

# Vizualizacija mitohondrija u matičnim stanicama

---

Spajić, Sebastijan

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:105:846665>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-10**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Sebastijan Spajić**

**Vizualizacija mitohondrija u matičnim  
stanicama**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2019.**

Diplomski rad je izrađen u Laboratoriju za matične stanice Hrvatskog instituta za istraživanje mozga i u Laboratoriju za regenerativnu neuroznanost (Glowlab) Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof.dr.sc.Dinka Mitrečića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2018./2019.

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

## POPIS KRATICA

<b>hESCs</b>	engl. human embryonic stem cells
<b>IVF</b>	engl. in vitro fertilization
<b>iPCS</b>	engl. induced pluripotent stem cells
<b>NSCs</b>	engl. neural stem cells
<b>ŽMS</b>	živčane matične stanice
<b>RGCs</b>	engl. radial glial cells
<b>RGPs</b>	engl. radial glial progenitor cells
<b>Sox2</b>	engl. sex determining region Y-box2
<b>NeuroD1</b>	engl. neurogenic differentiation 1
<b>VEGF</b>	engl. vascular endothelial growth factor
<b>SVZ</b>	subventrikularna zona
<b>SGZ</b>	subgranularna zona
<b>EGF</b>	engl. epidermal growth factor
<b>FGF</b>	engl. fibroblast growth factor
<b>EMA</b>	engl. European Medicines Agency
<b>ROS</b>	engl. reactive oxygen species
<b>GFP</b>	engl. green fluorescent protein
<b>MMP</b>	engl. mitochondrial membrane potential
<b>DMEM/F-12</b>	engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
<b>hOMSC</b>	engl. Human oral mucosa stem cells
<b>FBS</b>	engl. Fetal bovine serum
<b>P/S</b>	PenStrep (pripravak penicilina i streptomicina)
<b>PBS</b>	engl. Phosphate Buffer Solution

<b>B27</b>	suplement za rast živčanih stanica (Gibco by life Technologies)
<b>N2</b>	suplement za razvoj neuroblasta (Gibco by life Technologies)
<b>DMSO</b>	engl. Dimethyl sulfoxide
<b>PFA</b>	paraformaldehid
<b>DPBS</b>	engl. Dulbecco's phosphate-buffered saline
<b>Drp1</b>	engl. Dynamin related protein 1
<b>Opa1</b>	engl. Optic atrophy 1
<b>Mfn2</b>	engl. Mitofusin-2
<b>MSC</b>	engl. Mesenchymal stem cells
<b>DNA</b>	engl. deoxyribonucleic acid
<b>mtDNA</b>	engl. mitochondrial deoxyribonucleic acid
<b>POLG</b>	engl. DNA polymerase subunit gamma
<b>ATP</b>	adenozin trifosfat

**SADRŽAJ**

SAŽETAK .....	6
SUMMARY .....	7
1. UVOD .....	8
1.1. Matične stanice.....	8
1.1.1. Obilježja i vrste matičnih stanica.....	8
1.1.2. Matične stanice sluznice usne šupljine čovjeka.....	9
1.1.3. Živčane matične stanice.....	9
1.1.4. Primjena matičnih stanica u biomedicinskim istraživanjima.....	11
1.1.5. Terapijska primjena matičnih stanica.....	11
1.2. Mitohondriji.....	12
1.2.1. Mitohondrijske membrane.....	12
1.2.2. Mitohondrijska dinamika.....	13
1.2.3. Mitohondriji u matičnim stanicama.....	14
1.2.4. Metode proučavanja morfologije mitohondrija.....	14
2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA .....	16
2.1. Hipoteza .....	16
2.2. Ciljevi rada .....	16
3. MATERIJALI I METODE .....	17
3.1. Izolacija matičnih stanica iz sluznice usne šupljine čovjeka.....	17
3.2. Izolacija živčanih matičnih stanica.....	17
3.3. Uzgoj neurosfera.....	18
3.4. Disocijacija živčanih matičnih stanica.....	18
3.5. Izlaganje živčanih matičnih stanica hipoksiji.....	19
3.6. Bojenje stanica Mitotrackerom.....	19
3.7. Fiksacija živčanih matičnih stanica.....	19
3.8. Snimanje matičnih stanica na EVOS uređaju.....	19
3.9. Obrada mikroskopskih slika u ImageJ-u.....	20
4. REZULTATI .....	21
4.1. Vizualizacija mitohondrija u živčanim matičnim stanicama i oralnim matičnim Stanicama sluznice čovjeka.....	21
4.2. Mitohondriji živčanih matičnih stanica u normoksijskim uvjetima.....	23
4.3. Mitohondriji živčanih matičnih stanica u hipoksijskim uvjetima.....	25

5. RASPRAVA .....	29
6. ZAKLJUČAK .....	31
7. ZAHVALA .....	32
8. LITERATURA .....	33
9. ŽIVOTOPIS .....	35

## SAŽETAK

Sebastijan Spajić

### Vizualizacija mitohondrija u matičnim stanicama

Mitohondriji su stanični organeli zaduženi za proizvodnju ATP-a, reguliranje unutarstanične koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  i slobodnih kisikovi radikala te imaju važnu ulogu u intrinzičnom putu aktivacije apoptotičkih mehanizama. Razvojem biologije matičnih stanica dugo se zapostavljao utjecaj mitohondrija na matične stanice te se tek u novije vrijeme istražuje utjecaj mitohondrija na potentnost, proliferaciju i stupanj diferenciranosti matičnih stanica. Kako bi pratili utjecaj mitohondrija na matične stanice važno je uspostaviti metodu njihove vizualizacije.

Cilj ovoga istraživanja je bio vizualizirati mitohondrije u oralnim matičnim stanicama čovjeka i živčanim matičnim stanicama miša uz pomoć komercijalne boje MitoTracker. Praćen je utjecaj normoksijskih i hipoksijskih uvjeta na oblik i količinu mitohondrija u živčanim matičnim stanicama miša. Jedna skupina stanica je bila cijelo vrijeme u normoksiji do trenutka fiksacije. Druga skupina stanica je bila 24 sata u hipoksijskim uvjetima, a zatim je provela 6 te 24 sata u normoksijskim uvjetima do trenutka fiksacije. U objema populacijama matičnih stanica uspjeli smo uz MitoTracker® Red CMXRos vizualizirati mitohondrije i odrediti oblik mitohondrija. Ustvrdili smo da uzgoj živčanih matičnih stanica u normoksijskim uvjetima ne mijenja mitohondrijsku dinamiku, dok uzgoj živčanih matičnih stanica prvo u hipoksijskim, a zatim u normoksijskim uvjetima mijenja mitohondrijsku dinamiku.

**Ključne riječi:** mitohondriji, matične stanice, mitotracker, hipoksija, normoksija



## **SUMMARY**

Sebastijan Spajić

### **Visualization of mitochondria in stem cells**

Mitochondria are cell organelles in charge of ATP production, regulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration and reactive oxygen species and they have an important role in the intrinsic pathway for activation of apoptotic mechanisms. Mitochondria play a key role in all cells, including stem cells. The development of stem cell biology has long neglected the effects of mitochondria on stem cells, and only recent studies have investigated the influence of mitochondria on potency, proliferation and the degree of differentiation of stem cells. In order to monitor the mitochondrial influence on stem cells, it is important to visualize the mitochondria themselves.

The aim of this study was to visualize mitochondria in human oral mucosa stem cells and mouse neural stem cells using the commercial dye MitoTracker. The influence of normoxic and hypoxic conditions on the shape and amount of mitochondria in mouse neural stem cells was observed. One group of stem cells was in normoxia until they underwent fixation. Another group of cells spent 24 hours in hypoxia. After that, one of the subgroups spent 6 hours and another one 24 hours in normoxia until they were fixated. Using MitoTracker® Red CMXRos, we succeeded in visualizing and defining the shape of mitochondria in both stem cell populations. We have found that, under normoxic conditions, the mitochondrial dynamics of neural stem cell does not change, whereas if the neural stem cells are first put under hypoxic and then under normoxic conditions, their mitochondrial dynamics does change.

