnu i jasno mjerljivu razinu nekroptoze. Iako je pokazano da takav tretman izaziva značajnu staničnu smrt na ŽMS

(95), u našem slučaju nije uspio postići zadovoljavajuću razinu staničnog oštećenja u nezrelim stanicama živčanog sustava. Iz tog razloga promijenili smo tretman, te smo uz deprivaciju kisika, uveli i deprivaciju glukoze (OGD, 1 % O₂, medij bez glukoze).

Kako bi utvrdili utjecaj hipoksije odnosno deprivacije kisika i glukoze na stanice tijekom 24 sata, izmjerena je oslobođena laktat dehidrogenaza (LDH) te je napravljen western blot kako bi utvrdila razina proteina fosforiliranog MLKL-a (p-MLKL), biljega nekroptoze (slika 20.).



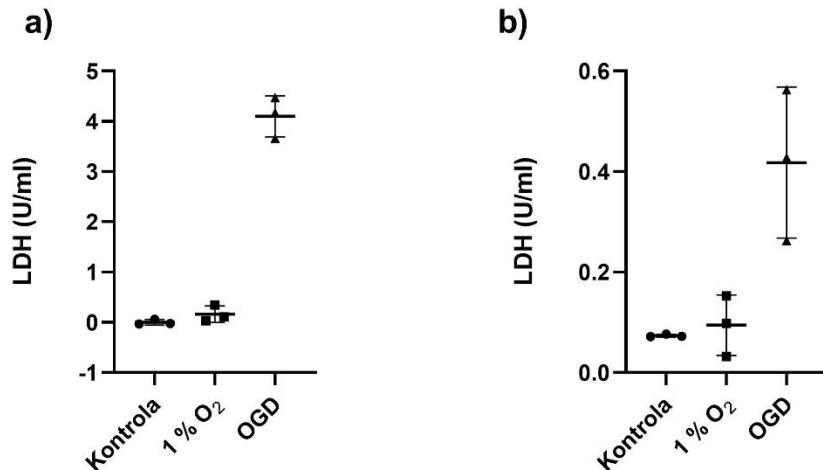
Slika 20. Shematski prikaz dizajna pokusa za usporedbu utjecaja hipoksije (1 % kisika) te deprivacije kisika i glukoze (OGD, 1 % kisika, medij bez glukoze) na ŽMS osmog dana diferencijacije (D8) tijekom 24 h.

Kako bi se usporedio intenzitet ozljede izazvane 24-satnom hipoksijom (1 % O₂), odnosno deprivacijom kisika i glukoze (OGD, 1 % O₂, medij bez glukoze), mjerena je oslobođena LDH tijekom same ozlijede te kasnije tijekom 24 satne reoksigenacije. U tu svrhu uzet je medij na početku neposredno prije ozljede, te na kraju nakon 24-satne

ozljede. Također, za usporedbu intenziteta stanične smrti u 24-satnoj reoksigenaciji stanica prethodno izloženih hipoksiji (1 % O₂), odnosno deprivacijom kisika i glukoze (OGD, 1 % O₂, medij bez glukoze), kompletni medij je zamijenjen na početku reoksigenacije kada je uzet uzorak za početnu koncentraciju LDH, te 24 h nakon početka reoksigenacije. Za oba slučaja (oslobađanje LDH tijekom ozljede te tijekom reoksigenacije), paralelno je uzet i medij iz kontrolnih stanica koje su rasle u normalnim uvjetima kojima je također prije uzimanja medija za početnu točku promijenjen cijeli medij kako bi se maknula LDH koji je oslobođena do tog trenutka te kako bi se i kontrolnim stanicama simulirala promjena cijelog medija. Za dobivanje koncentracije LDH izmjerene tijekom ozljede odnosno reoksigenacije, od vrijednosti izmjerene luminiscencije dobivenih nakon 24-satne ozljede, odnosno 24-satne reoksigenacije, oduzete su vrijednosti izmjerene na početku ozljede odnosno reoksigenacije. Navedene vrijednosti normalizirane su s vrijednostima dobivenim na standardnoj krivulji napravljenoj prema uputama proizvođača te je prema tome na grafovima na y osi prikazana koncentracija LDH (U/ml).

5.4.1. Mjerenje oslobođene laktat dehidrogenaze pokazalo je da deprivacija kisika i glukoze (OGD) izaziva mnogo veće oštećenje nezrelih stanica živčanog sustava u usporedbi s deprivacijom kisika (hipoksija)

Analiza razine oslobođene LDH je pokazala kako je deprivacija glukoze i kisika izazvala mnogo značajniju ozljedu stanica u usporedbi s kontrolnim stanicama te sa stanicama izloženih samo hipoksiji (slika 21. a). Isto se vidi i u reoksigenaciji (slika 21. b). Također, iz prosječnih vrijednosti koncentracije oslobođene LDH u samoj skupini OGD tijekom ozljede (oko 4 U/ml) te tijekom reoksigenacije (oko 0.4 U/ml) vidi se da je stanična smrt mnogo izraženija tijekom ozljede u usporedbi s reoksigenacijom.

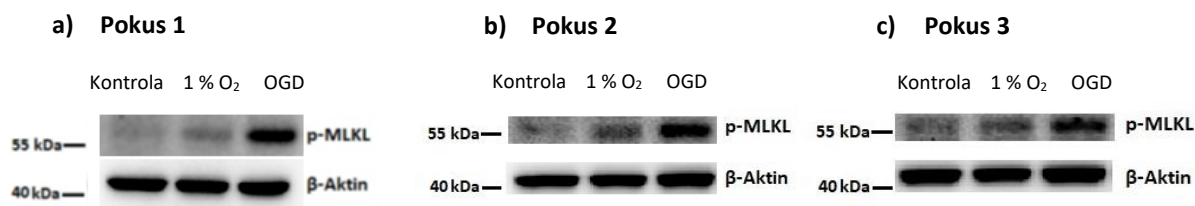


Slika 21. Laktat dehidrogenaza (LDH) oslobođena tijekom 24 satne hipoksije (1 % O₂), deprivacije kisika i glukoze (OGD, 1 % O₂, medij bez glukoze) (a), te u 24-satnoj reoksigenaciji (b). Stanice koje su 24 h bile izložene 1 % kisiku imale su blagi porast oslobođene LDH dok je u stanicama koje su uz smanjenje kisika bile izložene i deprivaciji glukoze (OGD) taj porast bio značajno veći. Kada su navedene skupine stanica vraćene u normalne uvijete, tj. reoksigenaciju (b), trend odnosa oslobođene LDH bio je sličan. U grupama svaki od tri pojedinačna znaka predstavlja razinu LDH izmjerenu iz jednog bunarića sa stanicama.

5.4.2. Izražaj biljega nekroptoze značajno je povećan u nezrelim stanicama živčanog sustava izloženima deprivaciji kisika i glukoze (OGD) u usporedbi sa stanicama izloženima samo deprivaciji kisika (hipoksija)

Konzistentno s opažanjem promjena u izgledu stanica te obrasca oslobađene LDH, OGD je izazvala značajno povećanje izražaja biljega nekroptoze, fosforiliranog MLKL-a (p-MLKL) u usporedbi s kontrolnim stanicama te sa stanicama izloženim samo hipoksiji (1 % O₂) (slika 22.).

Za sva tri uvjeta prikazana na slici 22., za izolaciju proteina korišten je isti volumen pufera za ekstrakciju proteina (RIPA), a prema izmjerenoj koncentraciji proteina, u skupini OGD bilo je 40-50 % manje proteina u usporedbi s kontrolnim stanicama. Ovo sugerira da je nakon 24 h OGD-a svega 50-60 % stanica bilo vijabilno. Prema tome, u svakom od pokusa prikazanih na slici 23 za kontrolne stanice stavljeno je 45 % manje volumena proteinskog lizata nego u OGD skupini. S druge strane, volumen korištenog lizata po jednoj jažici gela stanica koje su bile izložene samo hipoksiji (1 % O₂) bio je isti kao i u slučaju kontrolnih stanica. Prema intenzitetu β-Aktina (kontrola nanošenja) vidljivo je da je time postignuta otprilike podjednaka finalna koncentracija proteina.



Slika 22. Izražaj fosforiliranog MLKL-a (p-MLKL) dobivenog western blotom u stanicama izloženima hipoksiji (1 % O₂) te stanicama izloženima deprivaciji kisika i glukoze (OGD, 1 % O₂, medij bez glukoze) tijekom 24 h. Prikazani su rezultati triju neovisnih pokusa (a, b, c). Intenzitet proteina p-MLKL u stanicama izloženima samo hipoksiji pokazuje vrlo slabo povećanje u odnosu na kontrolu. S druge strane u OGD skupini signal bio je mnogo intenzivniji.

Kako je jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je istražiti nekroptozu putem intenziteta signala proteina p-MLKL, a budući da je nakon 24 h hipoksiji (1 % O₂) taj signal bio vrlo slab, tj. jedva uočljiv, odlučili smo uz hipoksiju koristiti i deprivaciju glukoze (OGD). To se pokazalo kao ispravna odluka jer smo na taj način postigli značajan porast ovog ključnog biljega nekroptoze.

5.5. Utjecaj egzogenih živčanih matičnih stanica, kondicioniranog medija te Necrostatina-1s na stanice izložene deprivaciji kisika i glukoze (OGD) tijekom kratke (6 h) i duge (24 h) reoksigenacije

Kako su rezultati iz poglavlja 5.4. pokazali da je deprivacija kisika i glukoze (OGD, 1 % O₂, medij bez glukoze) neophodna za izazivanje aktivacije nekroptoze, OGD je korištena za izazivanje ozljede stanica živčanog sustava nastalih diferencijacijom živčanih matičnih stanica (ŽMS) tijekom 8 dana (D8). Na D8 diferencijacije ŽMS, izazivana je ozljeda tijekom 24 h, nakon koje su stanice tretirane kako je opisano u tekstu koji slijedi. Proteinski lizati uzeti su nakon kratke (6 h) i duge (24 h) reoksigenacije, a biljezi čija je relativna ekspresija utvrđena western blotom uključivali su: fosforilirani MLKL (p-MLKL) za utvrđivanje razine nekroptoze, ali također i SOX2, β3-Tubulin (TUBB3) i GFAP kako bi se utvrdilo što se događa s biljezima ŽMS, neurona, odnosno astrocita. Prema tome, dobiveni rezultati promatrani su iz dva aspekta: 1. utjecaja same ozljede s kratkom i dugom reoksigenacijom na ekspresiju pojedinih biljega, i 2. utjecaj različitih tretmana na promjenu ekspresije pojedinog biljega.

Kako bi se utvrdio utjecaj ŽMS na nekroptozu nezrelih stanica živčanog sustava izazvanu deprivacijom kisika i glukoze (OGD) te usporedio učinak s kemijskim inhibitorom nekroptoze Necrostatinom-1s (Nec-1s, CST, #17802), nakon 24-satne ozljede, stanice u različitim bunarićima tretirane su na tri različita načina s odgovarajućim kontrolama.

U jedan od bunarića sa stanicama stavljen je insert presvučen lamininom na koji su nasađene male neurosfere nastale nakon 2 dana diobe 300 000 ŽMS (OGD/R + ŽMS) koje su prije nasađivanja bile centrifugirane i resuspendirane u mediju za diferencijaciju. Kao kontrola za navedenu skupinu služile su stanice na koje je stavljen insert presvučen lamininom bez stanica (OGD/R).

Drugi tretman je uključivao dodavanje kondicioniranog medija (OGD/R + kond. M) u kojem su 2 dana rasle ŽMS nasađene u koncentraciji 50 000 stanica/ml, u omjeru s medijem za diferencijaciju 1:1. Kao kontrola su služile stanice na koje je dodan medij za proliferaciju ŽMS u kojemu nisu rasle stanice (OGD/R + kontr. M), koji je 2 dana bio u inkubatoru u posudi za uzgoj stanica, također u omjeru s medijem za diferencijaciju 1:1.

Zadnji tretman uključivao je tretman s 100 μ M Nec-1s (OGD/R + Nec-1s), a kako je Nec-1s otopljen u DMSO-u, kao kontrola su služile stanice na koje je stavljen medij za diferencijaciju samo s DMSO-om (OGD/R + DMSO). Koncentracija od 100 μ M Nec-1s korištena je jer smo u literaturi pronašli kako je to jedna od najviših korištenih koncentracija Nec-1 koja je dobro tolerirana od strane stanica (96,97).

Važno je napomenuti kako je u prikazu rezultata uspoređivan tretman isključivo sa svojom kontrolom stavlajući fokus na učinak samih tretmana. Naime, ŽMS u ko-kulturi s ozlijeđenim stanicama (OGD/R + ŽMS) bile su nasađene u mediju za diferencijaciju, a kao kontrola su služile ozlijeđene stanice na koje je također stavljen medij za diferencijaciju (OGD/R). Kako se medij za diferencijaciju ŽMS razlikuje od onoga za uzgoj ŽMS, kontrola kondicioniranom mediju (OGD/R + kond. M) služio je kontrolni medij za uzgoj ŽMS u kojem nije bilo stanica (OGD/R + kontr. M). Na kraju kao kontrola Nec-1s (OGD/R + Nec-1s) služio je DMSO (OGD/R + DMSO). Na taj način fokus smo stavili na tretman pazeći da na naše zaključke ne utječu ostale razlike u mediju. Naime, nikako ne bi bilo ispravno uspoređivati skupine OGD/R + kond. M i OGD/R + Nec-1s sa skupinom OGD/R jer se u skupini OGD/R + kond. M nalazi medij za uzgoj ŽMS kojeg nema OGD/R

skupini, a u skupini OGD/R + Nec-1s se nalazi DMSO kojeg opet nema u OGD/R skupini. Drugim riječima, pokus je bio postavljen kako bi proučavali utjecaj pojedinih tretmana: egzogenih matičnih stanica (ko-kultura), molekula koje su izlučile ŽMS tijekom uzgoja u mediju za proliferaciju (kondicionirani medij), te Nec-1s. Iz tog razloga svaki tretman uspoređivan je s odgovarajućom kontrolom.

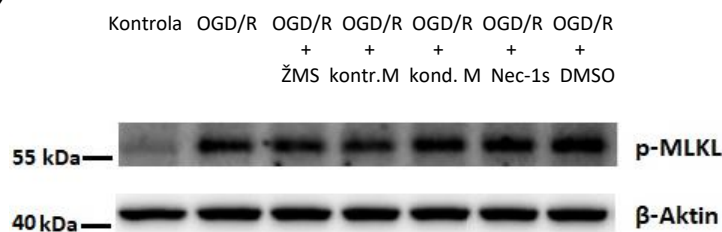
Uz navedene tretmane stanica izloženih deprivaciji kisika i glukoze (3 tretmana i kontrola za svaki od tretmana) postojala je još jedna skupina stanica koje su cijelo vrijeme rasle u normalnim uvjetima i koje su služile kao kontrolne stanice uz pomoć kojih se utvrdilo kakav utjecaj na stanice ima OGD.

Proteinski lizati uzeti su nakon kratkotrajne (6 h) te dugotrajne (24 h) reoksigenacije. Western blot rađen je na fosforilirani MLKL (p-MLKL) kako bi se utvrdila razina nekroptoze u navedenim skupinama stanica, ali također i na SOX2, β 3-Tubulin (TUBB3) i GFAP kako bi se utvrdilo što se događa s biljezima ŽMS, neurona, odnosno astrocita.

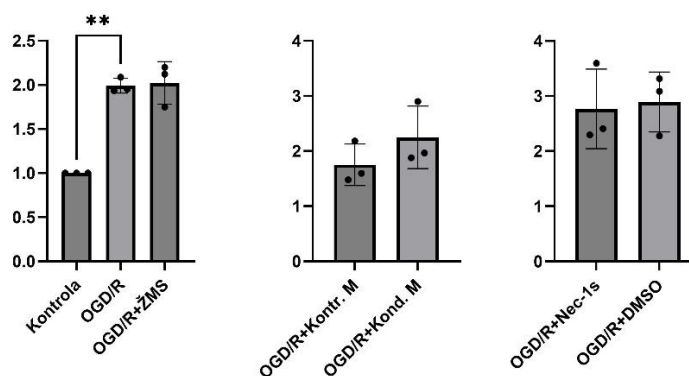
5.5.1. Tretiranje nezrelih stanica živčanog sustava oštećenih 24-satnom deprivacijom kisika i glukoze živčanim matičnim stanicama, kondicioniranim medijem te Necrostatinom-1s, nije utjecalo na aktivnost nekroptoze, mjereno izražajem proteina p-MLKL

Nakon 6 sati reoksigenacije, izražaj proteina p-MLKL značajno je bio povećan u stanicama izloženim OGD-u u usporedbi s kontrolnim stanicama (slika 23.). S druge strane, niti jedan od tretmana koji su uključivali ko-kulturu sa ŽMS, kondicionirani medij u kojem su rasle ŽMS ili Nectostatin-1s, nije utjecao na smanjenje izražaja p-MLKL-a u usporedbi sa svojim kontrolama (slika 23.). Isti obrazac vidi se i nakon 24 h reoksigenacije (slika 24.). Kada se uspoređi OGD izazvana ekspresija p-MLKL-a u usporedbi s kontrolnom, nakon 6 h i 24 h reoksigenaciji, vidi se da se u prvom slučaju (6 h, slika 23.) radi o povećanju od oko 2x, dok je nakon duge reoksigenacije (24 h) prosječno povećanje oko 5x (slika 24.) što ukazuje na pojačanu aktivnost nekroptoze tijekom duže reoksigenacije.

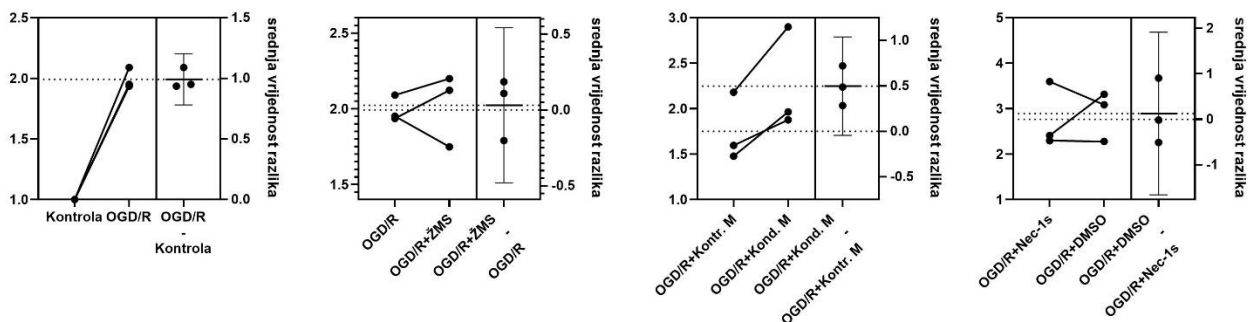
a)



b)

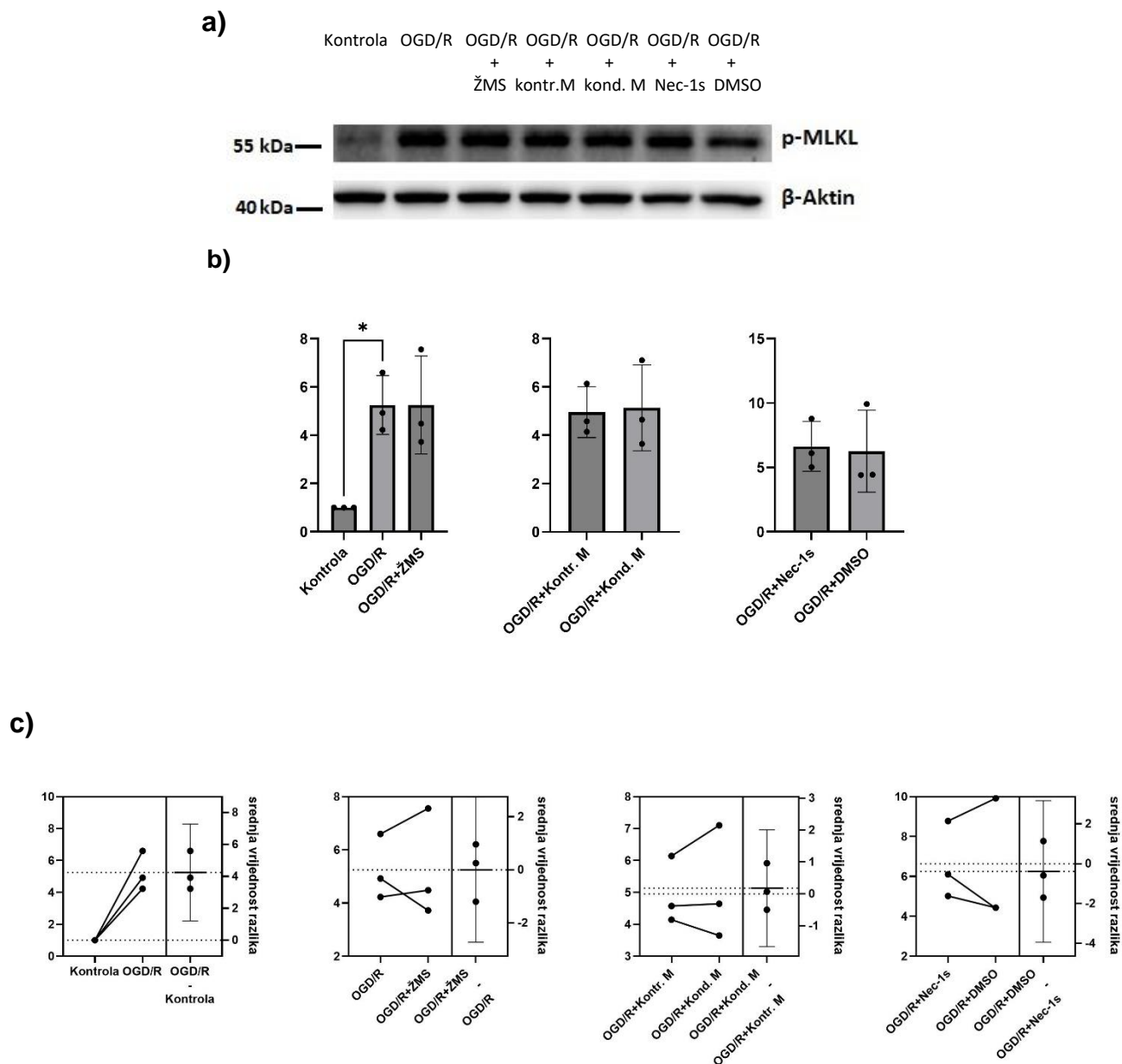


c)



Slika 23. Izražaj proteina p-MLKL u stanicama nakon 6 h reoksigencije. a) reprezentativna western blot membrana obilježena anti-p-MLKL protutijelom te anti-β-Aktin protutijelom prema kojemu je rađena normalizacija. Iznad membrane navedene su skupine na koje se pojedini signal odnosi, a s lijeve strane označen je okvirni položaj mase proteina temeljen na markeru. b) prikaz grafova sa srednjim vrijednostima i standardnom devijacijom triju ponovljenih pokusa. Vrijednost za svaki pojedini pokus koja predstavlja relativni izražaj, dobivena je normalizacijom intenziteta pojedinih signala s odgovarajućim signalom β-Aktina te je navedeni broj normaliziran sa kontrolnom skupinom čija je vrijednost na y osi 1. Svaka od točaka predstavlja vrijednost za jedan od ponovljenih pokusa. Stupčasti grafikoni prikazuju srednju vrijednost ± standardnu devijaciju. Ispod svakog grafikona nalazi se prikaz veličine efekta zajedno s intervalima pouzdanosti na kojemu je svaki analizirani par povezan crtama. Jedan par čine stanice koje dolaze od iste populacije stanica koje su nasadene u različite pločice s bunarićima. Kako se radi o parovima,

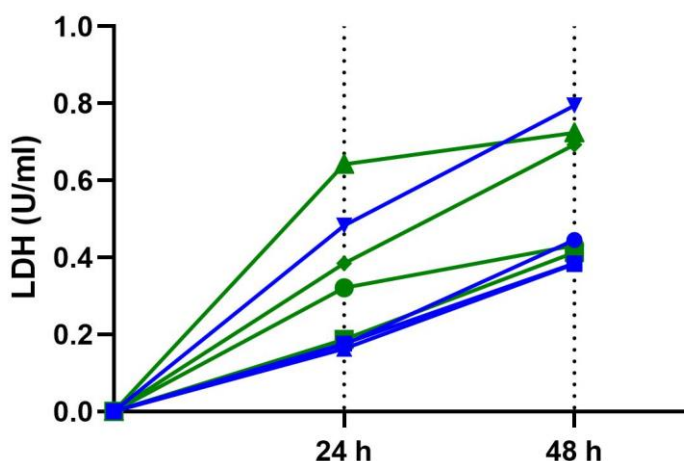
i svaki tretman je uspoređivan sa svojom kontrolom, pod pretpostavkom normalne distribucije, korišten je Studentov T-test za parove. Statistička značajnost smatrana je ukoliko je $p < 0.01$ (**) ili $p < 0.05$ (*).



točaka predstavlja vrijednost za jedan od ponovljenih pokusa. Stupčasti grafikoni prikazuju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju. Ispod svakog grafikona nalazi se prikaz veličine efekta zajedno s intervalima pouzdanosti na kojemu je svaki analizirani par povezan crtama. Jedan par čine stanice koje dolaze od iste populacije stanica koje su nasadene u različite pločice s bunarićima. Kako se radi o parovima, i svaki tretman je uspoređivan sa svojom kontrolom, pod pretpostavkom normalne distribucije, korišten je Studentov T-test za parove. Statistička značajnost smatrana je ukoliko je $p < 0.01$ (**) ili $p < 0.05$ (*).

5.5.2. Utjecaj kondicioniranog medija na oslobađanje laktat dehidrogenaze

Kako matične stanice nisu pokazale učinak na smanjenje izražaja biljega nekroptoze niti putem ko-kulture, niti putem kondicioniranog medija, idući korak je bio direktno mjeriti staničnu smrt putem oslobađanja laktat dehidrogenaze (LDH). Ovdje treba jasno reći kako u pokusu ko-kulture nije moguće mjeriti razine LDH, jer ne bi mogli razlikovati LDH oslobođen od strane ozlijeđenih stanica od onoga koji je potencijalno oslobođen od strane egzogeno dodanih matičnih stanica. Iz tog razloga smo odlučili usporediti postoji li razlika u oslobađanju LDH kada su stanice tretirane kontrolnim i kondicioniranim medijem. Pokus je postavljen isto kao i za western blot, a kako su stanice bile nasadene u pločici s 24 bunarića, ukupni medij po jednom bunariću iznosio je 500 μ l. Nakon 24-satne deprivacije kisika i glukoze (OGD, 1 % O₂, medij bez glukoze), stanicama je dodan kompletni medij koji je inače korišten za diferencijaciju s dodatkom kondicioniranog medija, odnosno kontrolnog medija u omjeru 1:1. Uzorak medija uzet je odmah na početku, te nakon 24 i 48 h reoksigenacije. Od vrijednosti izmjerene luminiscencije dobivenih nakon 24 i 48-satne reoksigenacije, oduzete su vrijednosti izmjerene na početku reoksigenacije. Navedene vrijednosti normalizirane su s vrijednostima dobivenim na standardnoj krivulji. Rezultati su grafički prikazani na slici 25. Na y osi prikazana koncentracija LDH (U/ml), dok je na x osi prikazano vrijeme u satima gdje je 0 početak reoksigenacije u kojem je uzet početni uzorak medija s kojim je vršena normalizacija pa je u toj točki vrijednost koncentracije LDH jednaka nuli. Uzorak medija u sve 3 vremenske točke uziman je iz po 4 bunarića s kondicioniranim medijem, odnosno 4 bunarića s kontrolnim medijem, a vrijednosti za pojedini bunarić za sve tri vremenske točke povezane su crtama. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da nema razlike u oslobađanju LDH tijekom 24 odnosno 48 h reoksigenacije u stanicama uzgajanima u kondicioniranom i kontrolnom mediju.

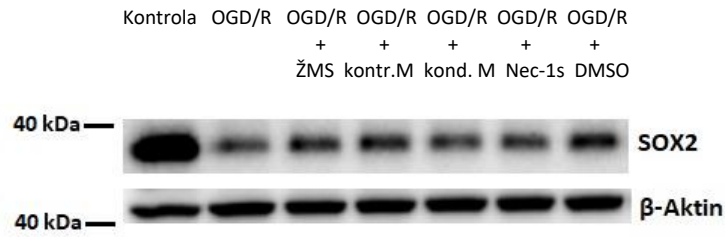


Slika 25. Grafički prikaz oslobađanja laktat dehidrogenaze (LDH) u reoksigenaciji u stanicama uzgajanima u kondicioniranom (zeleno) i kontrolnom mediju (plavo). Za svaki od uvjeta mjereno je oslobađanje LDH iz 4 bunarića sa stanicama, a vrijednosti za svaki pojedini bunarić u 3 vremenske točke (0 – početak reoksigenacije, te 24 i 48 h reoksigenacije) povezani su crtama.

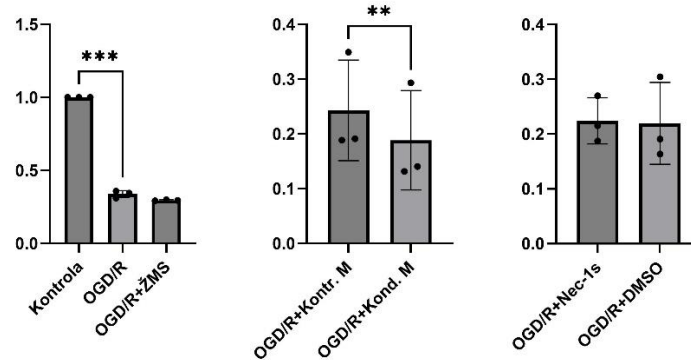
5.5.3. Utjecaj tretmana na izražaj proteina SOX2, TUBB3 te GFAP, biljega živčanih matičnih stanica, neurona, odnosno astrocita

Osim biljega nekroptoze, western blotom mjereni su i biljezi pojedinih staničnih tipova. Izražaj proteina SOX2 nakon 6 h (slika 26.) i 24 h (slika 27.) reoksigenacije značajno je smanjen u stanicama izloženim OGD-u u usporedbi s kontrolnim stanicama. Kada se uspoređuju pojedini tretmani, značajnu razliku pokazuje kondicionirani medij u usporedbi sa svojom kontrolom, a radi se o suprotnom efektu 6 h odnosno 24 h reoksigenacije. Naime, nakon 6 h reoksigenacije, SOX2 bio je smanjeno eksprimiran, dok je nakon 24 h reoksigenacije bio pojačano eksprimiran u skupini s kondicioniranim medijem. Razlog takvog rezultata mogao bi biti u pozitivom djelovanju faktora rasta i drugih komponenti kontrolnog medija u kratkom periodu, a taj pozitivni efekt u dovoljno dugom vremenskom odmaku vjerojatno su nadjačali čimbenici i ostale molekule koje su proizvele ŽMS, a koje možda trebaju duži period za se vidi njihovo djelovanje. S druge strane, ostali tretmani koji su uključivali ko-kulturu sa ŽMS i Nectostatin-1s, nisu utjecali na smanjenje izražaja SOX2 u usporedbi sa svojim kontrolama nakon 6 h (slika 26.) niti nakon 24 h (slika 27.) reoksigenacije.

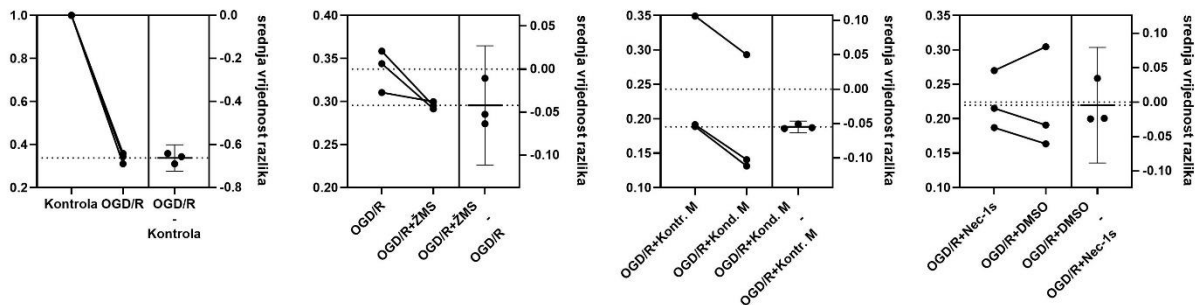
a)



b)

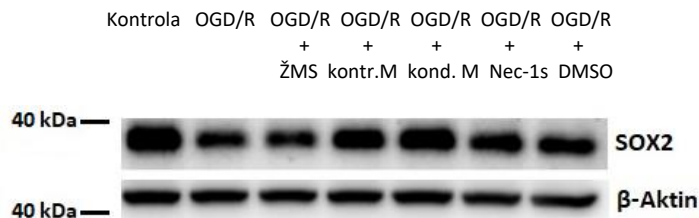


c)

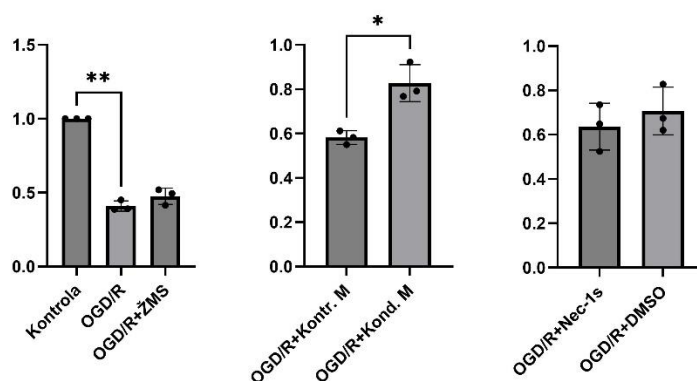


Slika 26. Izražaj proteina SOX2 u stanicama nakon 6 h reoksigenacije. a) reprezentativna western blot membrana obilježena anti-SOX2 protutijelom te anti- β -Aktin protutijelom prema kojemu je rađena normalizacija. Iznad membrane navedene su skupine na koje se pojedini signal odnosi, a s lijeve strane označen je okvirni položaj mase proteina temeljen na markeru. b) prikaz grafova sa srednjim vrijednostima i standardnom devijacijom triju ponovljenih pokusa. Vrijednost za svaki pojedini pokus koja predstavlja relativni izražaj, dobivena je normalizacijom intenziteta pojedinih signala s odgovarajućim signalom β -Aktina te je navedeni broj normaliziran sa kontrolnom skupinom čija je vrijednost na y osi 1. Svaka od točaka predstavlja vrijednost za jedan od ponovljenih pokusa. Stupčasti grafikoni prikazuju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju. Ispod svakog grafikona nalazi se prikaz veličine efekta zajedno s intervalima pouzdanosti na kojemu je svaki analizirani par povezan crtama. Jedan par čine stanice koje dolaze od iste populacije stanica koje su nasadene u različite pločice s bunarićima. Kako se radi o parovima, i svaki tretman je uspoređivan sa svojom kontrolom, pod pretpostavkom normalne distribucije, korišten je Studentov T-test za parove. Statistička značajnost smatrana je ukoliko je $p < 0.01$ (**) ili $p < 0.05$ (*).

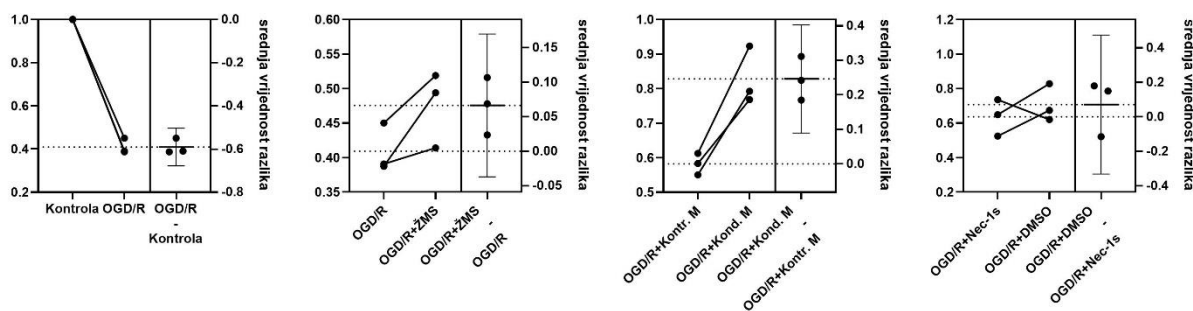
a)



b)



c)

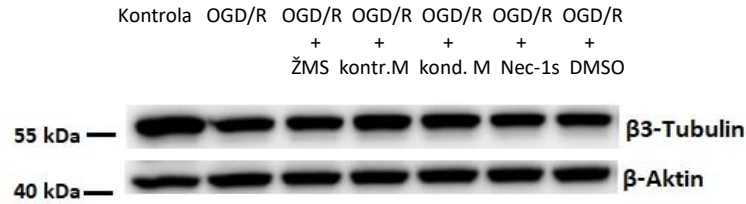


Slika 27. Izražaj proteina SOX2 u stanicama nakon 24 h reoksigenacije. a) reprezentativna western blot membrana obilježena anti-SOX2 protutijelom te anti-β-Aktin protutijelom prema kojemu je rađena normalizacija. Iznad membrane navedene su skupine na koje se pojedini signal odnosi, a s lijeve strane označen je okvirni položaj mase proteina temeljen na markeru. b) prikaz grafova sa srednjim vrijednostima i standardnom devijacijom triju ponovljenih pokusa. Vrijednost za svaki pojedini pokus koja predstavlja relativni izražaj, dobivena je normalizacijom intenziteta pojedinih signala s odgovarajućim signalom β-Aktina te je navedeni broj normaliziran sa kontrolnom skupinom čija je vrijednost na y osi 1. Svaka od točaka predstavlja vrijednost za jedan od ponovljenih pokusa. Stupčasti grafikoni prikazuju srednju vrijednost ± standardnu devijaciju. Ispod svakog grafikona nalazi se prikaz veličine efekta zajedno s intervalima pouzdanosti na kojemu je svaki analizirani par povezan crtama. Jedan par čine stanice koje dolaze od iste populacije stanica koje su nasadene u različite pločice s bunarićima. Kako se radi o parovima,

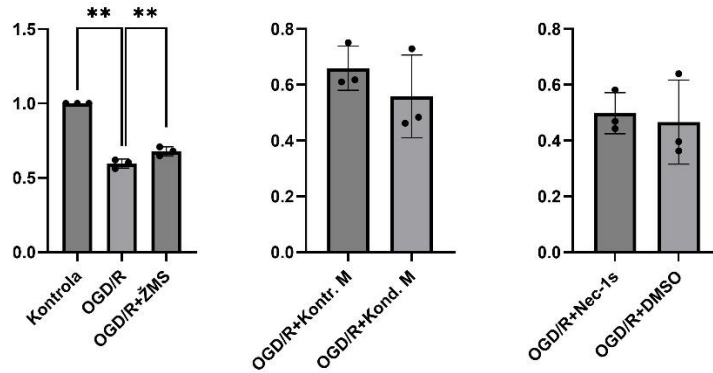
i svaki tretman je uspoređivan sa svojom kontrolom, pod pretpostavkom normalne distribucije, korišten je Studentov T-test za parove. Statistička značajnost smatrana je ukoliko je $p < 0.01$ (**) ili $p < 0.05$ (*).

Prosječno smanjenje ekspresije proteina TUBB3 nakon 6 h reoksigenacije (slika 28.) bilo je za oko 2 x, a nakon 24 h reoksigenacije za oko 4 x kada se uspoređuju stanice izložene OGD-u s kontrolnim stanicama. Ko-kultura sa ŽMS blago je povećala izražaj TUBB3 nakon 6 h reoksigenacije, međutim, isti efekt nije bio vidljiv nakon reoksigenacije od 24 h (slika 29.). S druge strane, ostali tretmani koji su uključivali kondicionirani medij i Nectostatin-1s, nisu utjecali na izražaj TUBB3 u usporedbi sa svojim kontrolama nakon 6 h (slika 28.) niti nakon 24 h (slika 29.) reoksigenacije .