**Key words:** mitochondria, stem cells, mitotracker, hypoxia, normoxia

# 1. Uvod

## 1.1. Matične stanice

Matične stanice su vrsta stanica čijom staničnom diobom mogu nastati nove matične stanice, ali i specijalizirane vrste stanica. Matične stanice se mogu diferencirati u više od 200 tipova stanica ili razvojnih stadija stanica u odraslom ljudskom organizmu(1). One imaju važnu ulogu u embrionalnom razdoblju, ali i u odrasloj dobi. Tijekom embrionalnoga razvoja razlikujemo pluripotentne matične stanice koje predstavljaju izvor stanica iz kojega se razvijaju ektoderm, mezoderm i endoderm tj. osnova svih tkiva i organa. Postupnom diferencijacijom embrionalnih matičnih stanica smanjuje se njihova potentnost, ali stanice počinju obavljati specifične funkcije ovisno o tkivu u kojemu se nalaze. U odraslom organizmu matične stanice čine zalihu stanica koje nadomještaju izgubljene i odumrle stanice. Tkiva se međusobno razlikuju po zalihama tkivnih matičnih stanica tzv. adultnih matičnih stanica. Koža, sluznica gastrointestinalnog i respiratornog sustava te hematopoetska koštana srž sadrže brojne tkivne matične stanice, a npr. miokard i gušterača imaju mnogo manje tkivnih matičnih stanica. Na broj matičnih stanica u tkivu, broj dioba, samoobnavljanje i diferencijaciju utječe interakcija intrinzičnih faktora i ekstrinzičnih signala iz mikrokoliša tzv. niše (engl. *stem cell niche*)(2).

### 1.1.1. Obilježja i vrste matičnih stanica

Osnovno obilježje matičnih stanica je asimetrična dioba. Asimetričnom diobom iz jedne matične stanice nastane jedna nova matična stanica - kćer i jedna nova specijalizirana i diferencirana stanica. Asimetrična dioba omogućava matičnim stanicama da se samoobnavljaju, ali ujedno i sposobnost diferencijacije u specijalizirane stanice. Osim asimetrične diobe važno obilježje matičnih stanica je i potentnost odnosno sposobnost stanica da se diferenciraju u druge vrste stanica. Stanice koje imaju sposobnost stvoriti sve tipove stanica u embriju, ali i u odraslim organizmima, uključujući i izvanembrionalne strukture poput posteljice nazivaju se totipotentne matične stanice. Ako stanice mogu stvoriti sve tipove stanica u embriju i u odraslom organizmu, ali ne mogu stvoriti izvanembrionalne strukture tada ih nazivamo pluripotentnim matičnim stanicama. Primjer pluripotentnih matičnih stanica su embrionalne matične stanice. Multipotentne matične stanice su smještene u specijaliziranim tkivima i mogu stvarati nove vrste stanice, ali su manje potentnosti od

pluripotentnih stanica. Primjer multipotentnih stanica su hematopoetske stanice iz kojih nastaju sve krvne stanice. Stanice s najmanjom potentnošću su unipotentne stanice, tzv. progenitorne stanice. Iz njih nastaje samo jedna vrsta stanica: tako npr iz spermatogonija nastaju samo spermatozoidi (2). Matične stanice se s obzirom na podrijetlo mogu podijeliti na embrionalne i adultne matične stanice. Ljudske embrionalne matične stanice (hESCs) potječu iz embrioblasta blastocista i to iz zigota proizvedenih u procesu *in vitro* oplodnje (IVF), koje su donirane za istraživanje uz informirani pristanak oba donora. Ljudske embrionalne matične stanice (hESCs) imaju gotovo neograničeni razvojni potencijal i broj dioba. Adultne matične stanice, koje se još nazivaju i somatske matične stanice, su multipotentne matične stanice koje se nalaze između diferenciranih stanica u tkivima i organima. Primarna uloga adultnih matičnih stanica je da održavaju i obnavljaju tkiva u kojima se nalaze. One imaju ograničenu potentnost, jer se mogu diferencirati samo u stanice tkiva u kojemu se nalaze. Također u usporedbi s embrionalnim matičnim stanicama teže se kultiviraju i imaju ograničeni broj dioba (3). Osim embrionalnih i adultnih matičnih stanica postoje i inducirane pluripotentne matične stanice (engl. *induced pluripotent stem cells-iPSC*). To su matične stanice nastale genetskim reprogramiranjem adultnih somatskih pomoću četiri transkripcijska faktora ( Oct1/4, Sox2, Klf4 i c-Myc). Prve iPSC stvorene su 2006. reprogramiranjem adultnih mišjih fibroblasta u stanice koje nalikuju embrionalnim matičnim stanicama. Inducirane pluripotentne matične stanice eksprimiraju markere karakteristične za matične stanice te imaju sposobnost stvaranja stanica sva tri zametna listića (4).

### **1.1.2. Matične stanice sluznice usne šupljine čovjeka**

Matične stanice sluznice usne šupljine čovjeka (engl. human oral mucosa stem cells- hOMSC) su vrsta mezenhimalnih matičnih stanica (MSC) (5). Potječu od neuralnog grebena i multipotentne su. Matične stanice oralne sluznice imaju sposobnost diferenciranja u stanice ektodermalnog, mezodermalnog i endodermalnog sloja. U usporedbi s drugim matičnim stanicama dostupnije su izolaciji te njihovo uzorkovanje ne ostavlja trajna oštećenja tkiva. Matične stanice oralne sluznice izoliraju se „punch“ biopsijom sluznice usne šupljine čovjeka (6).

### **1.1.3. Živčane matične stanice**

Živčane matične stanice- ŽMS (engl. Neural stem cells-NSCs) su vrsta multipotentnih samoobnavljajućih matičnih stanica. Živčane matične stanice proizvode stanice radijalne glije iz kojih daljnjom diferencijacijom nastaju živčane stanice i glijalne stanice središnjeg

živčanog sustava. Najveći broj živčanih matičnih stanica nastaje tijekom embrionalnog razvoja i tada se ŽMS diferenciraju u stanice radijalne glije (engl. *radial glial cells-RGCs*) ili tzv. progenitorne stanice radijalne glije (engl. *radial glial progenitor cells-RGPs*), koje prebivaju u ventrikularnoj zoni. Za vrijeme embrionalnog razvoja tijekom procesa neurogeneze iz progenitornih stanica radijalne glije razvija se veliki broj neurona (7). Dugo se smatralo da je živčani sustav sisavaca građen od krajnje diferenciranih stanica i da takav ostaje tijekom cijelog života te da u odraslom mozgu ne nastaju novi neuroni. Otkrićem neuralnih matičnih stanica kod sisavaca, ali i čovjeka, ta teorija je opovrgnuta (8). Djelovanjem odgovarajućih podražaja dolazi do aktivacije ŽMS, koje zamjenjuju propale ili oštećene stanice (9). Živčane matične stanice se primarno nalaze u dvije regije mozga u većine sisavaca uključujući i čovjeka, a to su subgranularna zona dentatne vijuge i u subventrikularnoj zoni lateralnih moždanih komora. Iako se ŽMS mogu izolirati i iz drugih područja odraslog mozga, adultna neurogeneza jedino se konstantno odvija u SGZ i SVZ (10). Pretpostavlja se da ova dva područja velikog mozga posjeduju mikrookoliš, tzv. neurogena niša (engl. *neurogenic niche*), te sadržava specifične faktore rasta potrebne za proliferaciju i diferencijaciju ŽMS. Neurogena niša se sastoji od krvnih žila, lokalnih astrocita, mikroglije, endodimalnih stanica, ekstracelularnog matriksa i proteoglikana. Lokalni astrociti sintetiziraju proneurogenetske čimbenike, koji potiču neurogenezu. Glavni proneurogenetski čimbenici uključuju transkripcijski čimbenik Sox2 (engl. *sex determining region Y-box2*) i NeuroD1 (engl. *neurogenic differentiation 1*). Osim proneurogenetskih čimbenika važnu ulogu u neurogenoj niši imaju i lokalno sintetizirani neurotransmiteri (npr. GABA), čimbenici rasta (BDNF- brain-derived neurotrophic factor), citokini (IL-6), TNF- $\alpha$ , stresne bjelancevine (MTs I/II- methallothioneins I/II) i Gp96 (glycoprotein 96). Na neurogeni nišu utječu i okolišni čimbenici poput fizičke aktivnosti koja povećava adultnu neurogenezu, dok upala, stres, starenje i alkohol smanjuju neurogenezu (7). SVZ i SGZ su usko povezane s vaskularnim strukturama koje oslobađaju VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) i na taj način krvne žile potiču adultnu neurogenezu. ŽMS u SVZ i SGZ diferencijacijom mijenjaju svoj morfološki oblik i izražaj biljega na svojoj površini. Uzgoj neuralnih matičnih stanica se može vršiti u obliku neurosfera (engl. *neurosphere*) ili u obliku adherentnih kultura stanica (engl. *monolayer*). Neurosfere su stanične kulture koje se sastoje od slobodno plivajućih nakupina neuralnih matičnih stanica. Neurosfere rastu u mediju bez seruma, ali medij sadržava odgovarajuće faktore rasta poput EGF i FGF, koji su neophodni za odražavanje multipotentnosti i samoobnavljajućeg kapaciteta neuralnih matičnih stanica. U takvim medijima neurosfere stvaraju karakteristične trodimenzionalne formacije. Neurosfere

se ne sastoje samo od matičnih stanica već i od progenitornih stanica, neurona, astrocita i oligodendrocita(11) . Nedostatak kod neurosfera je njihova međusobna agregacija što otežava praćenje stanica te tek se manjim dijelom sadržavaju neuralne matične stanice. Adherentne kulture stanica su lakše za praćenje i stanice u njima imaju bolji pristup faktorima rasta. U adherentnim kulturama stanica stanice su manje diferencirane u odnosu na neurosfere.

#### **1.1.4. Primjena matičnih stanica u biomedicinskim istraživanjima**

Posljednjih nekoliko desetljeća matične stanice su olakšale istraživanja u različitim područjima biomedicine. U laboratorijima je moguće pratiti rast, razvoj i diferencijaciju matičnih stanica u određeni tip stanice. To omogućuje proučavanje signalnih putova i mehanizama diferencijacije stanica, te povećava razumijevanje kontrole normalnog razvoja stanica kako tijekom embrionalne faze razvoja tako i u odraslom organizmu. Proučavanjem genetičke i molekularne kontrole diobe i diferencijacije matičnih stanica pomaže u otkrivanju patogeneze urođenih malformacija i tumora, ali i u razvoju novih strategija u terapiji bolesti. Matične stanice su odličan model za proučavanje bolesti: budući da je tehnički zahtjevno u kulturi održavati stanice zahvaćene nekom bolesti, moguće je koristiti stanice koje nose ciljanu mutaciju za neku određenu bolest. Osim za proučavanje patogeneze, matične stanice mogu poslužiti kao model za ispitivanje novih vrsta lijekova, kao primjerice za ispitivanje antitumorskih lijekova. Matične stanice se upotrebljavaju u stvaranju organoide, koji predstavljaju *in vitro* model nekog organa na kojim se mogu istražiti međustanična interakcija, komunikacija stanice s okolišem, te kako patološki procesi i lijekovi utječu na organoide (12).

#### **1.1.5. Terapijska primjena matičnih stanica**

Prva upotreba matičnih stanica u liječenju je bila transplantacija koštane srži tj. multipotentnih hematopoetskih stanica 1956. godine kod pacijenta oboljelog od leukemije. Od tada se primjena matičnih stanica širi na područje leukemije, limfoma i mijeloma. Osim koštane srži izvor stanica može biti pupkovina i periferna krv (13). U ortopediji se koriste mezenhimalne matične stanice u liječenju osteoartritisa i oštećenjima zglobne hrskavice te se istražuje primjena matičnih stanica u liječenju oštećenja tetiva i ligamenata i oporavku skeletnih mišića (14). EMA (engl. *European Medicines Agency*) je 2014. odobrila Holoclar za liječenje deficijencije limbalnih matičnih stanica rožnice (engl. *severe limbal stem cell deficiency-*

LSCD), a od nedavno je u mnogim zemljama odobrena primjena Alofisela, lijeka na bazi matičnih stanica za liječenje komplikacija upalnih bolesti crijeva (15). Velika većina budućih potencijalnih modaliteta liječenja još je u fazama ispitivanja. U kliničkim istraživanjima kod pacijenata s Parkinsonovom bolešću transplantacija ljudskih fetalnih dopaminergičkih neurona pokazala je da matične stanice dovode dugotrajnog poboljšanja kod nekih pacijenata. Istražuje se i primjena matičnih stanica u liječenju moždanog udara. U tim istraživanjima pokušava se postići da matične stanice zamjene mrtve neurone i da se povežu s postojećom neuronskom mrežom (16). Matične stanice predstavljaju obećavajući način liječenja neurodegenerativnih bolesti (npr. Alzheimerova bolest, amiotrofična lateralna skleroza, multipla skleroza, Huntingtonova bolest), srčanih bolesti (infarkt miokarda), oštećenjima vida i sluha, oštećenjima mozga i kralježnične moždine, dijabetesa melitusa i u cijeljenju tkiva.

## 1.2. Mitochondriji

Mitochondriji su stanični organeli čija je glavna uloga proizvodnja energije razgradnjom masnih kiselina i ugljikohidrata. Ono što ih razlikuje u odnosu na ostale stanične organele je vlastita DNA, koja kodira tRNA, rRNA i proteine mitohondrija. Proteini koji izgrađuju mitohondrije kodirani su dijelom iz mitohondrijske DNA, a dijelom iz jezgrine DNA. Genom mitohondrija sačinjavaju kružne molekule DNA te kod čovjeka kodira 13 proteina uključenih u transportni lanac elektrona i oksidativnu fosforilaciju. Proteini koje kodira jezgrina DNA sintetiziraju se na slobodnim ribosomima u citosolu, a zatim se transportiraju u mitohondrije. Mitochondriji su glavni proizvođači energije tj. ATP-a u ljudskim stanicama. Oksidacijom piruvata i masnih kiselina stvara se acetyl-CoA, koji se u matriksu mitohondrija razgrađuje do CO<sub>2</sub> uz redukciju NAD<sup>+</sup> i FAD u NADH i FADH<sub>2</sub>. Zatim se u procesu oksidativne fosforilacije, koja se zbiva na unutarnjoj membrani mitohondrija, visokoenergetski elektroni iz NADH i FADH prenose kroz transportni lanac elektrona na molekularni kisik, a energija koja se oslobađa prijenosom elektrona pohranjuje se u obliku gradijenta protona kroz unutarnju membranu mitohondrija koju ATP-sintaza iskorištava za sintezu ATP-a. Mitochondriji nisu statični organeli već stalno podliježu procesima fuzije i fisije. Proces fuzije i fisije mitohondrija mijenjaju mrežu mitohondrija te utječu na funkciju i morfologiju mitohondrija (4).

### 1.2.1. Mitohondrijske membrane

Mitohondriji imaju dvostruki sustav membrana, koji se sastoji od unutarnje i vanjske membrane međusobno odvojene međumembranskim prostorom. Unutarnja membrana je veća u odnosu na vanjsku te stoga tvori kriste, koje se protežu u matriks mitohondrija. Membrane odjeljuju međumembranski prostor i matriks mitohondrija od citosola. Vanjska membrana je zahvaljujući porinima propusna za molekule manje od 1000 Daltona, pa je sastav međumembranskog prostora sličan sastavu citosola. Unutarnja membrana mitohondrija je građena najvećim dijelom od proteina koji sudjeluju u oksidativnoj fosforilaciji i prijenosu metabolita između matriksa i međumembranskog prostora te je održava sastav matriksa. Unutarnja membrana je nepropusna za većinu iona i malih molekula, što je važno za održavanje gradijenta protona koji pokreće oksidativnu fosforilaciju. Proteini koji se sintetiziraju na slobodnim ribosomima u citosolu u mitohondrije se unose kao polipeptidni lanci. Prijenos proteina u mitohondrije je složen proces zbog dvostrukog sustava membrana mitohondrija. Proteini se usmjeruju prema mitohondrijima s pomoću amino-terminalnih presekvenija koje sadržavaju pozitivno nabijene aminokiseline. Presekvenije se vežu za receptore na površini vanjske membrane mitohondrija, a zatim se prenose u međumembranski prostor. Receptori koji vežu i prenose proteine iz citosola u međumembranski prostor dio su proteinskog kompleksa tzv. Tom kompleksa (engl. *Translocase of the Outer Membrane*). Proteini se zatim prenose iz međumembranskog prostora u matriks mitohondrija uz pomoć Tim kompleksa (engl. *Translocase of the Inner Membrane*) (4).

### 1.2.2. Mitohondrijska dinamika

Mitohondrijska dinamika podrazumijeva promjene u morfologiji mitohondrija kako bi se mitohondriji prilagodili različitim uvjetima dostupnosti nutrijentima i kisiku. Promjene u mitohondrijskoj dinamici zapažene su u različitim bolestima poput dijabetesa, pretilosti, vaskularnim proliferativnim bolestima i u starenju (17). Morfologija mitohondrija razlikuje se između različitih vrsta stanica i tkiva, jer se brzo mijenja odgovarajući na metaboličke potrebe organizma. Mnoge funkcije mitohondrija su povezane s njihovom morfologijom, koja je određena konstantno odvijajućim procesima fuzije i fisije. Ravnoteža između ta dva procesa oblikuje morfologiju mitohondrija u skladu s metaboličkim potrebama. Mitohondrijska dinamika je određena dramatičnim promjenama u morfologiji kao odgovor na metaboličke zahtjeve. Metabolički poremećaji, nedostatak nutrijenata i bolesti dovode do fisije, koja uzrokuje fragmentaciju mitohondrija te ujedno i ubrzava mitofagiju. Fragmentirani mitohondriji su ovalnog ili sferičnog oblika (18). Fisija dovodi do povećanja broja

mitohondrija, ali smanjuje prosječnu veličinu mitohondrija(19). U stanjima dovoljne količine nutrijenata i povećane aktivnosti enzima koji sudjeluju u oksidativnoj fosforilaciji prevladavaju procesi fuzije, koji ujedno sudjeluju u očuvanju staničnog integriteta i u zaštiti od autofagije(18). Tijekom fuzije mitohondriji dobivaju tubularni oblik te mogu stvarati tubularne mreže međusobno povezanih mitohondrija. Fuzija dovodi do smanjenja broja mitohondrija, ali povećava prosječnu veličinu mitohondrija(19). Proteini Mfn2 i Opa1 reguliraju fuziju, dok protein Drp1 regulira fisiju. Neki znanstveni radovi pokazuju da su fuzionirani tj. međusobno povezani mitohondriji prisutni u stanicama koje uglavnom ovise o oksidativnoj fosforilaciji kao izvoru energije. Stanice s nefuzioniranim sferičnim mitohondrijima glavnu energiju proizvode putem glikolize. Većina matičnih stanica sadržava nefuzionirane sferične mitohondrije i ovise o glikolitičkom metabolizmu za proizvodnju ATP-a (20).