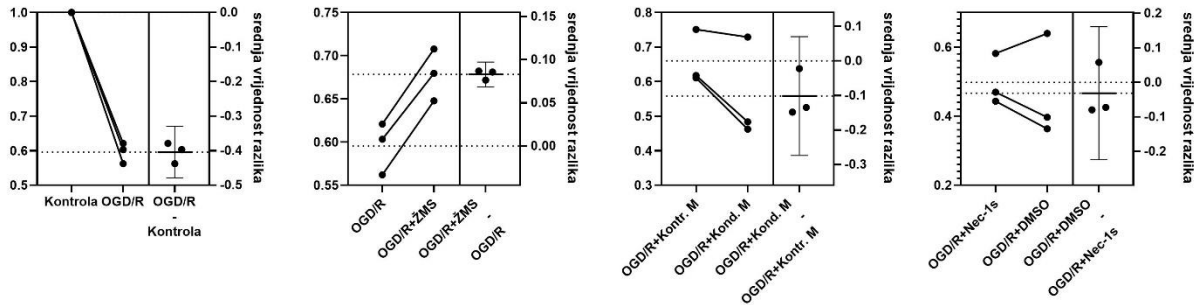
a)



b)

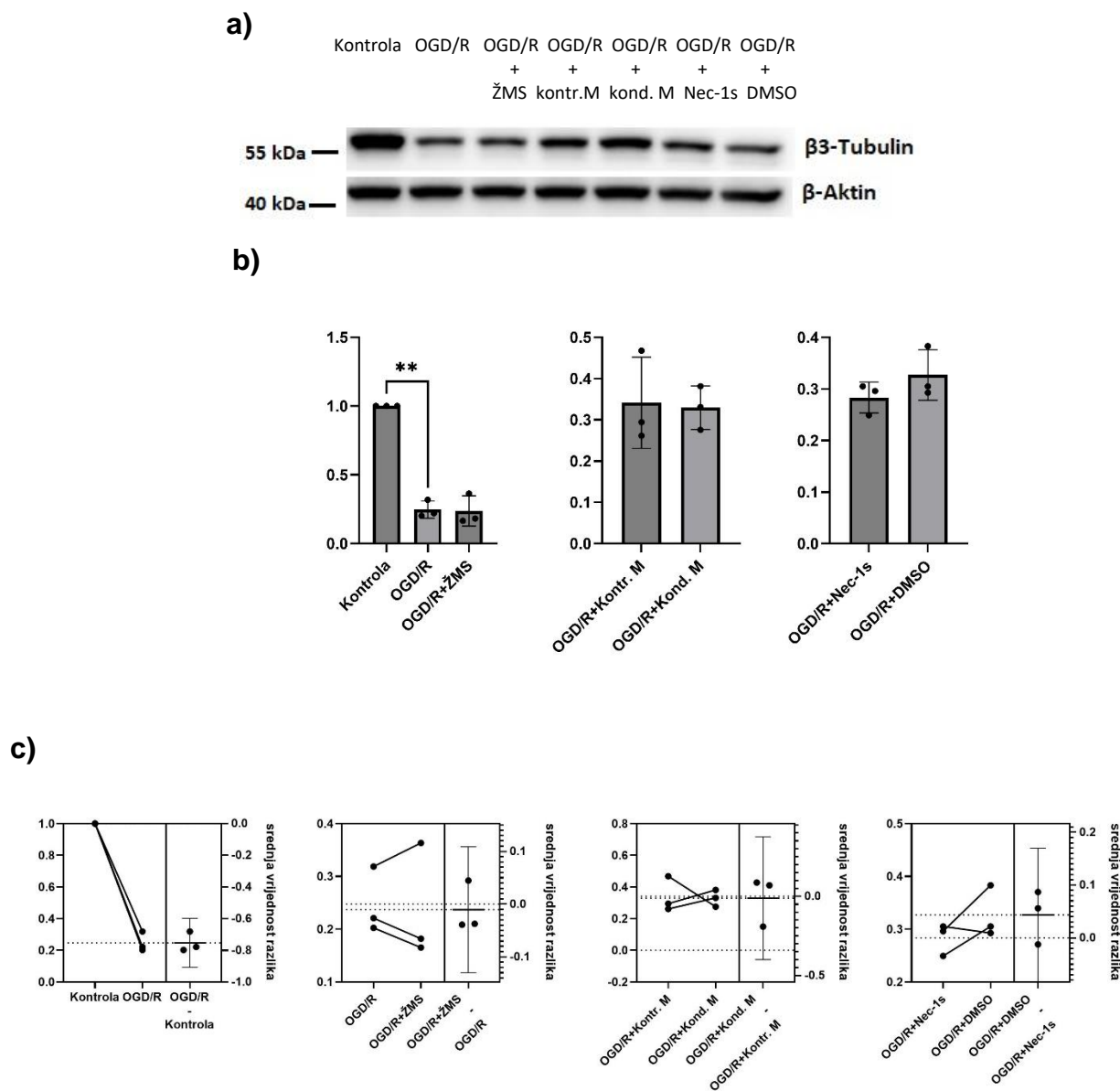


c)



Slika 28. Izražaj proteina TUBB3 u stanicama nakon 6 h reoksigenacije. a) reprezentativna western blot membrana obilježena anti-TUBB3 protutijelom te anti-β-Aktin protutijelom prema kojemu je rađena normalizacija. Iznad membrane navedene su skupine na koje se pojedini signal odnosi, a s lijeve strane označen je okvirni položaj mase proteina temeljen na markeru. b) prikaz grafova sa srednjim vrijednostima i standardnom devijacijom triju ponovljenih pokusa. Vrijednost za svaki pojedini pokus koja predstavlja relativni izražaj, dobivena je normalizacijom intenziteta pojedinih signala s odgovarajućim signalom β-Aktina te je navedeni broj normaliziran sa kontrolnom skupinom čija je vrijednost na y osi 1. Svaka od točaka predstavlja vrijednost za jedan od ponovljenih pokusa. Stupčasti grafikoni prikazuju srednju vrijednost ± standardnu devijaciju. Ispod svakog grafikona nalazi se prikaz veličine efekta zajedno s intervalima pouzdanosti na kojemu je svaki analizirani par povezan crtama. Jedan par čine stanice koje dolaze od iste populacije stanica koje su nasadene u različite pločice s bunarićima. Kako se radi o parovima,

i svaki tretman je uspoređivan sa svojom kontrolom, pod pretpostavkom normalne distribucije, korišten je Studentov T-test za parove. Statistička značajnost smatrana je ukoliko je $p < 0.01$ (**) ili $p < 0.05$ (*).

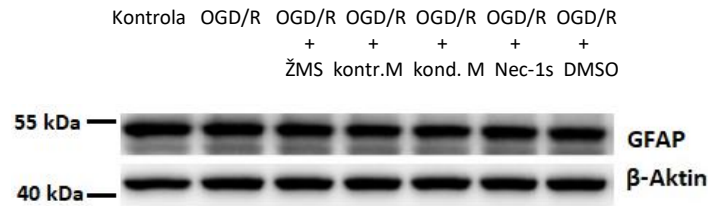


Slika 29. Izražaj proteina TUBB3 u stanicama nakon 24 h reoksigenacije. a) reprezentativna western blot membrana obilježena anti-TUBB3 protutijelom te anti- β -Aktin protutijelom prema kojemu je rađena normalizacija. Iznad membrane navedene su skupine na koje se pojedini signal odnosi, a s lijeve strane označen je okvirni položaj mase proteina temeljen na markeru. b) prikaz grafova sa srednjim vrijednostima i standardnom devijacijom triju ponovljenih pokusa. Vrijednost za svaki pojedini pokus koja predstavlja relativni izražaj, dobivena je normalizacijom intenziteta pojedinih signala s odgovarajućim signalom β -Aktina te je navedeni broj normaliziran sa kontrolnom skupinom čija je vrijednost na y osi 1. Svaka od točaka predstavlja vrijednost za jedan od ponovljenih pokusa. Stupčasti grafikoni prikazuju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju. Ispod svakog grafikona nalazi se prikaz veličine efekta zajedno s intervalima pouzdanosti na kojemu je svaki analizirani par povezan crtama. Jedan par čine stanice koje

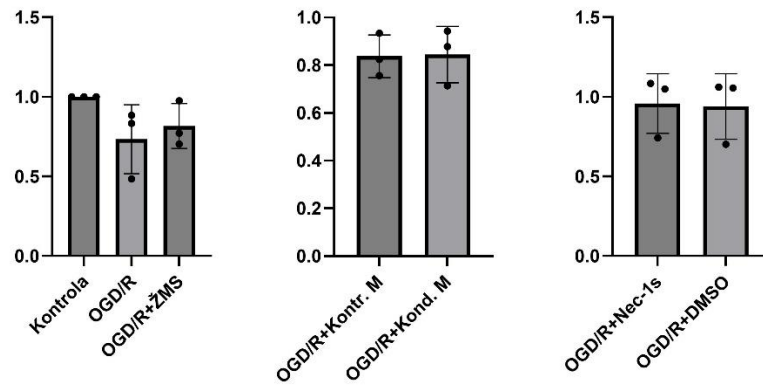
dolaze od iste populacije stanica koje su nasađene u različite pločice s bunarićima. Kako se radi o parovima, i svaki tretman je uspoređivan sa svojom kontrolom, pod pretpostavkom normalne distribucije, korišten je Studentov T-test za parove. Statistička značajnost smatrana je ukoliko je $p < 0.01$ (**) ili $p < 0.05$ (*).

Iako je izražaj proteina GFAP pokazao blagu tendenciju smanjenja ekspresije nakon 6 h (slika 30.) i 24 h (slika 31.) reoksigenacije u stanicama izloženih OGD-u u usporedbi s kontrolnim stanicama, ta razlika nije postigla statističku značajnosti. Također, niti jedan od tretmana koji su uključivali ko-kulturu sa ŽMS, kondicionirani medij u kojem su rasle ŽMS ili Necrostatin-1s, nije utjecao na promjenu izražaja proteina GFAP u usporedbi sa svojim kontrolama nakon 6 h (slika 30.) niti nakon 24 h (slika 31.) reoksigenacije.

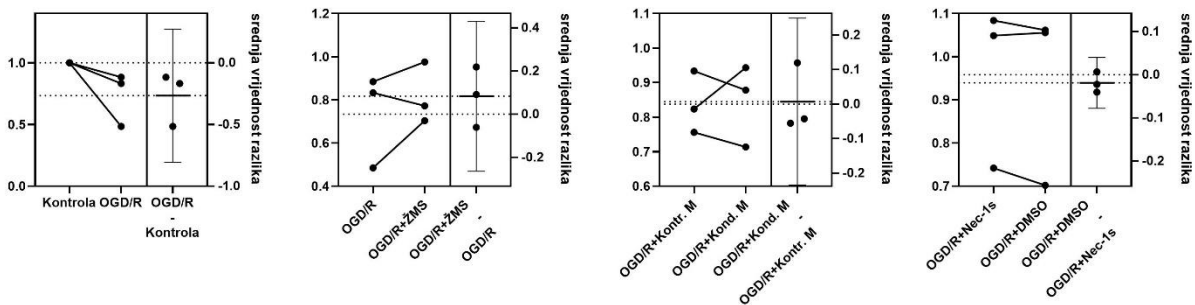
a)



b)

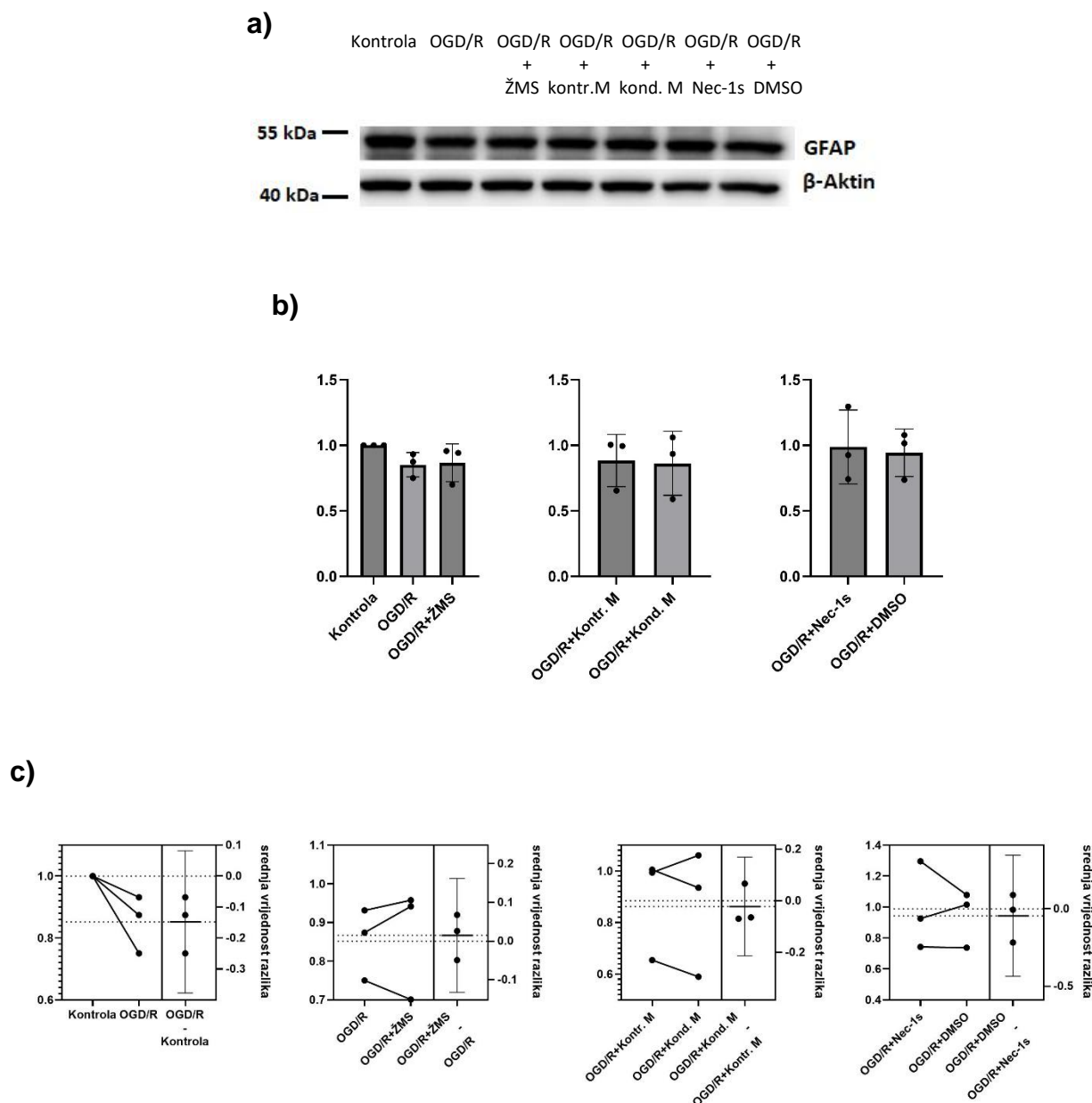


c)



Slika 30. Izražaj proteina GFAP u stanicama nakon 6 h reoksigenacije. a) reprezentativna western blot membrana obilježena anti-GFAP protutijelom te anti-β-Aktin protutijelom prema kojemu je rađena normalizacija. Iznad membrane navedene su skupine na koje se pojedini signal odnosi, a s lijeve strane označen je okvirni položaj mase proteina temeljen na markeru. b) prikaz grafova sa srednjim vrijednostima i standardnom devijacijom triju ponovljenih pokusa. Vrijednost za svaki pojedini pokus koja predstavlja relativni izražaj, dobivena je normalizacijom intenziteta pojedinih signala s odgovarajućim signalom β-Aktina te je navedeni broj normaliziran sa kontrolnom skupinom čija je vrijednost na y osi 1. Svaka od točaka predstavlja vrijednost za jedan od ponovljenih pokusa. Stupčasti grafikoni prikazuju srednju vrijednost ± standardnu devijaciju. Ispod svakog grafikona nalazi se prikaz veličine efekta zajedno s intervalima pouzdanosti na kojemu je svaki analizirani par povezan crtama. Jedan par čine stanice koje dolaze od iste populacije stanica koje su nasađene u različite pločice s bunarićima. Kako se radi o parovima,

i svaki tretman je uspoređivan sa svojom kontrolom, pod pretpostavkom normalne distribucije, korišten je Studentov T-test za parove. Statistička značajnost smatrana je ukoliko je $p < 0.01$ (**) ili $p < 0.05$ (*).



Slika 31. Izražaj proteina GFAP u stanicama nakon 24 h reoksigenacije. a) reprezentativna western blot membrana obilježena anti-GFAP protutijelom te anti- β -Aktin protutijelom prema kojemu je rađena normalizacija. Iznad membrane navedene su skupine na koje se pojedini signal odnosi, a s lijeve strane označen je okvirni položaj mase proteina temeljen na markeru. b) prikaz grafova sa srednjim vrijednostima i standardnom devijacijom triju ponovljenih pokusa. Vrijednost za svaki pojedini pokus koja predstavlja relativni izražaj, dobivena je normalizacijom intenziteta pojedinih signala s odgovarajućim signalom β -Aktina te je navedeni broj normaliziran sa kontrolnom skupinom čija je vrijednost na y osi 1. Svaka od točaka predstavlja vrijednost za jedan od ponovljenih pokusa. Stupčasti grafikoni prikazuju srednju

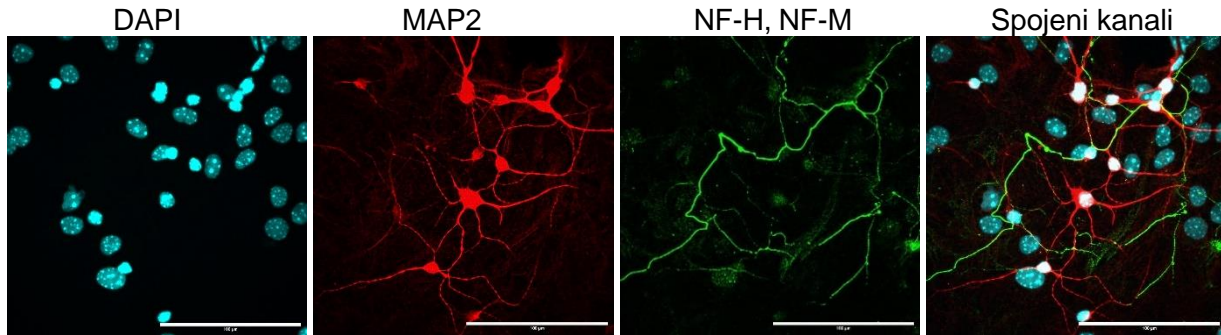
vrijednost \pm standardnu devijaciju. Ispod svakog grafikona nalazi se prikaz veličine efekta zajedno s intervalima pouzdanosti na kojemu je svaki analizirani par povezan crtama. Jedan par čine stanice koje dolaze od iste populacije stanica koje su nasađene u različite pločice s bunarićima. Kako se radi o parovima, i svaki tretman je uspoređivan sa svojom kontrolom, pod pretpostavkom normalne distribucije, korišten je Studentov T-test za parove. Statistička značajnost smatrana je ukoliko je $p < 0.01$ (**) ili $p < 0.05$ (*).