### 1.2.2. Mitohondriji u matičnim stanicama

Matične stanice u tkivima se nalaze u hipoksičnim uvjetima, a to posebice vrijedi za embrionalne matične stanice. Matične stanice u usporedbi s diferenciranim stanicama imaju i manji broj mitohondrija. Embrionalne matične stanice iz unutrašnje stanične mase preimplantacijske blastociste imaju nekolicinu mitohondrija, koji su smješteni preinuklearno i imaju slabije razvijene kriste. Kako se embrionalne matične stanice diferenciraju tako raste broj mitohondrija i broj kopija mtDNA (21). Zbog toga u ranim stadijima embrionalne matične stanice glavnu energiju dobivaju anaerobnom glikolizom. Tijekom diferencijacije broj mitohondrija se povećava što dovodi do okretanja metabolizma stanice prema oksidativnoj fosforilaciji. Postoji nekoliko pretpostavki zašto matične stanice imaju manje mitohondrija u odnosu na diferencirane stanice. Jedna od njih je da ovisnost o anaerobnom metabolizmu je evolucijska prilagodba hipoksičnim uvjetima te da se anaerobnim metabolizmom izbjegava stvaranje slobodnih radikala kisika (engl. *reactive oxygen species-ROS*). Drugo objašnjenje je da glikolitički metabolizam stvara intermedijarne produkte potrebne matičnim stanicama za proces samoobnavljanja (22).

### 1.2.3. Metode proučavanja morfologije mitohondrija

Glavna studija mitohondrijske morfologije i dinamike zasniva se na upotrebi široko poljne fluorescencijske mikroskopije (engl. *far-field fluorescence microscopy*). Upotreba specifičnih fluorescentnih boja i fluorescencijske mikroskopije omogućila je bojenje mitohondrija ili



bojenje određenih mitohondrijskih proteina. Različite fluorescencijske probe i potenciometrijske boje upotrebljavaju se za određivanje broja mitohondrija, membransko potencijala mitohondrija, razine oksidativnog stresa, apoptoze i koncentracije kalcijevih iona. Trenutačne fluorescencijske probe koje se koriste za vizualizaciju i praćenje dinamike mitohondrija, poput mitofagije, mogu se podijeliti u dvije skupine: tradicionalne elektrostatski privlačne kationske mitohondrijske probe i MitoTracker probe. Tradicionalne elektrostatski privlačne kationske probe (npr. rodamin 123) kao i većina mitohondrijskih proba ciljaju mitohondrije s izrazito negativnim mitohondrijskim membranskim potencijalom (MMP) i ovise o njemu. Kada se MMP smanji ili nestane, dolazi do izlaska tradicionalnih proba iz mitohondrija van. To otežava upotrebu tih proba u praćenju dinamike mitohondrija. Kako bi se riješio taj problem razvijene su MitoTracker boje. Osim kationskih svojstava, MitoTracker probe sadrže dodatnu reaktivnu benzil klorid skupinu. Kationska svojstva omogućuju ulazak proba u mitohondrije, dok benzil klorid skupina može reagirati s tiolnim skupinama na peptidima i proteinima mitohondrija što zadržava boje unutar mitohondrija čak i kada se MMP smanji ili nestane. Nedostatak MitoTracker proba je što se vežu za tiolne skupine i dovode do smetnji u normalnom metabolizmu mitohondrija, što može djelovati citotoksično (23). Elektronska mikroskopija (EM) je snažan alat za proučavanje ultrastrukture mitohondrija. Kombinacija EM i imunobojanja (eng.*immunostaining*) poboljšana je tehnika prikazivanja morfologije mitohondrija. Upotrebom visokorazlučujuće pretražne elektronske mikroskopije (eng.*high-resolution scanning electron microscopy*) i elektronske tomografije (eng.*electron tomography*) omogućen je 3D prikaz mitohondrija čak i na molekularnoj razini(24).

## **2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA**

### **2.1. HIPOTEZA:**

Primjenom komercijalne boje iz porodice Mitotracker je moguće vizualizirati i pratiti mitohondrije u matičnim stanicama.

### **2.2. CILJEVI RADA:**

1. Uspostaviti bojanje mitohondrija na populaciji živčanih matičnih stanica miša i oralnih matičnih stanica čovjeka.
2. Opisati izgled mitohondrija u matičnim stanicama u normoksijskim uvjetima.
3. Opisati izgled mitohondrija u matičnim stanicama u hipoksijskim uvjetima.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Izolacija matičnih stanica iz sluznice usne šupljine čovjeka

Od uzorka tkiva sluznice usne šupljine čovjeka odvojen je epitel, dok se lamina propria uz pomoć kirurških škarića mehanički usitnila na komadiće u Petrijevoj posudi te je u nju dodano 2mL medija za rast, koji je sadržavao DMEM s niskom razinom glukoze (1mg/L), 1% P/S, 1% L-glutamat i 10% FBS-a. Svaka 2 do 3 dana mijenjan je medij za rast. Nakon 7 do 10 dana tkivo se učvrsti za podlogu, dok stanice izlaze iz tkiva van. Pošto se tu radi o adherentnim stanicama bilo je potrebno ukloniti tkivo i odlijepiti stanice. Prvo su stanice isprane s 2mL DPBS-a, a zatim je dodano 2mL akutaze na 8 minuta. Nakon 8 minuta djelovanje akutaze je neutralizirano s 4 mL DMEM-a s niskom razinom glukoze te su stanice centrifugirane na 200g tijekom 6 minuta. Po završetku centrifugiranja supernatant je uklonjen, a talogu stanice je dodano 2mL medija za rast uz nježno resuspendiranje. Stanice su zatim prebrojane i nasadene u flask s 15mL medija za rast i uzgajane u inkubatoru na 37°C i 5% CO<sub>2</sub>.

#### 3.2. Izolacija živčanih matičnih stanica

Za izolaciju stanica korišteni su miševi soja C57BL6. Stanice su uzete iz mišjih embrija žrtvovanih ženki gravidnih 14 dana. Ženke miševa su eutanazirane cervikalnom dislokacijom, a zatim su postavljene na leđa. Trbuh je dezinficiran 70% alkoholom. Iz abdomena su izvađena oba roga maternice s embrijima i premještena su u sterilnu Petrijevu posudu s hladnim PBS-om. Iz maternice su izolirani embriji i prebačeni u novu čistu Petrijevu posudu s PBS-om. Zatim smo glave embrija odvojili od ostatka tijela na mjestu vratne leđne moždine. Na glavi je načinjen sagitalni rez kroz kožu i lubanju od kranijalnog kraja glave i izvađen je telencefalon koji je stavljen u sterilnu tubu s čistim PBS-om. Postupak je ponovljen na svim ostalim embrijima. Izolirane telencefalone smo zatim s pipetom prenijeli u Petrijevu posudu s čistim PBS-om te smo ih usitnili škarićama. Nakon toga smo usitnjene mozgove prenijeli pipetom u sterilne tube (BD Falcon 50mL) i dodali 5mL akutaze. Tijekom tog razdoblja tuba je grijana u ruci i lagano protresena, a nakon 10. minute lagano smo triturirali pipetom te nastavili još 10 minuta grijati uz lagano protresanje. Nakon 20 minuta pipetom smo prebacili mutni stanični sadržaj u novu sterilnu tubu s 10mL DMEM/F-12. DMEM/F-12 blokira daljnje djelovanje akutaze. Tubu sa stanicama smo zatim centrifugirali na 400g/6min (2070 o/min) na 21°C. U međuvremenu je pripremljeno 22mL medija za rast. Nakon centrifugiranja pipetom je odstranjen supernatant i u talog stanica dodano je 2mL medija. Tuba je lagano protresena

kako bi se talog resuspendirao i nakon toga suspenzija stanica je prebačena u ostatak prethodno pripremljenog medija za rast. Suspenziju stanica u mediju za rast pipetom je nasađena u T 75 flask. Na ovaj način pripremljena je nulta pasaža stanica (P0). Sadržaj flaske s nultom pasažom je centrifugiran. Talog koji je ostao u tubi nakon centrifugiranja je resuspendiran u 1mL medija za rast (DMEM/F12, B27, N2, EGF, FGF) i dodan 1mL medija za zamrzavanje stanica (20% DMSO) te su stanice nježno resuspendirane i raspoređene u kriotube od 1mL, koje su stavljene na  $-80^{\circ}\text{C}$  u zamrzivač. Nakon što su stanice provele jedan dan na  $-80^{\circ}\text{C}$  prebačene su u tekući dušik. Za potrebe pokusa korištene su odmrznute neurosfere (P1, NSC C57 BL6). Za odmrzavanje je priređeno 30mL medija za rast živčanih matičnih stanica (DMEM/F-12, N2, B27, EGF, FGF), koji je razdijeljen u dvije tube (9mL i 21mL) i stavljen u vodenu kupelj na  $37^{\circ}\text{C}$ . Cryovial iz tekućeg dušika je stavljen u zamrzivač na  $-80^{\circ}\text{C}$ , a zatim u vodenu kupelj na  $37^{\circ}\text{C}$  cca. 30 sekundi dok se sadržaj nije odmrznuo. Sadržaj cryovala je stavljen u tubu s 9mL medija za rast, nježno resuspendiran te centrifugiran na 200g 5 minuta. Nakon centrifugiranja supernatant je uklonjen, a u talog stanica dodano je 21mL medija za rast.

### 3.3. Uzgoj neurosfera

Nakon što su živčane matične stanice izolirane i nasađene u flasku stavljene su u inkubator na temperaturu  $37^{\circ}\text{C}$  i 5%  $\text{CO}_2$ . Unutar 24 do 48 sati nakon nasađivanja počinju se stvarati neurosfere. Stanice je potrebno nakon 2 dana nadohraniti 1/10 od ukupne količine medija za rast. Nakon trećeg ili četvrtog dana neurosfere je potrebno disocirati i nasaditi za daljnje pasaže.

### 3.4. Disocijacija živčanih matičnih stanica

Živčane matične stanice u neurosferama su međusobno povezane tvoreći kuglastu nakupinu stanica, što otežava jednak prodor boje do svih stanica. Stoga je potrebno razbiti neurosfere kako bi dobili pojedinačne stanice, ali i slobodne stanice za daljnje pasažiranje. Uzgojene neurosfere su prebačene iz flaska zajedno s medijem za rast u sterilnu tubu od 50 mL i centrifugirane brzinom od 300g, 6 minuta na  $21^{\circ}\text{C}$ . Nakon centrifugiranja odstranjen je supernatant, a u talog stanica dodano je 3mL akutaze te je tuba grijana u ruci uz lagano treskanje i trituriranje tipsom 10 minuta. Akutaza nam je omogućila razdvajanje stanice iz neurosfera čime smo dobili suspenziju živčanih matičnih stanica. Stanična suspenzija je zatim prebačena u novu tubu u koju je i dodano 9mL medija DMEM/F-12 za neutralizaciju akutaze uz lagano resuspendiranje. Zatim je tuba sa stanicama stavljena na centrifugiranje 400g na 6 minuta, a u međuvremenu je pripremljeno 22mL medija za rast., koji se sastoji od 22mL

medija DMEM/F-12 (Invitrogen), 220  $\mu$ l N2 (Invitrogen), 220  $\mu$ l Pen/Strep (PAA), 440  $\mu$ l B27 (Invitrogen), 44  $\mu$ l EGF (Invitrogen), 44  $\mu$ l FGF (Invitrogen). 20mL medija je prebačeno u flasku, a 2mL je dodano uz resuspendiranje u talog nakon centrifugiranja. Resuspendirani sadržaj je zatim prebačen u flasku gdje se nalazi 20mL medija za rast.

### **3.5. Izlaganje živčanih matičnih stanica normoksiji i hipoksiji**

Živčane matične stanice su podijeljene u dvije skupine. Jedan skupina je boravila 24 sata u normoksiji, a druga skupina je boravila u hipoksijskim uvjetima na 1% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub> na temperaturi od 37°C tijekom 24 sata u inkubatoru. Svaka skupina stanica je podijeljena je u dvije podgrupe. Jedna podgrupa je nakon dvadeset četverosatne normoksije tj. hipoksije boravila 6, a druga podgrupa 24 sata u normoksiji do trenutka bojenja i fiksacije.

### **3.6. Bojenje stanica Mitotrackerom**

Za bojanje mitohondrija živčanih matičnih stanica i matičnih stanica iz sluznice usne šupljine korišten je MitoTracker® Red CMXRos. Boja je čuvana na temperaturi od -20°C te ju je prije upotrebe bilo potrebno ugrijati do sobne temperature. Boja je zatim otopljena u DMSO-u do koncentracije od 1mM kako bi imali radnu otopinu i otopinu za zalihu. Razrjeđivanjem otopine boje koncentracije 1mM s medijem za rast dobili smo završnu otopinu boje koncentracije 150nM. Stanice su bile nasađene na cover slipovima u 24 well plateove s medijem za rast. Prije bojanja uklonjen je medij za rast, a otopina s bojom je ugrijana u vodenoj kupelji na 37°C. Boju smo zatim dodali u bunariće sa stanicama i inkubirali 20 minuta. Nakon 20 minuta boja je zamijenjena s medijem za rast koji je prethodno ugrijan te su stanice pripremljene za mikroskopiranje.

### **3.7. Fiksacija stanica**

Živčane matične stanice koje su bile u normoksijskim i hipoksijskim uvjetima su fiksirane s 4%PFA. U svaki bunarić sa stanicama stavljeno je 500 $\mu$ L 4% PFA na 10 minuta nakon čega je PFA ispran s DPBS-om tri puta. Fiksacija stanica je vršena 6 i 24 sata nakon izlaganja različitim uvjetima. Normoksijska skupina stanica bile je izložena cijelo vrijeme normoksiji do trenutka fiksacije. Hipoksijska skupina stanica je bila izložena dvadeset četverosatnoj hipoksiji, a zatim 6 i 24 sata normoksiji do trenutka fiksacije.

### **3.7. Snimanje matičnih stanica na EVOS uređaju**

EVOS uređaj je mikroskop koji omogućuje automatsko slikanje stanica te podešavanje okolišnih uvjeta u kojima se stanice nalaze poput vlage, koncentracije CO<sub>2</sub> i temperature. Uz

pomoć EVOS-a gledali smo matične stanice obojene s Mitotrackerom 6 i 24 sata nakon fiksacije s PFA. Prilikom mikroskopiranja stanica snimljene su stanice s jasno obojenim mitohondrijima.

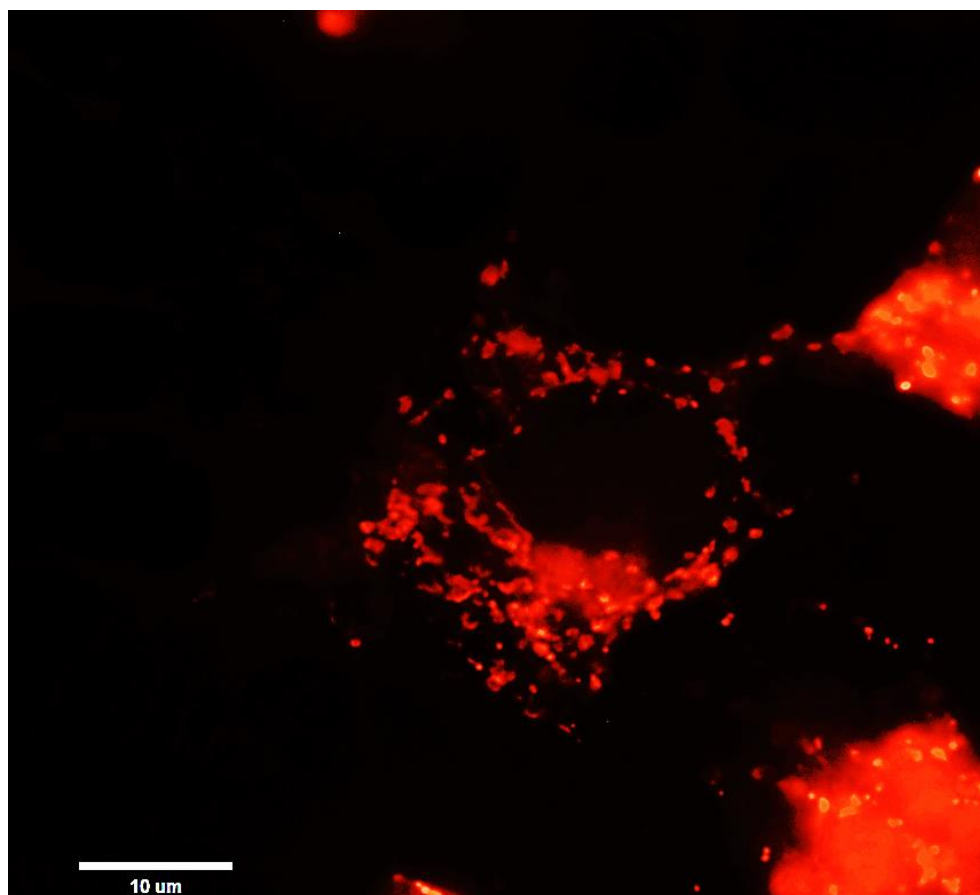
### **3.8. Obrada mikroskopskih slika u ImageJ-u**