5.6. Imunocitokemijska analiza stanica izloženih deprivaciji glukoze i kisika te kratkoj (6 h), odnosno dugoj (24 h) reoksigenaciji

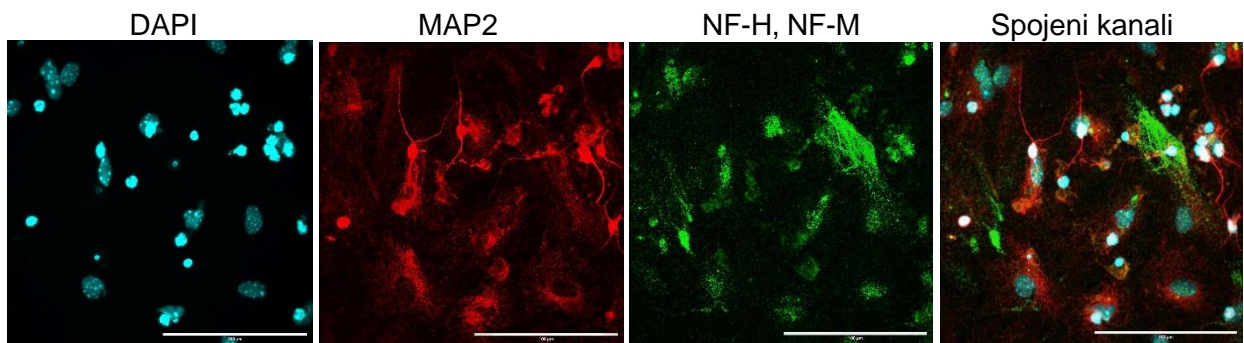
5.6.1. Morfološka analiza stanica izloženih deprivaciji kisika i glukoze otkriva manji broj neurona s kraćim nastavcima te astrocite koji su skupljeni

Kako bi se utvrdile posljedice deprivacije glukoze i kisika s kratkom (6 h) i dugom (24) reoksigenacijom na morfologiju stanica, napravljena je imunocitokemija (ICC) na biljege: ŽMS (Nestin), dendrita (MAP2) i aksona (NF-H, NF-M) neurona, te astrocita (GFAP). ICC analiza potvrdila je razarajuće posljedice ozljede (OGD/R 6 h i 24 h) na neurone. Broj neurona je bio smanjen, a nastavci su im bili kraći (slika 32.). Istovremeno, astrociti su se nakon izlaganja OGD skupljali i zauzimali su mnogo manja područja u usporedbi sa stanicama uzgajanim u kontrolnim uvjetima (slika 33.).

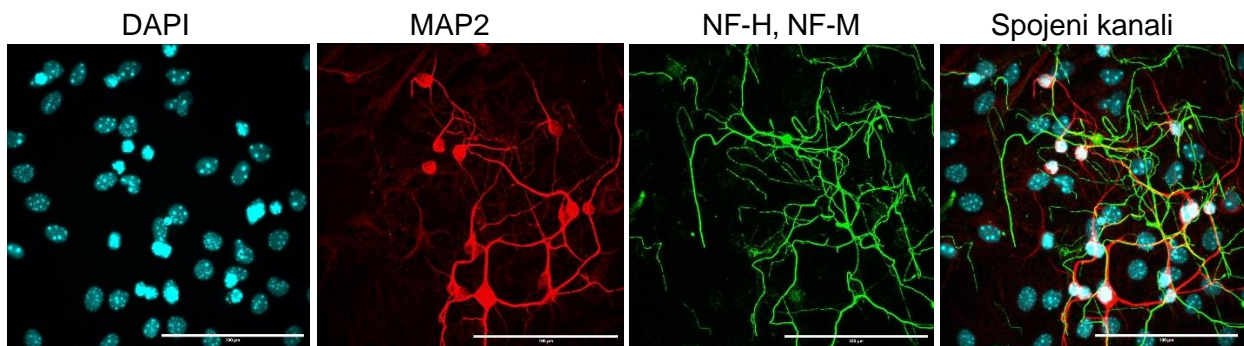
**a) 6 h reoksigenacije
KONTROLNE STANICE**



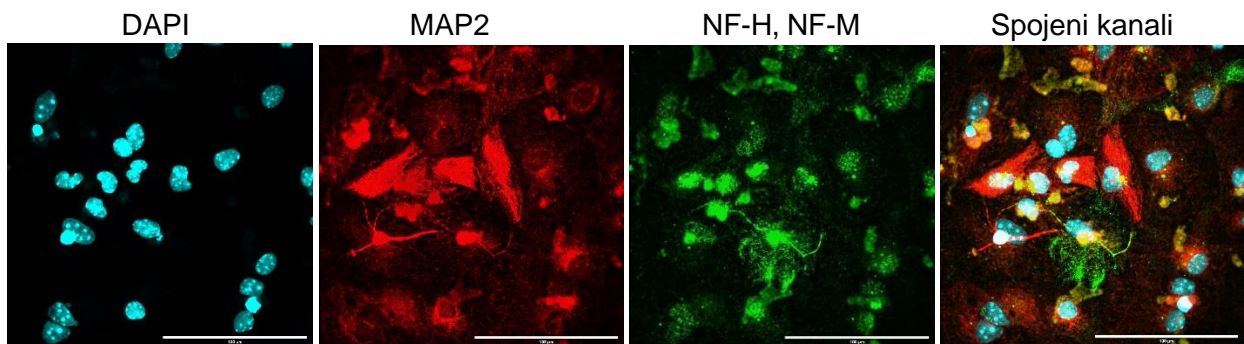
STANICE IZLOŽENE OZLJEDI



**b) 24 h reoksigenacije
KONTROLNE STANICE**



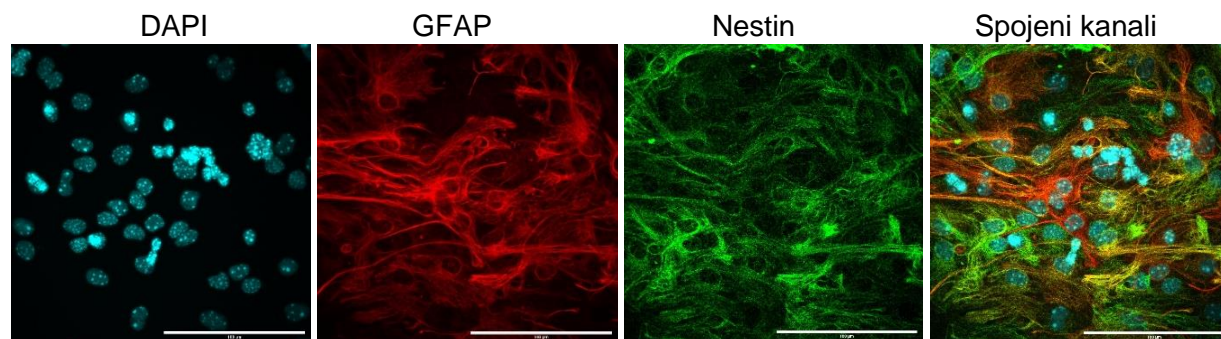
STANICE IZLOŽENE OZLJEDI



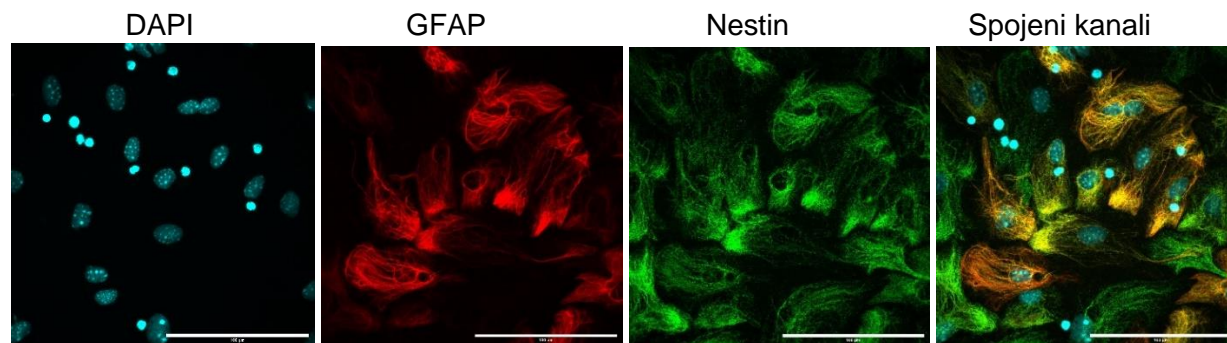
Slika 32. Imunocitokemijska (ICC) analiza nezrelih stanica živčanog sustava izloženih deprivaciji kisika i glukoze (OGD) tijekom 24 h te kratkoj (6 h, a) i dugoj (24 h, b) reoksigenaciji na biljege neurona. Prikazani su biljezi dendrita (MAP2, crveno) i aksona (NF-H, NF-M zeleno) neurona. U kontrolnim

stanicama nastavci neurona se lijepo razaznaju, dok je kod stanica izloženih ozljedi signal vrlo nepravilan što može biti posljedica nespecifičnog vezanja protutijela na proteine ozlijeđenih stanica. Prikazane su reprezentativne slike iz jednog od najmanje dva ponovljena pokusa. Crta mjerila 200 μm .

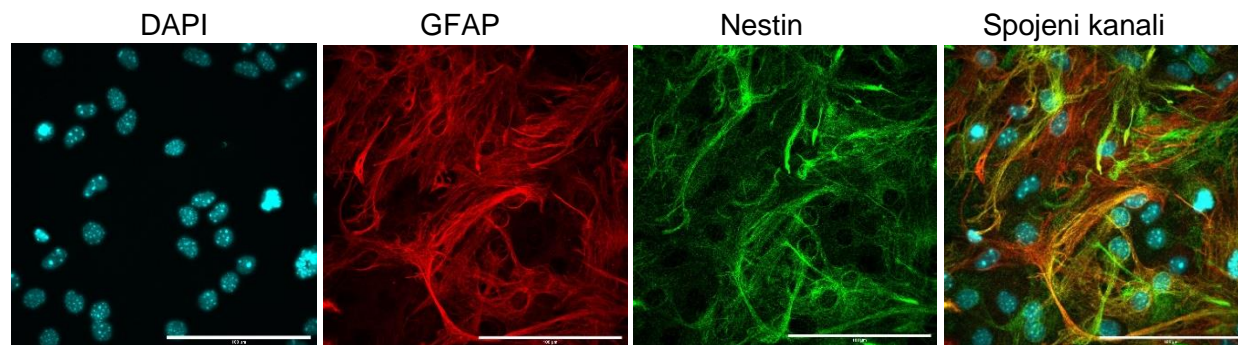
**a) 6 h reoksigenacije
KONTROLNE STANICE**



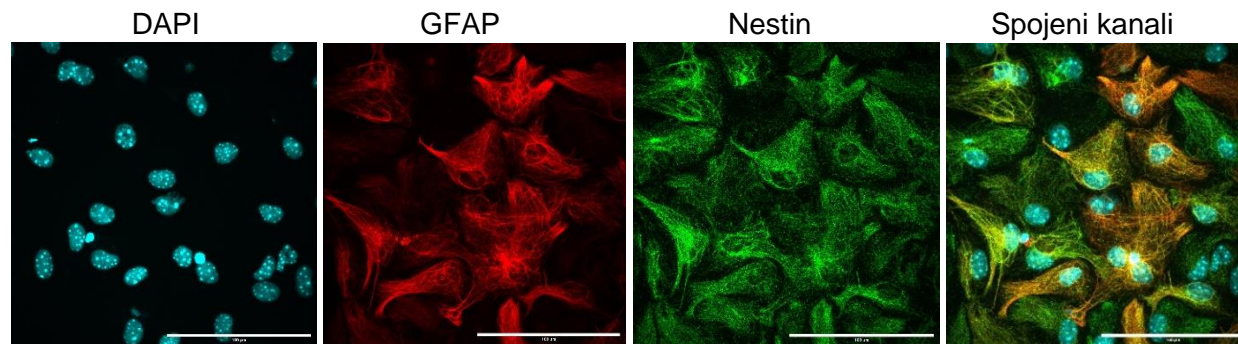
STANICE IZLOŽENE OZLJEDI



**b) 24 h reoksigenacije
KONTROLNE STANICE**



STANICE IZLOŽENE OZLJEDI

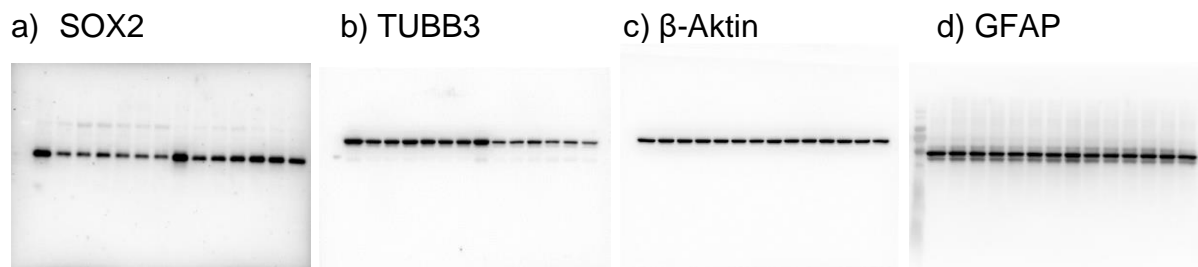


Slika 33. Imunocitokemijska (ICC) analiza nezrelih stanica živčanog sustava izloženih deprivaciji kisika i glukoze (OGD) tijekom 24 h te kratkoj (6 h, a) i dugoj (24 h, b) reoksigenaciji na biljege

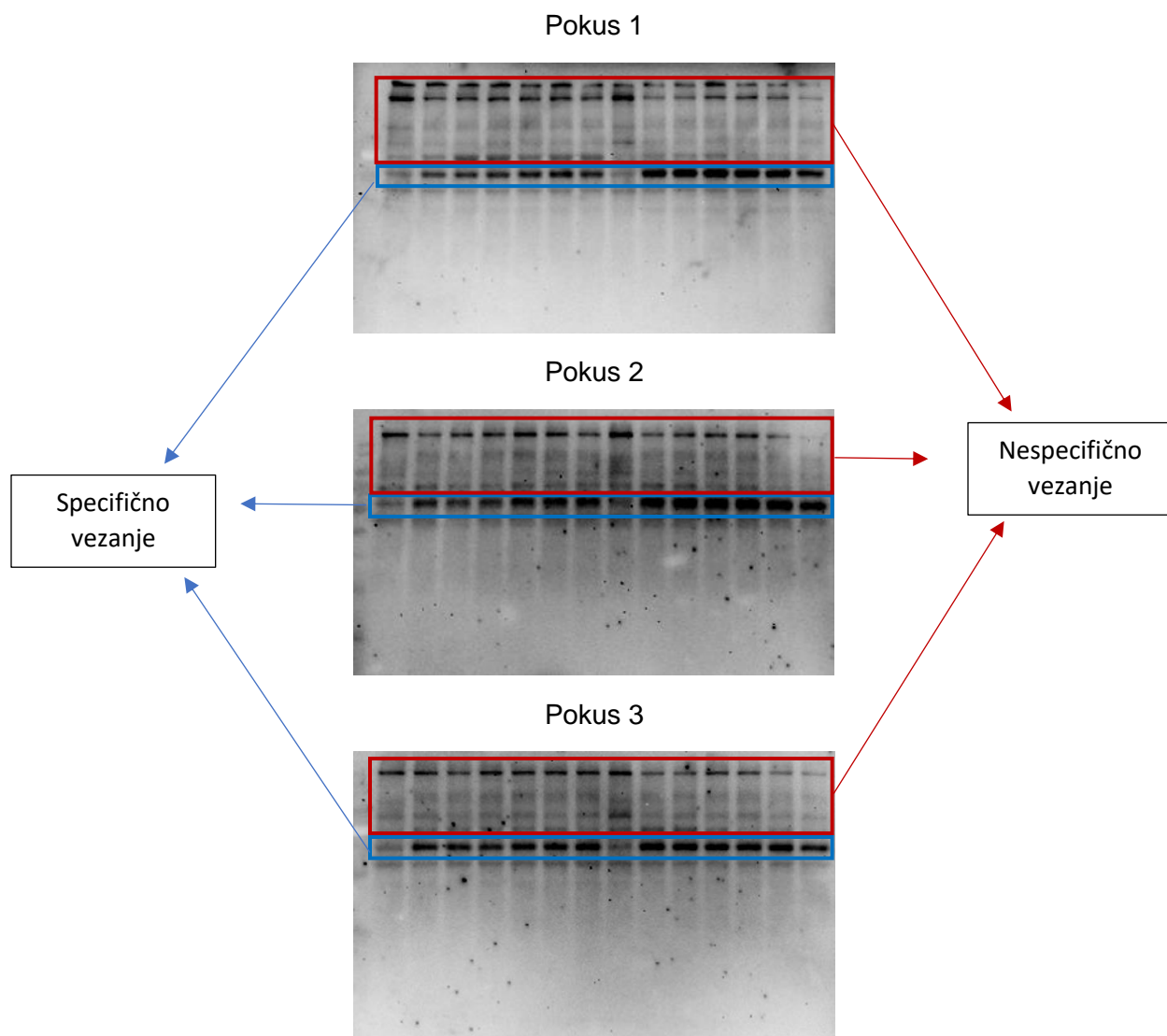
astrociti i živčanih matičnih stanica (ŽMS). Prikazan je biljeg astrociti (GFAP, crveno) i ŽMS (Nestin, zeleno). Kontrolne stanice su izdužene i oba citoskeletna biljega pokazuju filamentoznu strukturu. S druge strane, ozlijeđene stanice su skupljenije, a filamentozna struktura citoskeletnih elemenata teže je uočljiva. Prikazane su reprezentativne slike iz jednog od najmanje dva ponovljena pokusa. Crta mjerila 200 μm .

5.6.2. Imunocitokemijska analiza nekroptoze nije pouzdana zbog postojanja vjerojatnog nespecifičnog vezanja protutijela

U poglavlju rezultata 5.5. prikazani su izrezani dijelovi membrane koji odgovaraju položaju određenog promatranog proteina. Za biljege SOX2, GFAP i TUBB3 nakon inkubacije primarnim i sekundarnim protutijelom, signal je na membranama bio vidljiv uglavnom isključivo na odgovarajućoj visini na membrani koja odgovara težini mjerenoj u kDa za određeni protein (slika 34.). U slučaju protutijela anti-p-MLKL, najintenzivniji signal je bio vidljiv na odgovarajućem mjestu, međutim postojali su i dosta intenzivni signali na drugim visinama što upućuje na moguće nespecifično vezanje protutijela (slika 35.).



Slika 34. Reprezentativne membrane s prikazom vezanja protutijela anti-SOX2 (a), anti-TUBB3 (b), anti- β -Aktin i anti-GFAP (d). U sva četiri slučaja vidljivo je specifično vezanje s protutijela s vrlo malo ili nimalo signala na razinama koje nisu tipične za pojedini protein.

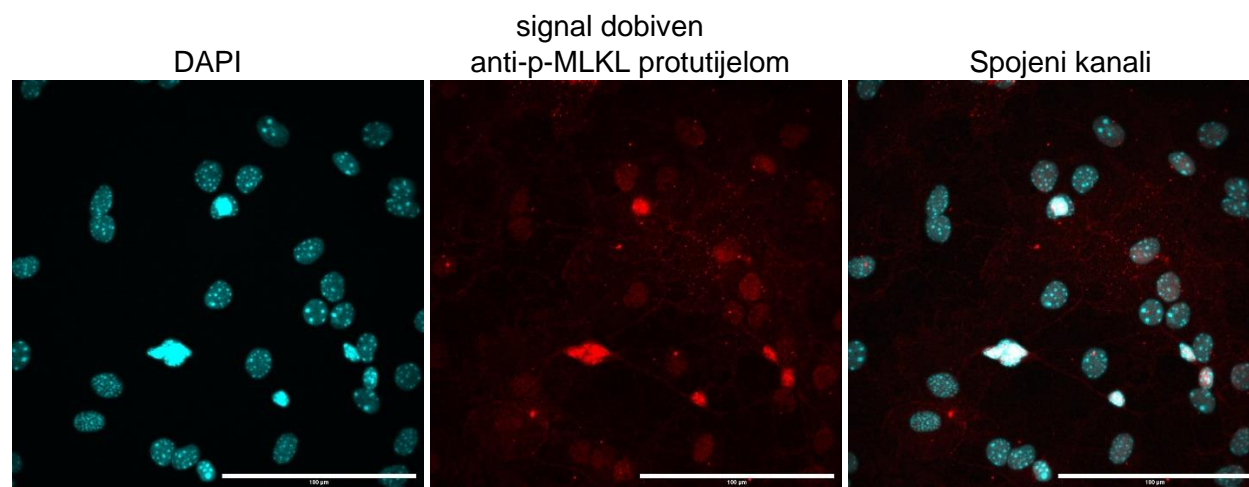


Slika 35. Membrane s prikazom vezanja anti p-MLKL protutijela iz triju neovisnih pokusa. Najintenzivniji signal vidljiv je na oko 55 kDa što odgovara težini proteina p-MLKL. Iznad navedenog signala nalazi se značajan broj dodatnih signala koji vjerojatno predstavljaju nespecifično vezanje protutijela.

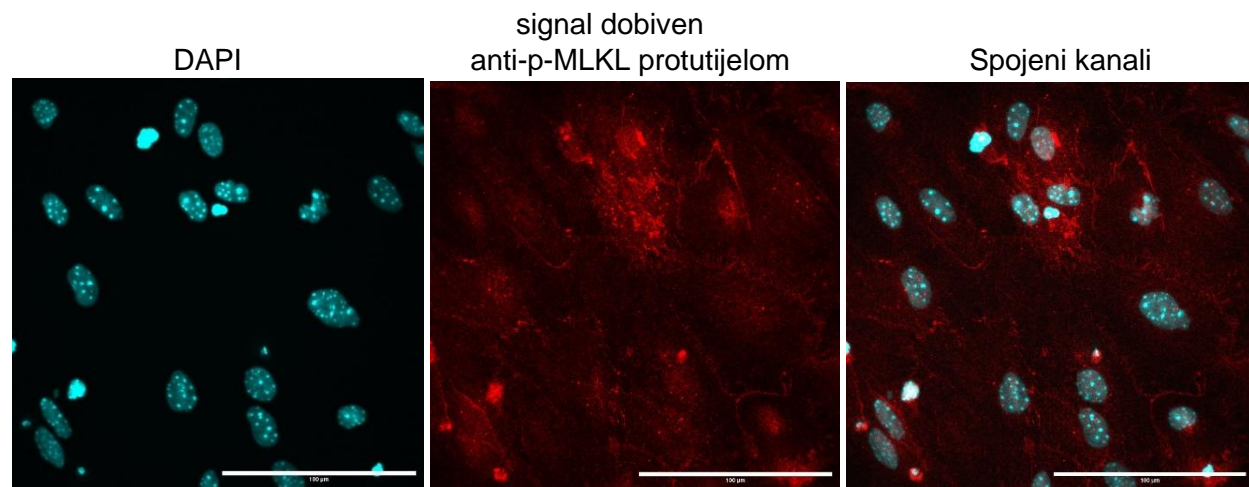
Western blot je jedna od pouzdanijih metoda za određivanje specifičnosti određenog protutijela upravo zbog razdvajanja proteina na temelju težine koji se onda detektiraju protutijelom. Signali koji se dobiju na visinama netipičnim za određeni protein, vrlo često upućuju na nespecifično vezanje. Iz tog razloga, imunocitokemija s protutijelom koje pokazuje nespecifičnost na western blotu najčešće ne može biti pouzdana (98).

Usprkos tome napravljena je imunocitokemija kako bi se utvrdio izgled signala. Slike 36. i 37. pokazuje reprezentativne slike stanica ozlijeđenih OGD-om te fiksiranih ledeno hladnim metanolom nakon 6 h, odnosno 24 h reoksigenacije. Iako je vidljiva razlika u morfologiji signala između kontrolnih i ozlijeđenih stanica, budući da je western blot sugerirao postojanje nespecifičnog vezanja, analiza slika dobivenih imunocitokemijom ne može se smatrati pouzdanom.

6 h reoksigenacije KONTROLNE STANICE

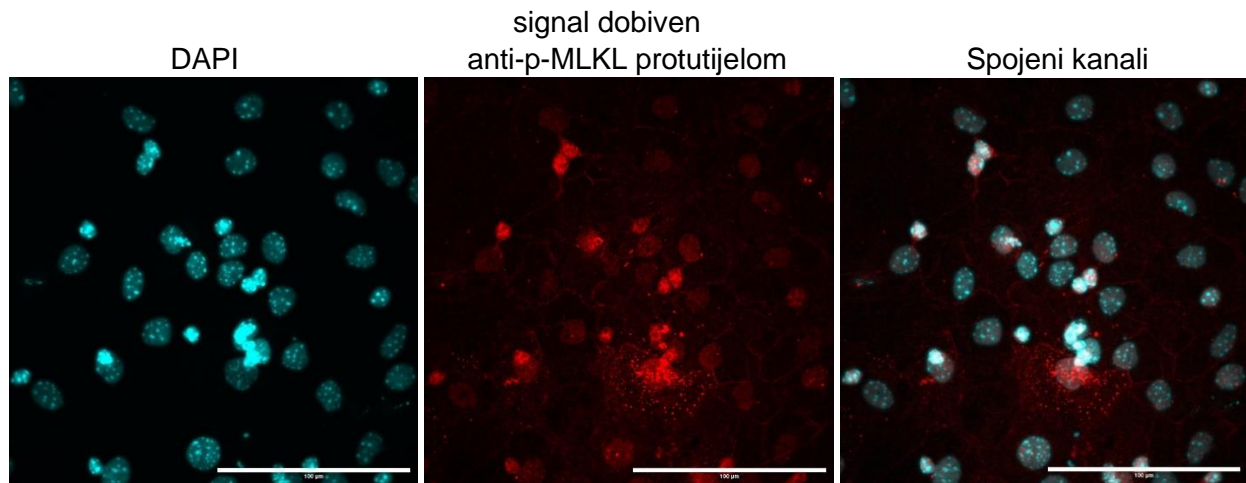


STANICE IZLOŽENE OZLJEDI

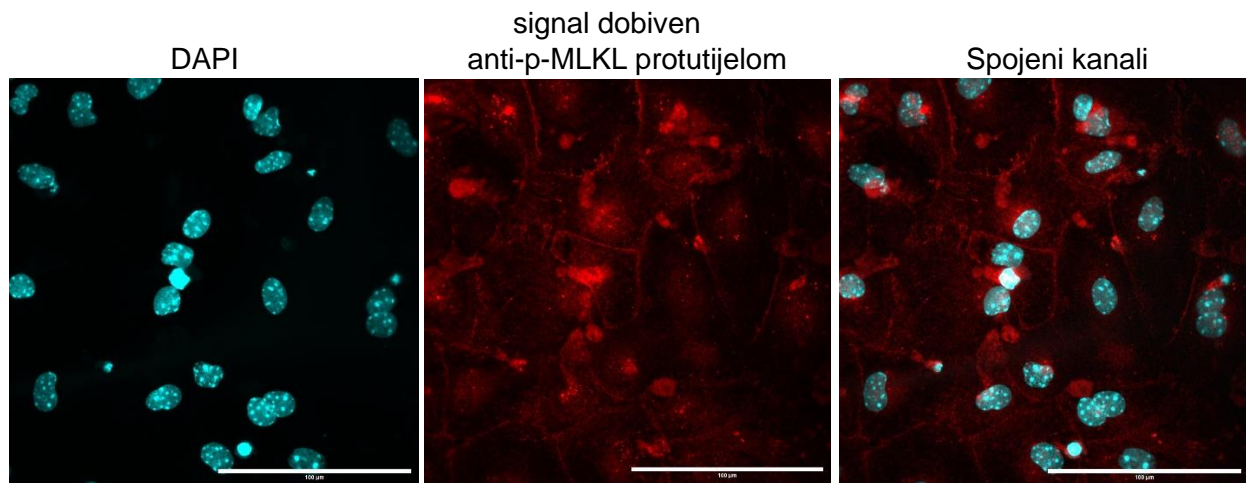


Slika 36. Imunocitokemija s anti-p-MLKL protutijelom na kontrolnim i ozlijeđenim stanicama nakon 6 h reoksigenacije. Iako se vidi morfološka razlika u signalima između kontrolnih i ozlijeđenih stanica, zbog postojanja značajnih neodređenih (vjerojatno nespecifičnih) signala dobivenih na western blotu, analiza ovih signala mogla bi dovesti do pogrešnih zaključaka.

**24 h reoksigenacije
KONTROLNE STANICE**



STANICE IZLOŽENE OZLJEDI



Slika 37. Imunocitokemija s anti-p-MLKL protutijelom na kontrolnim i ozlijeđenim stanicama nakon 24 h reoksigenacije. Iako se vidi morfološka razlika u signalima između kontrolnih i ozlijeđenih stanica, zbog postojanja značajnih neodređenih (vjerojatno nespecifičnih) signala dobivenih na western blotu, analiza ovih signala mogla bi dovesti do pogrešnih zaključaka.

6. Rasprava

6.1. Osmodnevni uzgoj živčanih matičnih stanica miša u mediju s dodatkom 1 % FBS-a predstavlja dobar model nezrelog živčanog sustava

Živčani sustav nastaje prostorno i vremenski strogo reguliranom diobom i diferencijacijom živčanih matičnih stanica (ŽMS), a upravo su samoobnova i diferencijacija osobine iz kojih proizlazi potencijal ŽMS za moguću terapijsku primjenu u obnovi oštećenog tkiva. Brojna pretklinička te i neka klinička istraživanja pokazala su da terapija živčanim matičnim stanicama donosi pozitivne učinke za različite neurološke bolesti kao što su moždani udar, Alzheimerova bolest, multipla skleroza te perinatalna ozljeda mozga (99–103). Preduvjet za takva istraživanja su razvijeni protokoli izolacije i kulture *in vitro* koji omogućavaju uzgoj stanica izvan tijela, istovremeno održavajući njihov potencijal samoobnove i diferencijacije. Bez obzira na brojna objavljena istraživanja, još uvijek postoji mnogo nepoznanica vezanih uz samu biologiju ŽMS te mehanizme njihovog potencijalnog terapijskog djelovanja. Stoga su i dalje potrebna pretklinička istraživanja kako bi se preciznije dizajnirale kliničke studije koje bi mogle dovesti do uporabe ŽMS u terapijske svrhe.

Iako se sve stanice, pa tako i ŽMS ponašaju drugačije kada su u tijelu (*in vivo*) i kada se uzgajaju u kulturi (*in vitro*), uzgoj ŽMS u kulturi daje široki prostor za istraživanje utjecaja raznih manipulacija na biologiju stanica, a posebno na njihovu sposobnost samoobnove i diferencijacije. Manipulacije mogu uključivati promjenu različitih fizikalnih odnosno kemijskih uvjeta kao npr. promjenu temperature ili razine kisika (104), odnosno izlaganje stanica različitim čimbenicima i drugim endogenim ili sintetskim molekulama (105–108). *In vitro* istraživanja daju uvid u moguće procese koji se odvijaju *in vivo*, te su važna za razumijevanje mogućih pozitivnih djelovanja ŽMS u potencijalnim terapijskim primjenama.

U ovom istraživanju ŽMS su izolirane iz telencefalona zametaka miša starih 14.5 dana te su održavane u kulturi u suspenziji, uz dodatak čimbenika rasta, čime je

održavana njihova sposobnost samoobnove. Također, ŽMS smo diferencirali prema astrocitima i neuronima izostavivši čimbenike rasta iz medija te ih nasađujući na podloge presvučene poli-D-lizinom i lamininom. Izostavljanje čimbenika rasta iz medija za diferencijaciju i kontakt s lamininom, prirodnim sastojkom međustanične tvari, vrlo su važni za indukciju diferencijacije (109). Ipak, iskustvo koje smo sakupili u nekoliko godina rada s ovim stanicama nam je pokazalo kako izostanak faktora rasta iz medija za diferencijaciju izaziva značajnu razinu stanične smrti nakon 3. dana diferencijacije. Iako ta pojava vjerojatno ne utječe na sva istraživanja koja se provode na ovim stanicama, u ovom slučaju je to izazvalo problem, budući da je ovo istraživanje primarno posvećeno staničnoj smrti. Stoga smo u prvoj fazi istraživanja bili prisiljeni pronaći protokol koji će omogućiti dovoljno visoko preživljenje stanica u kontrolnim uvjetima. Nakon testiranja različitih varijanti protokola diferencijacije, između ostalog i različitih kombinacija suplemenata, pristup koji je donio značajno unaprjeđenje preživljenja je bio onaj temeljen na dodavanju 1 % FBS-a u medij za diferencijaciju. Iako FBS nema strogo definiran sastav, te iako ga se zbog heterogenosti i potencijalnih razlika između različitih proizvodnih serija (engl. *batches*) pokušava izbjegavati, u našem modelu nezrelih stanica živčanog sustava, učinci FBS-a na preživljenje su bili homogeni i vrlo poželjni. Pregledom literature smo pronašli značajan broj istraživanja koja su ga, vjerojatno iz sličnih razloga također koristila (95,106,110–112). Iz tog razloga smo odlučili u svim pokusima u sklopu ovog istraživanja koristiti protokol za diferencijaciju s 1 % FBS-a.

Populacija stanica koje smo dobili diferencijacijom ŽMS uz dodatak 1 % FBS-a sastojala se od astrocita i neurona, a značajan broj stanica i dalje je izražavao Nestin, marker ŽMS. Razlog tome vjerojatno leži i u samom FBS-u koji sadržava neke faktore rasta koji su dio stanica poticali na diobu održavajući im matičnost.

6.2. Razina kisika utječe na smjer diferencijacije živčanih matičnih stanica, ali ne i na intenzitet stanične smrti

U većini laboratorija i objavljenih istraživanja stanice sisavaca se uzgajaju u inkubatorima u kojima su zadovoljena tri uvjeta: temperatura od 37 °C, 5 % CO₂ te visoka vlaga (bilo aktivnim upuhavanjem vode, bilo s posudom iz koje voda kontinuirano hlapi).

Temperatura imitira tjelesnu temperaturu, visoki volumni udio CO₂ nužan je za održavanje neutralnog pH medija zbog CO₂/HCO₃⁻ puferskog sustava na temelju kojih se bazira većina tipova medija (113), a visoka vlaga smanjuje isparavanje vode iz medija u kojem raste stanice. Kisik u atmosferskom zraku u razini mora zauzima 20.9 % volumnog udjela, dok je u zraku CO₂ inkubatora s vlažnom atmosferom ta koncentracija oko 18.5 % što odgovara parcijalnom tlaku od 160 mmHg odnosno 140 mmHg (114). S druge strane, parcijalni tlak kisika u alveolama iznosi oko 110 mmHg, a dok dođe do pojedinih organa koncentracija mu još značajno pada. Tako npr. u jetri iznosi 30-55 mmHg, u skeletnim mišićima 18-46, u bubregu 15-70 mmHg, te u mozgu 21-47 mmHg (114). Generalno je prihvaćeno da je razina kisika u pojedinim organima oko 2-9 %/14-65 mmHg (115). Dakle, rutinskim uzgojem u inkubatorima s atmosferskom razinom kisika stanice su izložene razini kisika koja je mnogo viša od one u tijelu. Visoka razina kisika (hiperoksija) nije dobra iz više razloga, a jedan od najočitijih je nakupljanja kisikovih radikala koji mogu negativno utjecati na brojne stanične procese (114,116).

Jedno od važnih pitanja na koje smo željeli odgovoriti u ovom istraživanju bilo je trebamo li, sa željom dobivanja što reproducibilnijeg modela nezrelih stanica živčanog sustava, protokol diferencijacije stanica u ambijentalnom kisiku zamijeniti onim s nižom razinom kisika. Stoga smo usporedili diferencijaciju ŽMS u ambijentalnoj (18.5 % O₂) i tkivnoj (5 % O₂) normoksiji određujući relativnu ekspresiju gena specifičnu za pojedine stanične tipove, te mjereći oslobađanje laktat dehidrogenaze (LDH) kao pokazatelja stanične smrti.

Kada smo proučili izražaj nekih gena koji određuju svojstvo matičnosti, jedino *Notch1* u niti jednom od analiziranih dana nije pokazao nikakvu razliku između dva istraživana uvjeta. Istovremeno, *Nestin* je bio pojačano eksprimiran prvi dan diferencijacije u 5 % O₂. S druge strane, dok je prvi dan *Pax6* pokazao tendenciju povećanja ekspresije u 5 % O₂, statistički značajno pojačanu ekspresiju pokazao je osmi dan diferencijacije. Dakle, dva od tri istraživana gena koji određuju matičnost su bila pojačano eksprimirana barem u nekim stadijima diferencijacije. Važno je naglasiti kako je pojačana ekspresija *Pax6* gena zabilježena za vrijeme kortikogeneze (117), a naši rezultati također su pokazali kako pojačanu ekspresiju *Pax6* u 5 % O₂ prati i pojačana

ekspresija neuronalnih biljega. Naime, *Mapt* bio je pojačano eksprimiran u sva 3 analizirana dana, dok su *Map2* i *Dcx* bili pojačano ekprimirani prvi i osmi dan diferencijacije. Pojačana ekspresija neuronalnih biljega u 5 % kisika je u skladu s objavljenim istraživanjima, a koja su također pokazala kako smanjena razina kisika (3-6 % kisika) potiče diferencijaciju prema neuronima (118). Što se tiče biljega astrocita, *Gfap* je statistički značajnu pojačanu ekspresiju pokazao četvrti, a *S100b* prvi i četvrti dan diferencijacije s tendencijom povećanja ekspresije osmi dan diferencijacije u 5 % O₂. Navedeni rezultati također su u skladu s objavljenim istraživanjima od kojih su neka pokazala da diferencijacija ŽMS u 3-5 % kisika potiče diferencijaciju prema astrocitima u usporedbi s diferencijacijom u ambijentalom kisiku, dok su pak neka druga istraživanja pokazala da razina kisika ne utječe na izražaj biljega astrocita (118). Kako smo u ovom istraživanju posebnu pozornost dali staničnoj smrti po tipu nekroptoze, proučili smo izražaj gena uključenih u taj signalni put: *Ripk1*, *Ripk3* i *Mikl*. Jedinu razliku, i to u obliku smanjenja ekspresije u 5 % O₂ pokazao je *Mikl*, ali samo prvi dan, dok u kulturi raste homogena populacija vrlo ranih preteča stanica živčanog sustava. Važno je spomenuti kako ekspresija gena *Mikl* može, ali i ne mora biti indikacija intenziteta nekroptoze jer ja za nekroptozu ključna fosforilacija proteina MLKL. Mjereći intenzitet stanične smrti postotkom oslobođene laktat dehidrogenaze (LDH), nisu nađene statistički značajne razlike između ambijentalnog i 5 % kisika u niti jednom od promatrana dana, iako je postojala stalno prisutna tendencija smanjenja postotka oslobođene LDH u 5 % O₂. Istovremeno je nađeno kako se ukupna razina LDH u 5 % povećala, što navodi na potrebu opreza u tumačenju rezultata. Tendencija povećanja ukupne LDH u 5 % mogla bi ukazivati na povećani broj stanica, tj. njihovu pojačanu proliferaciju, a što bi bilo u skladu s objavljenim istraživanjima (95,119).

Nakon navedene usporedbe ambijentalne i tkivne normoksije zaključili smo kako nije nađena značajna razlika u intenzitetu stanične smrti između ta dva uvjeta. Istovremeno bi tkivnom normoksijom postigli pojačan izražaj nekih gena uključenih u nastanak neurona, što bi moglo biti poželjno, ali ne i ključno za naš model. Budući da se prigodom izmjene medija stanice koje iz tkivne normoksije dolaze u ambijentalne uvjete izlažu fluktuacijama u razini kisika, što donosi značajnu ne-fiziološku varijablu, odlučili

smo za daljnje pokuse u kojima smo proučavali staničnu smrt koristiti samo ambijentalnu razinu kisika.

6.3. Izazivanje nekroptoze u modelu nezrelih stanica živčanog sustava zahtjeva istovremenu deprivaciju kisika i glukoze

Iako su neki radovi pokazali kako smanjenje razine kisika na 1 % uzrokuje pojačano odumiranje stanica (95), u našem slučaju, mjerenjem oslobađanja laktat dehidrogenaze (LDH), te western blot analizom pokazali smo da izlaganje nezrelih stanica živčanog sustava smanjenoj razini kisika od 1 % (hipoksija) tijekom 24 h nije bilo dovoljno za izazivanje značajnije stanične ozljede. U ovom istraživanju smo tražili način kako izazvati nekroptozu, čiji je biljeg protein p-MLKL, kako bi mogli promatrati utjecaj pojedinih tretmana na izražaj navedenog biljega. Jednako kao i u slučaju mjerenja intenziteta stanične smrti, sama hipoksija nije bila dovoljna za izazivanje jasne pojačane ekspresije proteina p-MLKL pokazane western blotom. Međutim, kada smo, uz smanjenje kisika, stanice izložili i deprivaciji glukoze (OGD, 1 % O₂, medij bez glukoze, od engl. *oxygen glucose deprivation*), signal proteina p-MLKL na western blotu postao je jasan i uočljiv. U skladu s time, značajnije odumiranje stanica izazvano deprivacijom kisika i glukoze dodatno je potvrđeno mjerenjem oslobađanja LDH kao pokazatelja intenziteta stanične smrti. Time je pokazano kako je u našem modelu nezrelih stanica živčanog sustava za pokretanje nekroptoze potrebna deprivacija kisika i glukoze, te je u ostatku ovog istraživanja posvećenog nekroptozu korišten taj pristup.