Slike koje su snimljene uz pomoć EVOS-a obrađene su u ImageJ sustavu, koji omogućuje obradu slika na način da analiziraju stanice i unutarstanične strukture. Uz pomoć „Mitochondrial Morphology“ priključka (engl. *plug-in*) vršena je analiza mikroskopskih slika obojenih mitohondrija. ImageJ je omogućio određivanje oblika mitohondrija te ukupnu mitohondrijsku površinu u stanici u usporedbi sa samom stanicom tj. udio ukupne površine mitohondrija u odnosu na površinu stanice. Tako je omogućeno praćenje količine mitohondrija u živčanim matičnim stanicama, koje su bile izložene normoksijskim i hipoksijskim uvjetima.

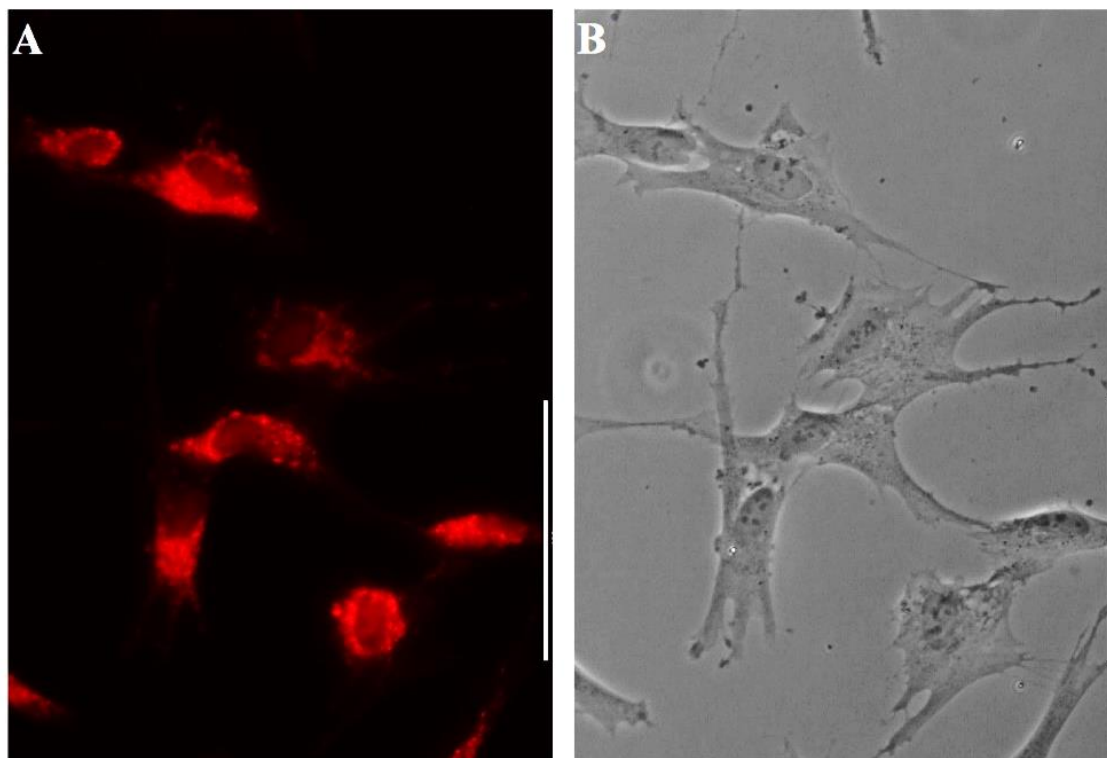
## 4. REZULTATI

### 4.1. Komercijalna boja MitoTracker se može uspješno koristiti za vizualizaciju mitohondrija u živčanim matičnim stanicama i oralnim matičnim stanicama sluznice čovjeka

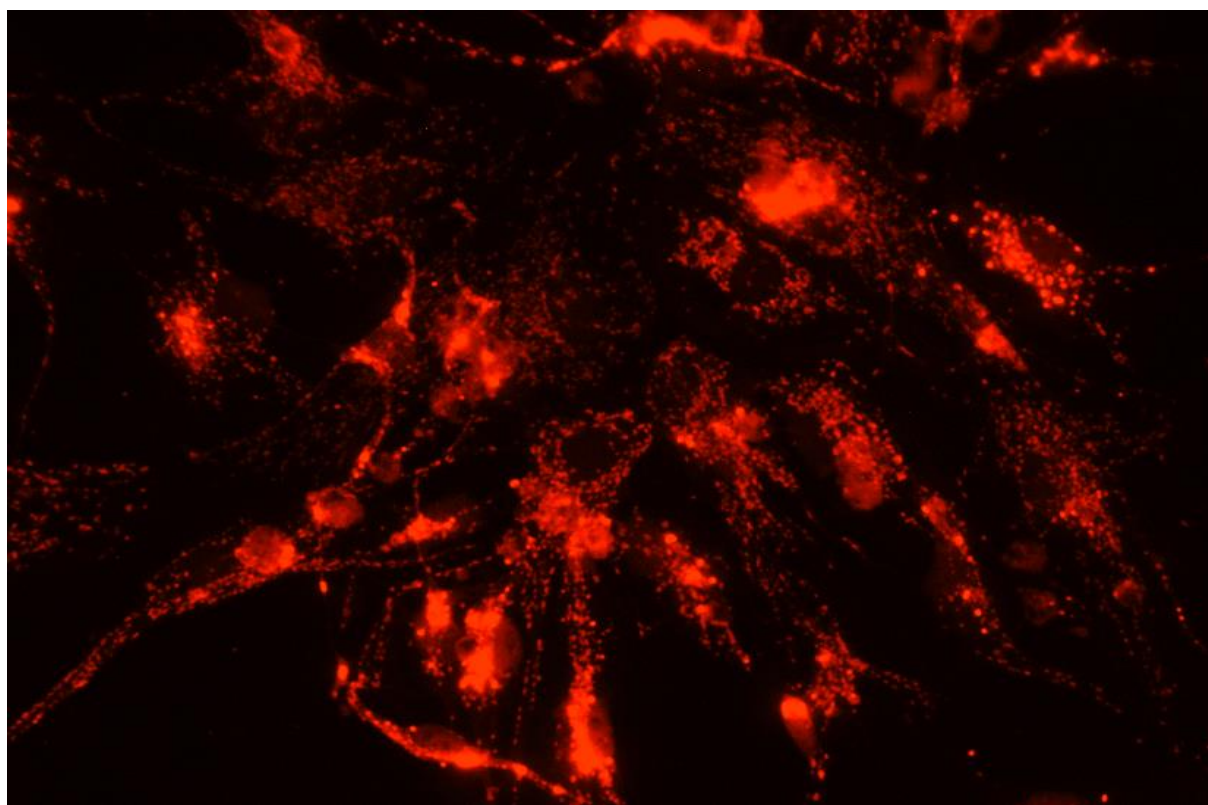
Nakon bojanja stanica s MitoTracker® Red CMXRos stanice su snimljene EVOS uređajem. Boja je uspjela prikazati mitohondrije u živčanim matičnim stanicama (slika 1.) i u oralnim matičnim stanicama sluznice čovjeka (slika 2.). Mitohondriji u matičnim stanicama većinom su smješteni perinuklearno (slika 3. i slika 4.).