6.4. Necrostatin-1s ne smanjuje izražaj proteina p-MLKL u modelu nezrelih stanica živčanog sustava

RIPK1 je prva molekula koja je otkrivena u signalnom putu nekroptoze (59), a u istom radu u kojem se riječ „nekroptoza“ prvi puta koristi, otkriven je inhibitor Necrostatin-1 (Nec-1) koji blokira kinaznu aktivnost RIPK1 (60). Danas je nekroptoza definirana kao regulirana stanična smrt koja je ovisna o proteinu MLKL, o kinaznoj aktivnosti RIPK1 (u nekim slučajevima) te RIPK3 (57). Nova definicija proizlazi iz istraživanja koja pokazuju da postoje načini aktivacije nekroptoze, točnije fosforilacije proteina MLKL koji ne uključuju kinaznu aktivnost RIPK1. Štoviše, pomalo paradoksalno, RIPK1 u određenim

slučajevima sprječava aktivaciju nekroptoze (120), pa je tako genetičkim studijama na C57BL/6/Ripk1 -/- miševima koji umiru kod poroda od sistemske upale, pokazano smanjenje upale delecijom *Ripk3* ili *Mlkl* (121). U skladu s time, iako se Necrostatin-1 pokazao kao efikasan inhibitor nekroptoze u mnogim slučajevima modela različitih bolesti kao što su upalne, kardiovaskularne i neurološke bolesti (122–125), njegova prisutnost nije uvijek dovoljna za smanjenje intenziteta nekroptoze (126). Naime, pokazano je da Nec-1 nije smanjio izražaj proteina p-MLKL u stanicama izloženima jakom osmotskom stresu te da je kinazna aktivnost RIPK3 direktno aktivirana povećanjem pH citosola (127). U našem istraživanju, Nec-1s, stabilniji i selektivniji Nec-1 analog (128), također nije smanjio izražaj proteina p-MLKL niti tijekom kratke (6 h) niti tijekom duge (24 h) reoksigenacije koje su slijedile nakon deprivacije kisika i glukoze (OGD). Ovo jasno sugerira da i u našem slučaju glavna aktivacija nekroptoze nije išla putem RIPK1. Kako je pokazano da reaktivni kisikovi radikali mogu aktivirati nekroptozu neovisno o RIPK1 (126), a zasigurno su obilno prisutni nakon deprivacije kisika i glukoze, oni bi i u našem slučaju mogli biti jedan od glavnih aktivatora ovog načina stanične smrti. Također, u našem istraživanju tretman s Nec-1s nije imao nikakav utjecaj na izražaj preostalih analiziranih proteina koji su uključivali SOX2 (biljeg ŽMS), GFAP (biljeg astrocita) te TUBB3 (biljeg neurona).

6.5. Tretman živčanim matičnim stanicama ne utječe na izražaj proteina p-MLKL, ali utječe na TUBB3 i SOX2

U ovom istraživanju, stanice koje su bile izložene deprivaciji kisika i glukoze (OGD) nastale su diferencijacijom živčanih matičnih stanica (ŽMS) tijekom 8 dana. Imunocitokemijska (ICC) analiza pokazala je da osim ranih neurona (MAP2, TUBB3 i NF-H, NF-M) i astrocita (GFAP) u dobivenoj populaciji stanica i dalje značajan broj stanica eksprimira Nestin, biljeg ŽMS. Kako se radi o ne posve zrelih stanicama živčanog sustava, naš model odgovara perinatalnoj-neonatalnoj hipoksiji-ishemiji. To je patološko stanje koje pogađa 3-12 od 1000 novorođenčadi koje osim smrti može uzrokovati teške invaliditete (129). Terapijske mogućnosti za perinatalnu ishemijsku su vrlo ograničene, a jedini donekle definiran pristup uključuje terapijsku hipotermiju. Iako u mnogim

slučajevima hipotermija pomaže, očito su potrebni novi pristupi koji bi zamijenili ili poboljšali trenutne domete ovog pristupa (42).

U ovom istraživanju, nezrele stanice živčanog sustava koje su bile izložene 24-satnoj deprivaciji kisika i glukoze (OGD), neposredno nakon ozljede tretirane su egzogenim ŽMS ili kondicioniranim medijem u kojem su rasle matične stanice. Utjecaj svih navedenih tretmana promatran je nakon kratke (6 h) i duge (24 h) reoksigenacije analizirajući izražaj biljega nekroptoze (p-MLKL), ŽMS (SOX2), neurona (TUBB3) i astrocita (GFAP) metodom western blot. U slučaju egzogeno dodanih ŽMS, ozlijeđene stanice i ŽMS bile su u ko-kulturi odvojene tankom membranom u kojoj su pore bile dovoljno male da stanice ne mogu proći kroz njih, a dovoljno velike da mogu proći različite stanične vezikule (npr. egzosomi) i pojedinačne molekule. Prema tome, iako stanice nisu u direktnom kontaktu, međusobno komuniciraju preko medija pa tako egzogeno dodane ŽMS mogu utjecati na ozlijeđene stanice i obrnuto. U slučaju dodanog kondicioniranog medija, radi se o mediju u kojem se nalaze komponente izlučene za vrijeme rasta tj. proliferacije ŽMS. Tu razliku važno je imati na umu prilikom interpretacije rezultata.

Izražaj biljega nekroptoze bio je značajno povećan u ozlijeđenim stanicama u usporedbi s kontrolom, a povećanje ekspresije bilo je izraženije nakon 24 h nego nakon 6 h reoksigenacije. Niti egzogeno dodane ŽMS niti kondicionirani medij nisu smanjili izražaj proteina p-MLKL tijekom 6 h ili 24 h reoksigenacije. Također, mjereći oslobađanje laktat dehidrogenaze (LDH) nakon 24 i 48 h reoksigenacije, kondicionirani medij nije pokazao djelovanje na smanjenje stanične smrti. Oslobađanje LDH nije mjereno u skupini u koje su dodane egzogene matične stanice jer, kako se nalaze u istom mediju, ne bi bilo moguće razlikovati LDH oslobođenu od strane ozlijeđenih stanica od LDH oslobođene od strane egzogeno dodanih ŽMS. Iako ovi rezultati nisu pokazali pozitivan učinak stanica na nekroptozu, zanimljivi rezultati su dobiveni analizom biljega pojedinih staničnih tipova.

Kod analize učinka potencijalnog terapijskog pristupa, vrlo je važno dobiti širu sliku njegovog djelovanja. Naime, pojedini terapijski pristupi, iako možda i poboljšavaju ishod bolesti, imaju ograničeno djelovanje jer uglavnom ciljaju jedan signalni put ili imaju protektivan učinak na jedan stanični tip. Iz tog razloga, u slučaju bolesti s kompleksnom patofiziologijom, u što svakako spada i perinatalna-neonatalna hipoksija-ishemija, često

se razmatra kombinacija različitih lijekova (engl. *drug combination therapy*) zbog kumulativnog protektivnog učinka (130–132). Zbog navedenih razloga, u ovom istraživanju fokusirali smo se i na biljege pojedinih staničnih tipova.

SOX2 je transkripcijski faktor koji je vrlo važan za samoobnovu ŽMS (133). Mutacije SOX2 gena dovode do različitih poremećaja središnjeg živčanog sustava uključujući intelektualne poremećaje, probleme s vidom i kontrolom pokreta (134). U našem istraživanju, OGD s kratkom (6 h) reoksigenacijom izazvala je pad ekspresije proteina SOX2 na oko 30 % kontrolne vrijednosti, dok je nakon duže reoksigenacije (24 h) izražaj bio na oko 40 % kontrolne vrijednosti što ukazuje na mogući spontani blagi oporavak tijekom duže reoksigenacije. Iako ko-kultura ozlijeđenih stanica s egzogenim ŽMS nije pokazala značajne promjene u izražaju proteina SOX2, kondicionirani medij iz ŽMS dao je rezultate koji privlače pozornost. Naime, nakon 6 h reoksigenacije izražaj proteina SOX2 je bio smanjen, a nakon 24 h povećan u grupi stanica kojoj je dodan kondicionirani medij u usporedbi s grupom stanica kojoj je dodan kontrolni medij (medij za uzgoj ŽMS). Objašnjenje za takav rezultat moglo bi biti u kratkotrajnom pozitivnom utjecaju čimbenika rasta (EGF i bFGF) iz kontrolnog medija, a čija je koncentracija u kondicioniranom mediju vjerojatno bila značajnije niža jer su ga ŽMS potrošile. S druge strane, molekule iz kondicioniranog medija koje su proizvele ŽMS očito su trebale duže vrijeme za djelovanje što se vidi kao povećanje ekspresije SOX2 za oko 20 % u odnosu na kontrolni medij nakon 24 h reoksigenacije. Nakon 24 h i ko-kultura s ŽMS pokazala je trend povećane ekspresije, ali nije dosegla statističku značajnost. Favaro i sur. pokazali su da ŽMS kojima je deletiran gen *Sox2* imaju vrlo ograničen kapacitet samoobnove koji se značajnije poboljšava dodavanjem kondicioniranog medija iz ŽMS divljeg tipa (135). Naši rezultati sugeriraju da se pozitivno djelovanje kondicioniranog medija manifestira u obliku povećanja ekspresije SOX2 čime se pozitivno djeluje na sposobnost samoobnove ŽMS nakon ozljede. Kako je aktivnost SOX2 važna za normalan razvoj živčanog sustava, od izuzetne je važnosti naći terapijske strategije kojima se oporavlja ekspresija ovog transkripcijskog čimbenika nakon ozljede. Ovo istraživanje sugerira kako je kondicionirani medij (tj. određene molekule koje izlučuju ŽMS) jedan od mogućih pristupa kojim se može postići oporavak izražaja SOX2.

β 3-Tubulin (TUBB3) je pokazao u potpunosti suprotan obrazac ekspresije, u kratkoj odnosno dugoj reoksigenaciji u usporedbi sa SOX2. Nakon kratke reoksigenacije (6 h) ekspresija TUBB3 pala je na oko 60 % kontrolne vrijednosti, a taj pad bio je još značajniji nakon duge reoksigenacije kada je iznosio manje od 30 % kontrolne vrijednosti. Dakle, dok je duža reoksigenacija utjecala na spontani oporavak ekspresije SOX2, izazvala je značajan pad TUBB3, biljega neurona. Zanimljivo je kako je ko-kultura s egzogenim ŽMS pozitivno utjecala na TUBB3 nakon kratke (6 h) reoksigenacije povećavajući njegovu ekspresiju za oko 10 %, međutim taj utjecaj nije bio vidljiv i nakon 24 h reoksigenacije.

Izražaj proteina GFAP, biljega astrocita, pokazao je blagi pad u ozlijeđenim stanicama nakon kratke i duge reoksigenacije u usporedbi s kontrolnim stanicama, iako statistička analiza nije pokazala značajnost što ukazuje na veću rezistentnost navedenog biljega na ozljedu u usporedbi sa SOX2 i TUBB3. Također, niti jedan od tretmana u niti jednoj od promatranih vremenskih točki nije utjecao na promjenu ekspresije proteina GFAP.

U zaključku ovog dijela možemo ponovo uočiti kako kondicionirani medij nije utjecao na smanjenje izražaja biljega nekroptoze, niti na smanjenje intenziteta stanične smrti u promatranom modelu OGD ozljede. Istovremeno medij je utjecao na povećanje izražaja proteina SOX2 nakon 24 h reoksigenacije, što je važan podatak u pokušajima pronalaženja novih pristupa koji potiču samoobnovu ŽMS. Također, egzogeno dodane ŽMS nisu utjecale na izražaj biljega nekroptoze, međutim povećale su izražaj biljega neurona (TUBB3), nakon kratke (6 h) reoksigenacije.

Iako su ŽMS u mnogim istraživanjima pokazale protektivan učinak na ozlijeđene stanice, važno je imati na umu kako učinak ovisi o mnogim elementima kao što su tip stanica, tip ozljede, duljina ozljede, duljina tretmana te način tretmana. Stanice koje smo koristili u našem istraživanju bile su stanice živčanog sustava nastale diferencijacijom ŽMS tijekom 8 dana. Stoga su navedenu populaciju, koja je predstavljala model nezrelog živčanog sustava, činili rani neuroni, rani astrociti, a dio stanica je i dalje izražavao Nestin, biljeg ŽMS. Jedna od značajnih razlika ovog istraživanja u odnosu na druga jest što su do sada objavljeni radovi koji su pokazali protektivan matičnih stanica ili nekog drugog

tretmana na OGD izazvanu nekroptozu, ili na smanjenje nekog drugog oblika stanične smrti, rađeni na primarnim neuronima ili na staničnim linijama (136–138). Različite stanice pokazuju različitu osjetljivost na OGD, pa iako je u nekim istraživanjima, kao i u našem OGD (1 % O₂, medij bez glukoze) trajao 24 h (137), u većini slučajeva je bio korišten kraći OGD (2-6 h) često deklariranom razinom kisika od 0 % (139–143). Mi smatramo kako je deklariranje potpunog izostanka kisika problematično, jer kao prvo ne odgovara biološkoj situaciji, kada uvijek postoji neka ostatna minimalna difuzija bez obzira na stupanj prekida krvotoka, te i zbog činjenice kako bez obzira na tehnologiju naprednih inkubatora, senzori teško mogu razlikovati iznimno niske koncentracije kisika. Dok je 1 % moguće postići vrlo pouzdano, 0 % ne mora značiti da uopće nema kisika. Što se tiče vremena promatranja utjecaja tretmana, i oni se dosta razlikuju. Dok se *in vivo* utjecaj tretmana gleda u vremenu mjenom u danima, *in vitro* je to mjereno u satima, najčešće od nekoliko sati pa do 24 h ili 48 h (141,144–149). Također, na mjerene parametre može utjecati i broj ŽMS koji se dodaje u kokulturu, pa i koncentracija kondicioniranog medija koja ovisi o koncentraciji ŽMS koje su u njemu rasle. Sve su to varijable koje utječu na krajnji učinak. Međutim, iako postoji mnogo istraživanja kojima se pokazuje pozitivan efekt matičnih stanica u određenim modelima bolesti, jednako je važno objaviti istraživanja kojima se pokazuju uvjeti u kojima matične stanice ne daju željeni pozitivan ishod. Takvi su podaci iznimno bitni za pripremu i dizajniranje uspješnih kliničkih studija.

6.6. Imunocitokemijska analiza otkriva očekivane morfološke razlike između kontrolnih stanica i stanica izloženih deprivaciji kisika i glukoze

Kako bi provjerili utjecaj OGD na izgled stanica, stanice su fiksirane nakon 6 h i 24 h reoksigenacije i napravljena je imunocitokemija (ICC) na biljeg ŽMS (Nestin), biljege dendrita (MAP2) i aksona (NF-H, NF-M) neurona te na biljeg astrocita (GFAP). Napravljena je i ICC na p-MLKL, ali to je diskutirano u idućem poglavlju. U skladu s rezultatima dobivenim western blotom i analizom oslobođenja LDH kao pokazatelja stanične smrti, na ozlijeđenim stanicama su uočene razlike u usporedbi s kontrolnim stanicama. Neuron i njihovi nastavci bili su značajnije malobrojniji u ozlijeđenim stanicama u usporedbi s kontrolnim. To je bilo i očekivano, a i ostali autori koji u

istraživanjima koriste OGD kako bi izazvali ozljedu navode značajno oštećenje neurona zabilježeno imunocitokemijom (140,150). S druge strane, stanice koje su bile pozitivne na Nestin te one pozitivne na GFAP u ozlijeđenim stanicama djelovale su skupljeno u odnosu na kontrolu što je moguća posljedica odljepljivanja i skupljanja nastavaka. Navedeni rezultati ICC bili su još jedna potvrda intenziteta ozljede.

6.7. Imunocitokemijska analiza s anti-p-MLKL protutijelom nije pouzdana zbog postojanja vjerojatnog nespecifičnog vezanja na western blotu

Western blot je jedna od najkorištenijih metoda za detekciju i/ili relativnu kvantifikaciju specifičnih proteina iz lizata stanica ili tkiva. Temelji se na razvlačenju denaturiranih proteina kroz gel, prijenosu proteina iz gela na membranu, te detekciji proteina na membrani uz pomoć određenih protutijela. Protutijela koja prepoznaju određeni protein mogu prepoznati jedan ili više njegovih epitopa pa govorimo o monoklinalnom, odnosno poliklinalnim protutijelima. Osim epitopa ciljanog proteina, protutijela se mogu nespecifično vezati (engl. *cross-reactivity*), pogrešno prepoznajući slične epitope drugih proteina. Obrazac vezanja protutijela na proteine određenih stanica ili tkiva može biti vrlo različit upravo zbog različitosti proteina koji se sintetiziraju. Prema tome, ako se određeno protutijelo pokazalo dobrim na jednom tipu staničnog ili tkivnog lizata, ne znači da će jednako dobro raditi na ostalim testiranim lizatima (151). Ukoliko je koncentracija ciljanog proteina niska u cjelokupnom proteinskom lizatu, a protutijelo se veže nespecifično, signal koji će se detektirati na membrani, osim specifičnog, može uključivati i nespecifično vezanje. Nespecifično vezanje na membrani se može vidjeti kao signal na visini, odnosno masi, koja je neočekivana za određeni protein. Međutim, tu treba biti oprezan jer ukoliko detektirani signal odgovara masi koja je veća od mase ciljanog proteina, može se raditi o posttranslacijskim modifikacija ili proteinskim kompleksima koje stvara ciljani protein (151). S druge strane, signal koji se nalazi na masi manjoj od očekivane, uz nespecifično vezanje može upućivati i na proteolitičko cijepanje ciljanog proteina. Sve navedeno važno je imati na umu za pravilnu interpretaciju signala dobivenog na western blotu, posebice kada se istražuju proteini u stanicama u kojima ih nitko prije nije istraživao.

U ovom istraživanju western blot metodom detektirani su proteini p-MLKL, TUBB3, GFAP i SOX2, a kao endogena kontrola za normalizaciju dobivenog signala služio je β -Aktin. Za sve navedene proteine osim p-MLKL, signal koji je dobiven na membranama bio je vrlo čist, tj. signali su bili lokalizirani na očekivanoj masi, dok signali na drugim masama nisu postojali ili su bili vrlo blijedi. U slučaju p-MLKL proteina, signal je bio vidljiv na očekivanoj masi od oko 55 kDa te je bio mnogo jači u ozlijeđenim stanicama u usporedbi s kontrolnima što je i očekivano za biljeg stanične smrti. Međutim, uz očekivane signale, pronađeni su i neki signali na razinama koje odgovaraju proteinima veće mase, što, kako je opisano u prethodnom odlomku, može upućivati na nespecifično vezanje ili postranslacijske modifikacije. Iz tog razloga treba biti vrlo oprezan s korištenjem navedenog protutijela u svrhu imunocitokemije na stanicama koje pokazuju takav obrazac signala na western blotu.