**Slika 1.** Prikaz mitohondrija u živčanoj matičnoj stanici, koji su obojani s MitoTracker® Red CMXRos bojom.

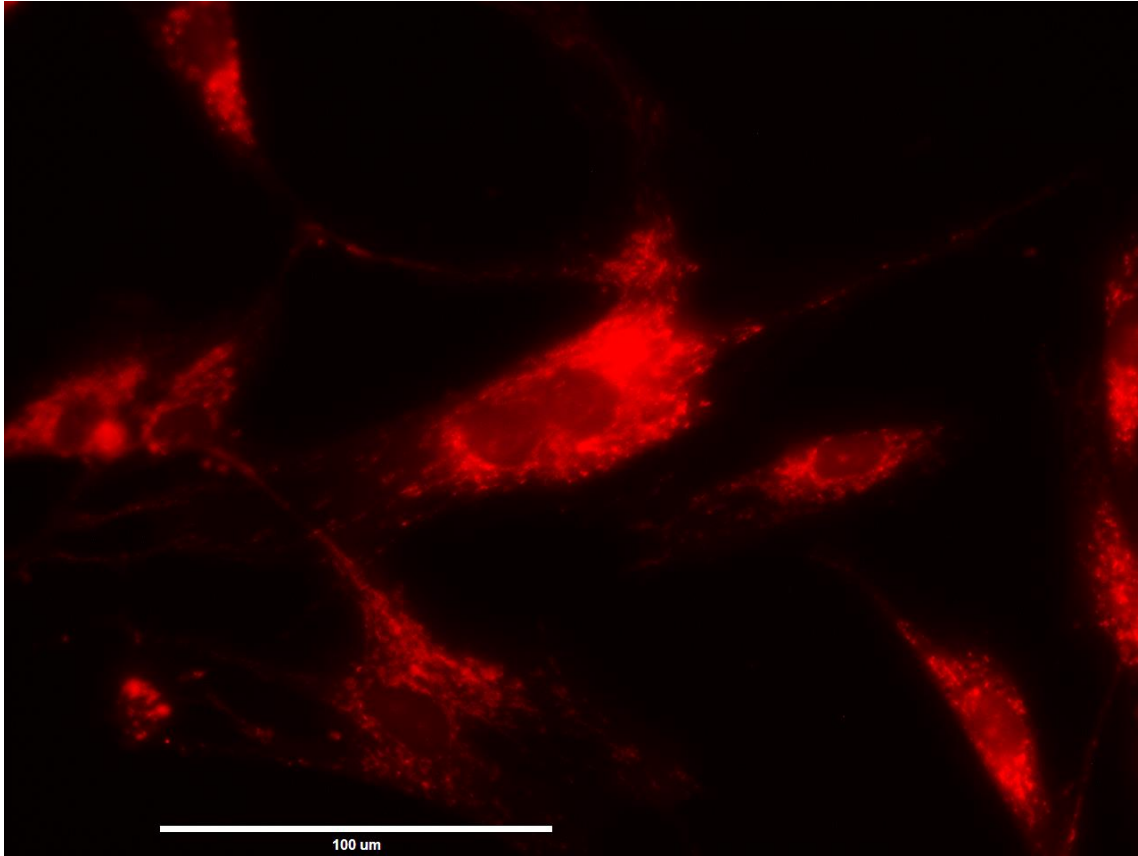


**Slika 2.** Prikaz matičnih stanica oralne sluznice čovjeka: A) Unutar stanica vidljivi mitohondriji obojani MitoTracker® Red CMXRos, B) Stanice prikazane osvijetljene LED svjetlom



**Slika 3.** Mitohondriji živčanih matičnih stanica obojenih s MitoTracker® Red CMXRos.

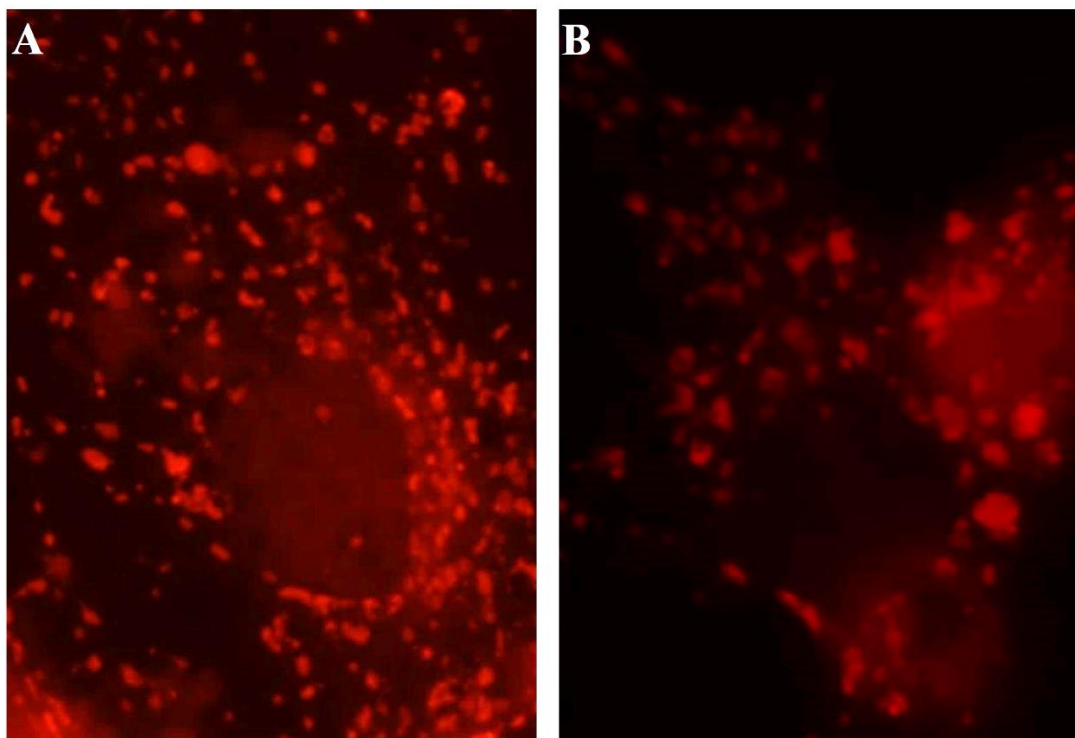




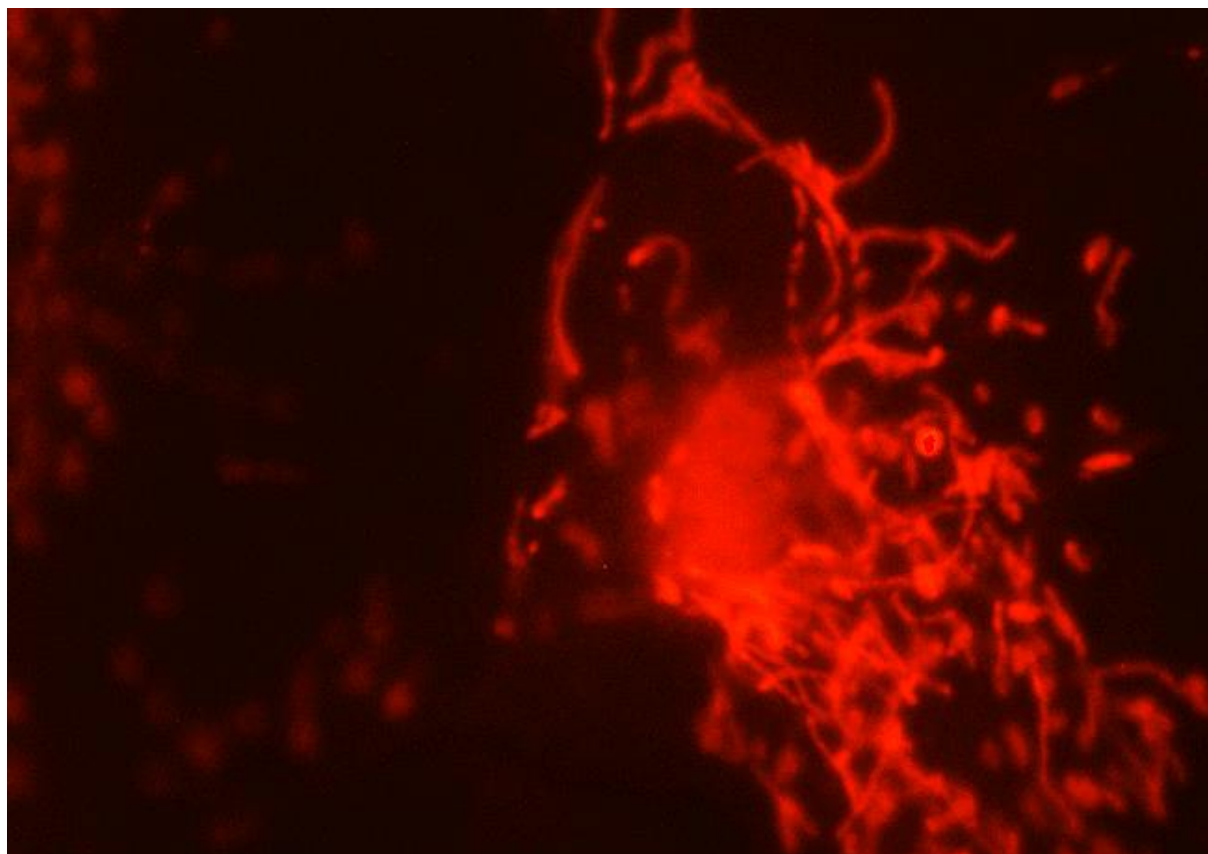
**Slika 4.** Smještaj mitohondrija u hOMSC obojanih s MitoTracker® Red CMXRos.