Imunocitokemija (ICC) se također temelji na detekciji određenih proteina uz pomoć protutijela, ali u ovom slučaju proteini se detektiraju u samim stanicama koje su fiksirane. Postoje različite metode fiksacije, a većina fiksativa djeluje na jedan od dva osnovna principa: stvara unakrsne veze između proteina, kao što je to slučaj kod paraformaldehida (PFA), ili dehidrirajući uzorak precipitirajući proteine, što je način djelovanja metanola (152). Prednost ICC u odnosu na western blot je mogućnost lokalizacije proteina u pojedinom tipu stanice. S druge strane, western blot omogućava razdvajanje proteina na temelju mase što omogućava detekciju proteina na očekivanoj molekularnoj masi. Ostalim mogućim signalima koji se nalaze ispod ili iznad očekivane mase ciljanog proteina treba pristupiti s oprezom. S obzirom na to, western blot se često navodi kao obavezna metoda provjere specifičnosti protutijela prije korištenja u svrhu imunocitokemije, odnosno imunohistokemije (98,153). Iako su proteini koji se detektiraju western blot denaturirani, a kod ICC fiksirani, pa dostupnost epitopa u ta dva slučaja može biti drukčija (151), vrlo često protutijela koja pokazuju specifično vezanje na western blotu, isto pokazuju i na ICC/IHC, a protutijela koja su manje specifična na western blotu također su manje specifična i na ICC/IHC (92). U ovom istraživanju, protutijela anti-SOX2, anti-TUBB3 i anti GFAP korištena su i za western blot i za ICC. Sva tri protutijela pokazala su vrlo dobru specifičnost na western blotu što se očitivalo kao signal na očekivanoj masi. Također, sva tri protutijela pokazala su vrlo dobru specifičnost na ICC vezanjem na

očekivana područja u stanicama, tj. određene tipove stanica. SOX2 je bio lokaliziran u jezgri kako je i očekivano s obzirom na to da je transkripcijski faktor. TUBB3, tip mikrotubula karakterističan za neurone, bio je lokaliziran u nastavcima stanica koje morfološki odgovaraju neuronima. GFAP, filament karakterističan za astrocite bio je lokaliziran uglavnom u izduženim stanicama u kojima se pod najvećim povećanjem čak mogla vidjeti i njegova filamentozna struktura. S druge strane, iako su signali na ICC s anti-p-MLKL protutijelom pokazali razliku u morfologiji i lokalizaciji između ozlijeđenih i kontrolnih stanica, treba biti vrlo oprezan s interpretacijom opaženih rezultata. Kako su s anti-p-MLKL protutijelom na western blotu osim signala na očekivanoj masi, dobiveni i drugi signali za koje ne znamo što su, na ICC na kojoj ne znamo masu detektiranih proteina ne možemo odvojiti specifični signal od ostalih signala. To je još više zakomplicirano činjenicom da je za p-MLKL pokazano da osim u citoplazmi, može biti lokaliziran i u jezgri stanica (154,155). Iako smo se u ovom istraživanju približili razini pouzdanosti koliko je god to bilo moguće, pa smo, uz western blot, izradili i ICC na stanicama fiksiranima metanolom (92), usporedba dobivenih fotografija nam nije pružila mogućnost analize koja bi donijela pouzdane rezultate.

7. Zaključci

1. Osmodnevena diferencijacija živčanih matičnih stanica (ŽMS) miša dovodi do prisutnosti glavnih biljega neurona (MAP3, TUBB3) i astrocita (GFAP), iako je još uvijek u nekim stanicama prisutan Nestin, biljeg ŽMS. Time je uspostavljen *in vitro* model nezrelih stanica živčanog sustava, što je bio preduvjet za uspostavu *in vitro* modela perinatalne hipoksije-ishemije.
2. Značajno smanjenje stanične smrti tijekom osmodnevne *in vitro* diferencijacije živčanih matičnih stanica u kontrolnim uvjetima postignuto je dodatkom 1 % FBS-a u medij za diferencijaciju.
3. Diferencijacija živčanih matičnih stanica u tkivnoj normoksiji (5 % O₂) ne poboljšava njihovo preživljenje, ali povećava izražaj pojedinih biljega ŽMS, neurona i astrocita.
4. Nekroptozu u modelu nezrelih stanica živčanog sustava nije moguće izazvati samom hipoksijom (1 % O₂) tijekom 24 h, već je za aktivaciju nekroptoze potrebna i dodatna deprivacija glukoze (OGD).
5. Necrostatin-1s, inhibitor kinazne aktivnosti RIPK1, ne smanjuje intenzitet nekroptoze izazvane deprivacijom kisika i glukoze (OGD) mjereno izražajem proteina p-MLKL u nezrelim stanicama živčanog sustava, što sugerira kako aktivacija nekroptoze u ovom staničnom modelu nije posredovana kinazom RIPK1.
6. Niti egzogeno dodane živčane matične stanice niti kondicionirani medij ne smanjuju intenzitet nekroptoze, izazvane deprivacijom kisika i glukoze (OGD) u nezrelim stanicama živčanog sustava.
7. Egzogeno dodane matične stanice su donijele dobrobit nakon 6 h reoksigenacije u obliku povećanja izražaja biljega neurona TUBB3, a njihov kondicionirani medij je nakon 24 h reoksigenacije potaknuo povećan izražaj SOX2, proteina važnog za staničnu samoobnovu.

8. Sažetak

Hipoksijsko-ishemijska ozljeda mozga u perinatalnom periodu je jedan od najčešćih uzroka cjeloživotnog invaliditeta. U ovom radu smo istražili ulogu stanične smrti po tipu nekroptoze u hipoksijsko-ishemijskom oštećenju stanica živčanog sustava, te ulogu živčanih matičnih stanica u oporavku. Prvi cilj je bio uspostaviti pouzdan model nezrelih stanica živčanog sustava, što je postignuto osmodnevnom diferencijacijom živčanih matičnih stanica miša. Usporedba diferencijacije stanica u ambijentalnoj (20 % kisika) i tkivnoj normoksiji (5 % kisika) je pokazala kako tkivna normoksija povećava izražaj nekih gena vezanih uz matičnost, te onih koji određuju identitet neurona i astrocita. Također smo pokazali kako hipoksija (1 % kisika) u trajanju od 24 h nije dovoljna za pokretanje nekroptoze u nezrelim stanicama živčanog sustava, već je za aktivaciju tog oblika stanične smrti potrebna istovremena deprivacija glukoze (OGD). Budući da inhibitor Necrostatin-1s nije utjecao na nekroptozu nezrelih stanica živčanog sustava, zaključili smo kako je nekroptoza u analiziranom modelu neovisna o kinaznoj aktivnosti RIPK1. Iako matične stanice, niti njihov kondicionirani medij nisu direktno smanjili intenzitet nekroptoze nezrelih stanica živčanog sustava, pokazane su mjerljive dobrobiti: dodane matične stanice su djelomično povratile izražaj biljega neurona TUBB3, dok je kondicionirani medij djelomično povratio izražaj SOX2, jednog od proteina važnog za oporavak živčanog sustava.

9. Summary

Influence of stem cells on necroptosis in the cells of nervous system *in vitro* caused by hypoxia

Valentina Hribljan

Zagreb, 2023

Hypoxic-ischemic encephalopathy is one of the most common causes of lifelong disability. Here, we have investigated the role of necroptosis, a type of cell death, in hypoxic-ischemic insult of cells of the nervous system, and the role of neural stem cells (NSC) in recovery. The first goal was to establish a model of immature cells of the nervous system, which was achieved through the eight-day differentiation of mouse NSC. A comparison of cell differentiation in ambient (20 % oxygen) and tissue (5 % oxygen) normoxia revealed that tissue normoxia increases the expression of some of the genes involved in stemness and neuronal and astrocytic identity. Since activation of necroptosis in immature cells couldn't be achieved by hypoxia (1 % oxygen) during 24 h, we caused necroptosis by oxygen-glucose deprivation. Since inhibitor Necrostatin-1s didn't influence necroptosis, we have concluded that necroptosis in the analyzed model is not dependent on the kinase activity of RIPK1. Although NSC, nor their conditioned medium didn't directly reduce the intensity of necroptosis, we have discovered other benefits: NSC partly recovered the expression of the neuronal marker TUBB3, while the conditioned medium partly recovered the expression of SOX2, a protein important for recovery of the nervous system.

10. Popis literature

1. Lu F, Zhang Y. Cell totipotency: Molecular features, induction, and maintenance. *Natl Sci Rev.* 2015;2(2):217–25.
2. Kandarakov O, Belyavsky A, Semenova E. Bone Marrow Niches of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Int J Mol Sci.* 2022;23(8).
3. Frese L, Dijkman PE, Hoerstrup SP. Adipose tissue-derived stem cells in regenerative medicine. *Transfus Med Hemotherapy.* 2016;43(4):268–74.
4. Yang R, Liu F, Wang J, Chen X, Xie J, Xiong K. Epidermal stem cells in wound healing and their clinical applications. *Stem Cell Res Ther* 2019 101. 2019;10(1):1–14.
5. Relaix F, Bencze M, Borok MJ, Der Vartanian A, Gattazzo F, Mademtzoglou D, i sur. Perspectives on skeletal muscle stem cells. *Nat Commun* 2021 121. 2021;12(1):1–11.
6. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663–76.
7. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, i sur. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007;131(5):861–72.
8. Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, i sur.. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature.* 2013;501(7467):373–9.
9. Harrison SP, Baumgarten SF, Verma R, Lunov O, Dejneka A, Sullivan GJ. Liver Organoids: Recent Developments, Limitations and Potential. *Front Med.* 2021;8:534.
10. Lewis-Israeli YR, Wasserman AH, Gabalski MA, Volmert BD, Ming Y, Ball KA, i sur. Self-assembling human heart organoids for the modeling of cardiac development and congenital heart disease. *Nat Commun.* 2021;12(1):1–16.
11. Elitt MS, Barbar L, Tesar PJ. Drug screening for human genetic diseases using iPSC models. *Hum Mol Genet.* 2018;27(R2):R89.
12. Park JC, Jang SY, Lee D, Lee J, Kang U, Chang H, i sur. A logical network-based drug-screening platform for Alzheimer’s disease representing pathological features of human brain organoids. *Nat Commun.* 2021;12(1):1–13.
13. Yin K, Wang S, Zhao RC. Exosomes from mesenchymal stem/stromal cells: A new therapeutic paradigm. *Biomark Res.* 2019;7(1).
14. Li H, Luo Y, Liu P, Liu P, Hua W, Zhang Y, i sur. Exosomes containing miR-451a is involved in the protective effect of cerebral ischemic preconditioning against cerebral ischemia and reperfusion injury. *CNS Neurosci Ther.* 2021;27(5):564.
15. Mousaei Ghasroldasht M, Seok J, Park HS, Liakath Ali FB, Al-Hendy A. Stem Cell Therapy: From Idea to Clinical Practice. *Int J Mol Sci.* 2022;23(5).
16. Isern J, García-García A, Martín AM, Arranz L, Martín-Pérez D, Torroja C, i sur. The neural crest is a source of mesenchymal stem cells with specialized hematopoietic stem cell niche function. *Elife.* 2014;3:3696.

17. Costela-Ruiz VJ, Melguizo-Rodríguez L, Bellotti C, Illescas-Montes R, Stanco D, Arciola CR, i sur. Different Sources of Mesenchymal Stem Cells for Tissue Regeneration: A Guide to Identifying the Most Favorable One in Orthopedics and Dentistry Applications. *Int J Mol Sci.* 2022;23(11):6356.
18. Rodríguez-Fuentes DE, Fernández-Garza LE, Samia-Meza JA, Barrera-Barrera SA, Caplan AI, Barrera-Saldaña HA. Mesenchymal Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review. *Arch Med Res.* 2021;52(1):93–101.
19. Deinsberger J, Reisinger D, Weber B. Global trends in clinical trials involving pluripotent stem cells: a systematic multi-database analysis. *npj Regen Med.* 2020;5(1):1–13.
20. Sugai K, Sumida M, Shofuda T, Yamaguchi R, Tamura T, Kohzuki T, i sur. First-in-human clinical trial of transplantation of iPSC-derived NS/PCs in subacute complete spinal cord injury: Study protocol. *Regen Ther.* 2021;18:321–33.
21. Wang LLW, Janes ME, Kumbhojkar N, Kapate N, Clegg JR, Prakash S, i sur. Cell therapies in the clinic. *Bioeng Transl Med.* 2021;6(2).
22. Müller AM, Huppertz S, Henschler R. Hematopoietic Stem Cells in Regenerative Medicine: Astray or on the Path? *Transfus Med Hemotherapy.* 2016;43(4):247.
23. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: Past, present, and future. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1).
24. Pellegrini G, Ardigo D, Milazzo G, Iotti G, Guatelli P, Pelosi D, i sur. Navigating Market Authorization: The Path Holoclar Took to Become the First Stem Cell Product Approved in the European Union. *Stem Cells Transl Med.* 2018;7(1):146.
25. Sinden JD, Hicks C, Stroemer P, Vishnubhatla I, Corteling R. Human Neural Stem Cell Therapy for Chronic Ischemic Stroke: Charting Progress from Laboratory to Patients. *Stem Cells Dev.* 2017;26(13):933–47.
26. Detante O, Moisan A, Hommel M, Jaillard A. Controlled clinical trials of cell therapy in stroke: Meta-analysis at six months after treatment. *Int J Stroke.* 2017;12(7):748–51.
27. Nagpal A, Choy FC, Howell S, Hillier S, Chan F, Hamilton-Bruce MA, i sur. Safety and effectiveness of stem cell therapies in early-phase clinical trials in stroke: a systematic review and meta-analysis. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):191.
28. Kim HJ, Cho KR, Jang H, Lee NK, Jung YH, Kim JP, i sur. Intracerebroventricular injection of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells in patients with Alzheimer's disease dementia: a phase I clinical trial. *Alzheimer's Res Ther.* 2021;13(1):1–11.
29. Alanazi A, Alassiri M, Jawdat D, Almalik Y. Mesenchymal stem cell therapy: A review of clinical trials for multiple sclerosis. *Regen Ther.* 2022;21:201.
30. Gugliandolo A, Bramanti P, Mazzon E. Mesenchymal Stem Cells in Multiple Sclerosis: Recent Evidence from Pre-Clinical to Clinical Studies. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):1–35.
31. Jang SE, Qiu L, Chan LL, Tan EK, Zeng L. Current Status of Stem Cell-Derived Therapies for Parkinson's Disease: From Cell Assessment and Imaging Modalities to Clinical Trials. *Front Neurosci.* 2020;14:1077.
32. De Bree K, De Bakker BS, Oostra RJ. The development of the human notochord. *PLoS One.* 2018;13(10).

33. Stiles J, Jernigan TL. The Basics of Brain Development. *Neuropsychol Rev.* 2010;20(4):327.
34. Zhao ZD, Yang WZ, Gao C, Fu X, Zhang W, Zhou Q, i sur. A hypothalamic circuit that controls body temperature. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(8):2042–7.
35. Saijo K, Glass CK. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):775–87.
36. Herculano-Houzel S. The remarkable, yet not extraordinary, human brain as a scaled-up primate brain and its associated cost. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(SUPPL.1):10661–8.
37. Nagappan PG, Chen H, Wang DY. Neuroregeneration and plasticity: A review of the physiological mechanisms for achieving functional recovery postinjury. *Mil Med Res.* 2020;7(1):1–16.
38. Plachez C, Richards LJ. Mechanisms of Axon Guidance in the Developing Nervous System. *Curr Top Dev Biol.* 2005;69:267–346.
39. Miller SL, Wallace EM, Walker DW. Antioxidant therapies: A potential role in perinatal medicine. *Neuroendocrinology.* 2012;96(1):13–23.
40. Millar LJ, Shi L, Hoerder-Suabedissen A, Molnár Z. Neonatal hypoxia ischaemia: Mechanisms, models, and therapeutic challenges. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:78.
41. Rocha-Ferreira E, Hristova M. Plasticity in the neonatal brain following hypoxic-ischaemic injury. *Neural Plast.* 2016;2016:4901014.
42. Teterou K, Sisa C, Iqbal A, Dhillon K, Hristova M. Current Therapies for Neonatal Hypoxic–Ischaemic and Infection-Sensitised Hypoxic–Ischaemic Brain Damage. *Front Synaptic Neurosci.* 2021;13:42.
43. Perrone S, Lembo C, Gironi F, Petrolini C, Catalucci T, Corbo G, i sur. Erythropoietin as a Neuroprotective Drug for Newborn Infants: Ten Years after the First Use. *Antioxidants.* 2022;11(4).
44. Jacobs SE, Berg M, Hunt R, Tarnow-Mordi WO, Inder TE, Davis PG. Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;2013(1).
45. Zhou KQ, Davidson JO, Bennet L, Gunn AJ. Combination treatments with therapeutic hypothermia for hypoxic-ischemic neuroprotection. *Dev Med Child Neurol.* 2020;62(10):1131–7.
46. Davies A, Wassink G, Bennet L, Gunn A, Davidson J. Can we further optimize therapeutic hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy? *Neural Regen Res.* 2019;14(10):1678–83.
47. Xiong T, Qu Y, Mu D, Ferriero D. Erythropoietin for neonatal brain injury: opportunity and challenge. *Int J Dev Neurosci.* 2011;29(6):583–91.
48. Serrenho I, Rosado M, Dinis A, Cardoso CM, Grãos M, Manadas B, i sur. Stem cell therapy for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: A systematic review of preclinical studies. *Int J Mol Sci.* 2021;22(6):1–29.
49. del Pozo A, Villa M, Martínez-Orgado J. Potential therapeutic applications of stem cell therapy for neonatal hypoxic-ischaemic brain injury. *Neurol Perspect.* 2022;2:S49–57.

50. Fricker M, Tolkovsky AM, Borutaite V, Coleman M, Brown GC. Neuronal Cell Death. *Physiol Rev.* 2018;98(2):813–80.
51. Moujalled D, Strasser A, Liddell JR. Molecular mechanisms of cell death in neurological diseases. *Cell Death Differ.* 2021;28(7):2029–44.
52. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, i sur. Cell death modalities: Classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 2007;14(7):1237–43.
53. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, i sur. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018;25(3):486–541.
54. Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, i sur. News and Commentary Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 2005;12:1463–7.
55. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, i sur. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009;16(1):3–11.
56. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny M V, i sur. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012;19(1):107–20.
57. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, i sur. Essential versus accessory aspects of cell death: Recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ.* 2015;22(1):58–73.
58. Roach HI, Clarke NMP. Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate. *J Bone Joint Surg Br.* 2000;82(4):601–13.
59. Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, i sur. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol.* 2000;1(6):489–95.
60. Degtarev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, i sur. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol.* 2005;1(2):112–9.
61. Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, i sur. Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation. *Cell.* 2009;137(6):1112–23.
62. He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, i sur. Receptor Interacting Protein Kinase-3 Determines Cellular Necrotic Response to TNF- α . *Cell.* 2009;137(6):1100–11.
63. Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, i sur. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science (80-).* 2009;325(5938):332–6.
64. Zhao J, Jitkaew S, Cai Z, Choksi S, Li Q, Luo J, i sur. Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(14):5322–7.

65. Sun L, Wang H, Wang Z, He S, Chen S, Liao D, i sur. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*. 2012;148(1–2):213–27.
66. Weinlich R, Oberst A, Beere HM, Green DR. Necroptosis in development, inflammation and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(2):127–36.
67. Chen X, Li W, Ren J, Huang D, He WT, Song Y, i sur. Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell Res*. 2014;24(1):105–21.
68. Cai Z, Jitkaew S, Zhao J, Chiang HC, Choksi S, Liu J, i sur. Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat Cell Biol*. 2014;16(1):55.
69. Wang H, Sun L, Su L, Rizo J, Liu L, Wang LF, i sur. Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein MLKL Causes Necrotic Membrane Disruption upon Phosphorylation by RIP3. *Mol Cell*. 2014;54(1):133–46.
70. Kaiser WJ, Sridharan H, Huang C, Mandal P, Upton JW, Gough PJ, i sur. Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. *J Biol Chem*. 2013;288(43):31268–79.
71. Upton JW, Kaiser WJ, Mocarski ES. DAI/ZBP1/DLM-1 complexes with RIP3 to mediate virus-induced programmed necrosis that is targeted by murine cytomegalovirus vIRA. *Cell Host Microbe*. 2012;11(3):290–7.
72. Maelfait J, Liverpool L, Bridgeman A, Ragan KB, Upton JW, Rehwinkel J. Sensing of viral and endogenous RNA by ZBP1/DAI induces necroptosis. *EMBO J*. 2017;36:2529–43.
73. Jiao H, Wachsmuth L, Kumari S, Schwarzer R, Lin J, Eren RO, i sur. Z-nucleic-acid sensing triggers ZBP1-dependent necroptosis and inflammation. *Nature*. 2020;580(7803):391–5.
74. Wang R, Li H, Wu J, Cai ZY, Li B, Ni H, i sur. Gut stem cell necroptosis by genome instability triggers bowel inflammation. *Nature*. 2020;580(7803):386–90.
75. Riebeling T, Kunzendorf U, Krautwald S. The role of RHIM in necroptosis. *Biochem Soc Trans*. 2022;50(4):1197–205.
76. Choi ME, Price DR, Ryter SW, Choi AMK. Necroptosis: A crucial pathogenic mediator of human disease. Vol. 4, *JCI Insight*. American Society for Clinical Investigation; 2019.
77. Khoury MK, Gupta K, Franco SR, Liu B. Necroptosis in the Pathophysiology of Disease. *Am J Pathol*. 2020;190(2):272–85.
78. Águeda-Pinto A, Alves LQ, Neves F, McFadden G, Jacobs BL, Castro LFC, i sur. Convergent Loss of the Necroptosis Pathway in Disparate Mammalian Lineages Shapes Viruses Countermeasures. *Front Immunol*. 2021;12(September):1–13.
79. Yang X-S, Yi T-L, Zhang S, Xu Z-W, Yu Z-Q, Sun H-T, i sur. Hypoxia-inducible factor-1 alpha is involved in RIP-induced necroptosis caused by in vitro and in vivo ischemic brain injury. *Sci Rep*. 2017;7(1):5818.
80. Naito MG, Xu D, Amin P, Lee J, Wang H, Li W, i sur. Sequential activation of necroptosis and apoptosis cooperates to mediate vascular and neural pathology in stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(9):4959–70.
81. Liao S, Apaijai N, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. The possible roles of necroptosis

- during cerebral ischemia and ischemia / reperfusion injury. *Arch Biochem Biophys.* 2020;695:108629.
82. Deng XX, Li SS, Sun FY. Necrostatin-1 prevents necroptosis in brains after ischemic stroke via inhibition of RIPK1-mediated RIPK3/MLKL signaling. *Aging Dis.* 2019;10(4):807–17.
 83. Chen Y, Zhang L, Yu H, Song K, Shi J, Chen L, i sur. Necrostatin-1 Improves Long-term Functional Recovery Through Protecting Oligodendrocyte Precursor Cells After Transient Focal Cerebral Ischemia in Mice. *Neuroscience.* 2018;371:229–41.
 84. Caccamo A, Branca C, Piras IS, Ferreira E, Huentelman MJ, Liang WS, i sur. Necroptosis activation in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci.* 2017;20(9):1236–46.
 85. Oñate M, Catenaccio A, Salvadores N, Saquel C, Martinez A, Moreno-Gonzalez I, i sur. The necroptosis machinery mediates axonal degeneration in a model of Parkinson disease. *Cell Death Differ.* 2020;27(4):1169–85.
 86. Ofengeim D, Ito Y, Najafov A, Zhang Y, Shan B, DeWitt JP, i sur. Activation of necroptosis in multiple sclerosis. *Cell Rep.* 2015;10(11):1836–49.
 87. Picon C, Jayaraman A, James R, Beck C, Gallego P, Witte ME, i sur. Neuron-specific activation of necroptosis signaling in multiple sclerosis cortical grey matter. *Acta Neuropathol.* 2021;141(4):585–604.
 88. Yang S, Lee DK, Shin J, Lee S, Baek S, Kim J, i sur. Nec-1 alleviates cognitive impairment with reduction of A β and tau abnormalities in APP/PS1 mice. *EMBO Mol Med.* 2017;9(1):61.
 89. Chevin M, Chabrier S, Allard M-J, Sébire G. Necroptosis Blockade Potentiates the Neuroprotective Effect of Hypothermia in Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Biomedicines.* 2022;10(11):2913.
 90. Soares R, Ribeiro F, Lourenço Di, Rodrigues R, Moreira J, Sebastião A, i sur. The neurosphere assay: An effective in vitro technique to study neural stem cells. *Neural Regen Res.* 2021;16(11):2229–31.
 91. Whaley D, Damyar K, Witek RP, Mendoza A, Alexander M, Lakey JRT. Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell Transplant.* 2021;30.
 92. Samson AL, Fitzgibbon C, Patel KM, Hildebrand JM, Whitehead LW, Rimes JS, i sur. A toolbox for imaging RIPK1, RIPK3, and MLKL in mouse and human cells. *Cell Death Differ.* 2021;1–19.
 93. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. *Cold Spring Harb Protoc.* 2018;2018(6):465–8.
 94. Alić I, Kosi N, Kapuralin K, Gorup D, Gajović S, Pochet R, i sur. Neural stem cells from mouse strain Thy1 YFP-16 are a valuable tool to monitor and evaluate neuronal differentiation and morphology. *Neurosci Lett.* 2016;634:32–41.
 95. Horie N, So K, Moriya T, Kitagawa N, Tsutsumi K, Nagata I, i sur. Effects of oxygen concentration on the proliferation and differentiation of mouse neural stem cells in vitro. *Cell Mol Neurobiol.* 2008;28(6):833–45.
 96. Zille M, Karuppagounder SS, Chen Y, Gough PJ, Bertin J, Finger J, i sur. Neuronal Death After Hemorrhagic Stroke In Vitro and In Vivo Shares Features of Ferroptosis and

- Necroptosis. *Stroke*. 2017;48(4):1033–43.
97. Ferrada L, Barahona MJ, Salazar K, Vandenabeele P, Nualart F. Vitamin C controls neuronal necroptosis under oxidative stress. *Redox Biol*. 2020;29:101408.
 98. Kurien BT, Dorri Y, Dillon S, Dsouza A, Scofield RH. An overview of western blotting for determining antibody specificities for immunohistochemistry. *Methods Mol Biol*. 2011;717:55–67.
 99. Kim JA, Ha S, Shin KY, Kim S, Lee KJ, Chong YH, i sur. Neural stem cell transplantation at critical period improves learning and memory through restoring synaptic impairment in Alzheimer's disease mouse model. *Cell Death Dis*. 2015;6(6):e1789.
 100. Stonesifer C, Corey S, Ghanekar S, Diamandis Z, Acosta SA, Borlongan C V. Stem cell therapy for abrogating stroke-induced neuroinflammation and relevant secondary cell death mechanisms. *Prog Neurobiol*. 2017;158:94–131.
 101. Smith MJ, Paton MCB, Fahey MC, Jenkin G, Miller SL, Finch-Edmondson M, i sur. Neural stem cell treatment for perinatal brain injury: A systematic review and meta-analysis of preclinical studies. *Stem Cells Transl Med*. 2021;10(12):1621–36.
 102. Marei HE, Hasan A, Rizzi R, Althani A, Afifi N, Cenciarelli C, i sur. Potential of stem cell-based therapy for ischemic stroke. *Front Neurol*. 2018;9(FEB):34.
 103. Xiao J, Yang R, Biswas S, Zhu Y, Qin X, Zhang M, i sur. Neural Stem Cell-based Regenerative Approaches for the Treatment of Multiple Sclerosis. *Mol Neurobiol*. 2018;55(4):3152.
 104. Cai H, Ma X, Lu D, Chen L, Bian X, Zhang N, i sur. Mild Hypothermia Promotes Ischemic Tolerance and Survival of Neural Stem Cell Grafts by Enhancing Global SUMOylation. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:6503504.
 105. Giese AK, Frahm J, Hübner R, Luo J, Wree A, Frech MJ, i sur. Erythropoietin and the effect of oxygen during proliferation and differentiation of human neural progenitor cells. *BMC Cell Biol*. 2010;11(1):1–13.
 106. Zhou W, Zhao T, Du J, Ji G, Li X, Ji S, i sur. TIGAR promotes neural stem cell differentiation through acetyl-CoA-mediated histone acetylation. *Cell Death Dis*. 2019;10(3):198.
 107. Večeřa J, Procházková J, Šumberová V, Pánská V, Paculová H, Lánová MK, i sur. Hypoxia/Hif1 α prevents premature neuronal differentiation of neural stem cells through the activation of Hes1. *Stem Cell Res*. 2020;45:101770.
 108. Warashina M, Kyung HM, Kuwabara T, Huynh A, Gage FH, Schultz PG, i sur. A synthetic small molecule that induces neuronal differentiation of adult hippocampal neural progenitor cells. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2006;45(4):591–3.
 109. Barros D, Amaral IF, Pêgo AP. Laminin-Inspired Cell-Instructive Microenvironments for Neural Stem Cells. *Biomacromolecules*. 2020;21(2):276–93.
 110. Chen X, Du Z, Li X, Wang L, Wang F, Shi W, i sur. Protein Palmitoylation Regulates Neural Stem Cell Differentiation by Modulation of EID1 Activity. *Mol Neurobiol*. 2016;53(8):5722–36.
 111. Park JH, Choi MR, Park KS, Kim SH, Jung KH, Chai YG. The characterization of gene expression during mouse neural stem cell differentiation in vitro. *Neurosci Lett*.

- 2012;506(1):50–4.
112. Zhang L, Wang G, Chen X, Xue X, Guo Q, Liu M, i sur. Formyl peptide receptors promotes neural differentiation in mouse neural stem cells by ROS generation and regulation of PI3K-AKT signaling. *Sci Rep.* 2017;7(1).
 113. Michl J, Park KC, Swietach P. Evidence-based guidelines for controlling pH in mammalian live-cell culture systems. *Commun Biol.* 2019;2(1).
 114. Ast T, Mootha VK. Oxygen and mammalian cell culture: are we repeating the experiment of Dr. Ox? *Nat Metab.* 2019;1(9):858–60.
 115. Mas-Bargues C, Sanz-Ros J, Román-Domínguez A, Inglés M, Gimeno-Mallench L, El Alami M, i sur. Relevance of oxygen concentration in stem cell culture for regenerative medicine. *Int J Mol Sci.* 2019;20(5):1195.
 116. Jagannathan L, Cuddapah S, Costa M. Oxidative Stress Under Ambient and Physiological Oxygen Tension in Tissue Culture. *Curr Pharmacol Reports.* 2016;2(2):64–72.
 117. Manuel MN, Mi D, Masonand JO, Price DJ. Regulation of cerebral cortical neurogenesis by the Pax6 transcription factor. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:70.
 118. Xie Y, Lowry WE. Manipulation of neural progenitor fate through the oxygen sensing pathway. *Methods.* 2018;133:44–53.
 119. Chen H-L, Pistollato F, Hoepfner DJ, Ni H-T, McKay RDG, Panchision DM. Oxygen Tension Regulates Survival and Fate of Mouse Central Nervous System Precursors at Multiple Levels. *Stem Cells.* 2007;25(9):2291–301.
 120. Dillon CP, Weinlich R, Rodriguez DA, Cripps JG, Quarato G, Gurung P, i sur. RIPK1 blocks early postnatal lethality mediated by caspase-8 and RIPK3. *Cell.* 2014;157(5):1189–202.
 121. Rickard JA, O'Donnell JA, Evans JM, Lalaoui N, Poh AR, Rogers T, i sur. RIPK1 regulates RIPK3-MLKL-driven systemic inflammation and emergency hematopoiesis. *Cell.* 2014;157(5):1175–88.
 122. Zargarian S, Shlomovitz I, Erlich Z, Hourizadeh A, Ofir-Birin Y, Croker BA, i sur. Phosphatidylserine externalization, “necroptotic bodies” release, and phagocytosis during necroptosis. *PLoS Biol.* 2017;15(6).
 123. Zhang X, Zhang H, Xu C, Li X, Li M, Wu X, i sur. Ubiquitination of RIPK1 suppresses programmed cell death by regulating RIPK1 kinase activation during embryogenesis. *Nat Commun.* 2019;10(1):1–15.
 124. Cao L, Mu W. Necrostatin-1 and necroptosis inhibition: Pathophysiology and therapeutic implications. *Pharmacol Res.* 2021;163:105297.
 125. Hribljan V, Lisjak D, Petrović DJ, Mitrečić D. Necroptosis is one of the modalities of cell death accompanying ischemic brain stroke: from pathogenesis to therapeutic possibilities. *Croat Med J.* 2019;60(2):121–6.
 126. Liu X, Zhang Y, Gao H, Hou Y, Lu J jian, Feng Y, i sur. Induction of an MLKL mediated non-canonical necroptosis through reactive oxygen species by tanshinol A in lung cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2020;171:113684.
 127. Zhang W, Fan W, Guo J, Wang X. Osmotic stress activates RIPK3/MLKL-mediated necroptosis by increasing cytosolic pH through a plasma membrane Na⁺/H⁺exchanger.

- Sci Signal. 2022;15(734).
128. Takahashi N, Duprez L, Grootjans S, Cauwels A, Nerinckx W, DuHadaway JB, i sur. Necrostatin-1 analogues: critical issues on the specificity, activity and in vivo use in experimental disease models. *Cell Death Dis.* 2012;3(11):e437.
 129. Frajewicki A, Laštůvka Z, Borbélyová V, Khan S, Jandová K, Janišová K, i sur. Perinatal Hypoxic-Ischemic Damage: Review of the Current Treatment Possibilities. *Physiol Res.* 2020;69(Supplement 3):S379–401.
 130. He B, Lu C, Zheng G, He X, Wang M, Chen G, i sur. Combination therapeutics in complex diseases. *J Cell Mol Med.* 2016;20(12):2231–40.
 131. Güvenç Paltun B, Kaski S, Mamitsuka H. Machine learning approaches for drug combination therapies. *Brief Bioinform.* 2021;22(6):1–16.
 132. Sun W, Sanderson PE, Zheng W. Drug combination therapy increases successful drug repositioning. *Drug Discov Today.* 2016;21(7):1189.
 133. Pagin M, Pernebrink M, Giubolini S, Barone C, Sambruni G, Zhu Y, i sur. Sox2 controls neural stem cell self-renewal through a Fos-centered gene regulatory network. *Stem Cells.* 2021;39(8):1107–19.
 134. Mercurio S, Serra L, Pagin M, Nicolis SK. Deconstructing Sox2 Function in Brain Development and Disease. *Cells.* 2022;11(10).
 135. Favaro R, Valotta M, Ferri ALM, Latorre E, Mariani J, Giachino C, i sur. Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh. *Nat Neurosci.* 2009;12(10):1248–56.
 136. Kong D, Zhu J, Liu Q, Jiang Y, Xu L, Luo N, i sur. Mesenchymal stem cells protect neurons against hypoxic-ischemic injury via inhibiting parthanatos, necroptosis, and apoptosis, but not autophagy. *Cell Mol Neurobiol.* 2017;37(2):303–13.
 137. Juntunen M, Hagman S, Moisan A, Narkilahti S, Miettinen S. In vitro oxygen-glucose deprivation-induced stroke models with human neuroblastoma cell- And induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Stem Cells Int.* 2020;2020.
 138. Gorsky A, Monsour M, Nguyen H, Castelli V, Lee JY, Borlongan C V. Metabolic Switching of Cultured Mesenchymal Stem Cells Creates Super Mitochondria in Rescuing Ischemic Neurons. *NeuroMolecular Med.* 2022;1:1–5.
 139. Tang MB, Li YS, Li SH, Cheng Y, Zhang S, Luo HY, i sur. Anisomycin prevents OGD-induced necroptosis by regulating the E3 ligase CHIP. *Sci Reports* 2018 81. 2018;8(1):1–12.
 140. Zhang Z Bin, Tan YX, Zhao Q, Xiong LL, Liu J, Xu FF, i sur. MiRNA-7a-2-3p inhibits neuronal apoptosis in oxygen-glucose deprivation (OGD) model. *Front Neurosci.* 2019;13(JAN):1–10.
 141. Zheng J, Cui E, Yang H, Li M, Zhou J, Yan M, i sur. Targeting cyclophilin-D by compound 19 protects neuronal cells from oxygen glucose deprivation/re-oxygenation. *Oncotarget.* 2017;8(52):90238–49.
 142. Kim M, Jung K, Kim IS, Lee IS, Ko Y, Shin JE, i sur. TNF- α induces human neural progenitor cell survival after oxygen–glucose deprivation by activating the NF- κ B pathway.

- Exp Mol Med. 2018;50(4):14.
143. Ma J, Yu D, Tong Y, Mao M. Effect of neuroserpin in a neonatal hypoxic-ischemic injury model ex vivo. *Biol Res.* 2012;45(4):357–62.
 144. Lu Y, Han Y, He J, Zhou B, Fang P, Li X. LncRNA FOXD3-AS1 knockdown protects against cerebral ischemia/reperfusion injury via miR-765/BCL2L13 axis. *Biomed Pharmacother.* 2020;132:110778.
 145. Wang Y, Tu L, Li Y, Chen D, Liu Z, Hu X, i sur. Notoginsenoside R1 Alleviates Oxygen-Glucose Deprivation/Reoxygenation Injury by Suppressing Endoplasmic Reticulum Calcium Release via PLC. *Sci Rep.* 2017;7(1).
 146. Zheng Y, Li L, Chen B, Fang Y, Lin W, Zhang T, i sur. Chlorogenic acid exerts neuroprotective effect against hypoxia-ischemia brain injury in neonatal rats by activating Sirt1 to regulate the Nrf2-NF- κ B signaling pathway. *Cell Commun Signal.* 2022;20(1):1–20.
 147. Yuan L, Wang Z, Liu L, Jian X. Inhibiting histone deacetylase 6 partly protects cultured rat cortical neurons from oxygen-glucose deprivation-induced necroptosis. *Mol Med Rep.* 2015;12(2):2661–7.
 148. Shi J, Chen X, Li H, Wu Y, Wang S, Shi W, i sur. Neuron-autonomous transcriptome changes upon ischemia/reperfusion injury. *Sci Rep.* 2017;7(1):5800.
 149. Gao XY, Huang JO, Hu YF, Gu Y, Zhu SZ, Huang K Bin, i sur. Combination of mild hypothermia with neuroprotectants has greater neuroprotective effects during oxygen-glucose deprivation and reoxygenation-mediated neuronal injury. *Sci Reports* 2014 41. 2014;4(1):1–10.
 150. Hong JY, Kim H, Yeo C, Jeon WJ, Lee J, Baek SH, i sur. Uwhangchungsimwon Inhibits Oxygen Glucose Deprivation/Re-Oxygenation-Induced Cell Death through Neuronal VEGF and IGF-1 Receptor Signaling and Synaptic Remodeling in Cortical Neurons. *Antioxidants.* 2022;11(7):1–17.
 151. Pillai-Kastoori L, Heaton S, Shiflett SD, Roberts AC, Solache A, Schutz-Geschwender AR. Antibody validation for Western blot: By the user, for the user. *J Biol Chem.* 2020;295(4):926–39.
 152. Hobro AJ, Smith NI. An evaluation of fixation methods: Spatial and compositional cellular changes observed by Raman imaging. *Vib Spectrosc.* 2017;91:31–45.
 153. Lund-Johansen F, Browning MD. Should we ignore western blots when selecting antibodies for other applications? *Nat Methods.* 2017;14(3):215.
 154. Weber K, Roelandt R, Bruggeman I, Estornes Y, Vandenabeele P. Nuclear RIPK3 and MLKL contribute to cytosolic necrosome formation and necroptosis. *Commun Biol.* 2018;1(1):6.
 155. Yoon S, Bogdanov K, Kovalenko A, Wallach D. Necroptosis is preceded by nuclear translocation of the signaling proteins that induce it. *Cell Death Differ.* 2015;23:253–60.

11. Životopis

Valentina Hribljan rođena je 14.05.1994. u Karlovcu gdje je završila gimnaziju. Preddiplomski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu upisala je 2013. g. Diplomski studij molekularne biologije na istom Fakultetu završava 2018. g. Tijekom studija bila je uključena u rad Sekcije za biologiju mora Udruge studenata biologije „BIUS“, a u tom periodu položila je i tečaj za ronioca s jednom zvjezdicom.

Od 2018. g. zaposlena je kao doktorandica na projektu Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ): „Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“, pod mentorstvom prof. dr. sc. Dinka Mitrečića. Također, 2018. g. je upisala poslijediplomski studij Neuroznanost na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Aktivno je sudjelovala u provođenju dodiplomske nastave na hrvatskom i engleskom jeziku na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Sudjelovala je u izvođenju radionica u sklopu međunarodne ljetne škole *CED-IADR (Central European Division of International Association for Dental Research) Summer School 2019*. Tijekom poslijediplomskog studija, rezultate svog istraživanja prezentirala je na domaćim i međunarodnim kongresima, te je dobila stipendije za pohađanje dviju COST (*European Cooperation in Science and Technology*) međunarodnih škola.

Autorica je pet znanstvenih radova indeksiranih u bazi *Current Contents*, od čega je prvi autor na dva rada.