#### **4.2. Mitohondriji živčanih matičnih stanica u normoksijskim uvjetima**

Analizom mikroskopskih slika vidljivo je da je većina mitohondrija živčanih matičnih stanica, koje su bile u normoksijskim uvjetima, ovalnog i sferičnoga oblika ili se sferični mitohondriji nalaze u grozdastim nakupinama (Slika 5.). U pojedinim stanicama mogu se vidjeti kratki tubularni mitohondriji, koji su međusobno povezani u mrežaste strukture (slika 6.). Nisu pronađene znatne razlike u obliku mitohondrija koji su boravili u normoksijskim uvjetima 6 i 24 sata prije fiksacije.



**Slika 5.** Oblici mitohondrija u živčanim matičnim stanicama izloženima normoksijskim uvjetima: A) Mitohondriji sferičnog i ovalnog oblika, B) Mitohondriji u grozdastim nakupinama

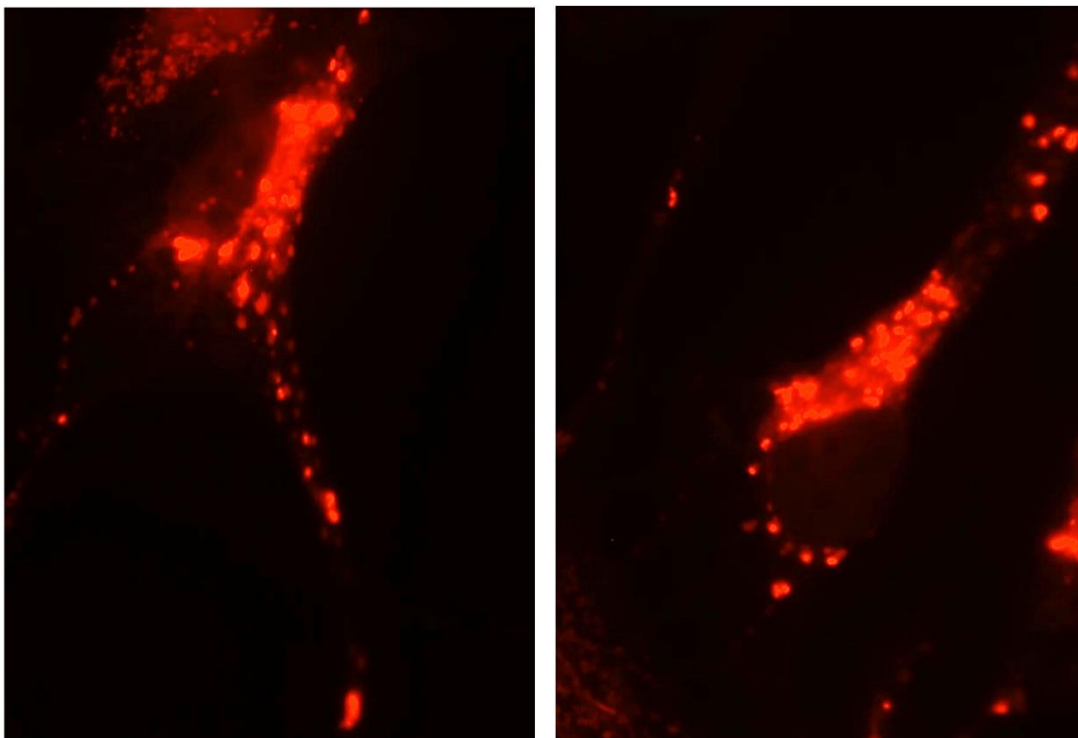


**Slika 6.** Živčana matična stanica s mitohondrijima tubularnog oblika.

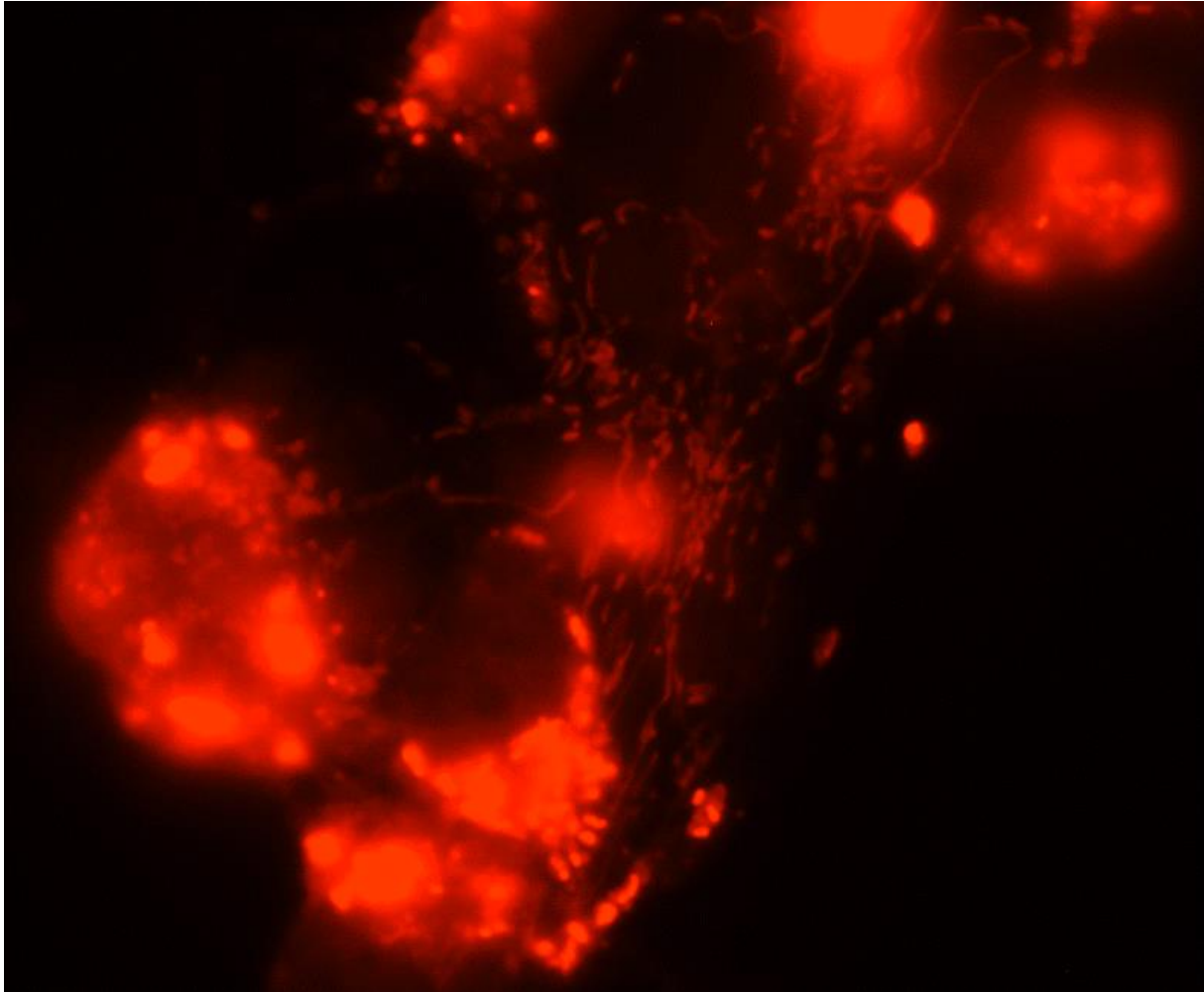
Obradom mikroskopskih slika stanica u ImageJ-u dobili smo podatke o udjelu mitohondrija u živčanim matičnim stanicama. Udio mitohondrija u živčanim matičnim stanicama, koje su uzgajane u normoksijskim uvjetima 6 sati prije fiksacije je iznosila 21.438% (raspon 15,2%-48,7%). Udio mitohondrija u živčanim matičnim stanicama koje su boravile u normoksijskim uvjetima 24 sati do fiksacije iznosi je iznosila 21.784% (raspon 10,2%-40,4%) (Grafikon 1.) (Slika 9.).

#### 4.3. Mitohondriji živčanih matičnih stanica u hipoksijskim uvjetima

Analizom mikroskopskih slika vidljivo je da je većina mitohondrija živčanih matičnih stanica koje su bile izložene hipoksijskim uvjetima, ovalnog i sferičnoga oblika ili se sferični mitohondriji nalaze u grozdastim nakupinama (Slika 7.). U pojedinim stanicama, koje su nakon izlaganje hipoksiji boravile 24 sata u normoksiji do fiksacije, vidljivi su mitohondriji tubularnoga oblika. (Slika 8.)

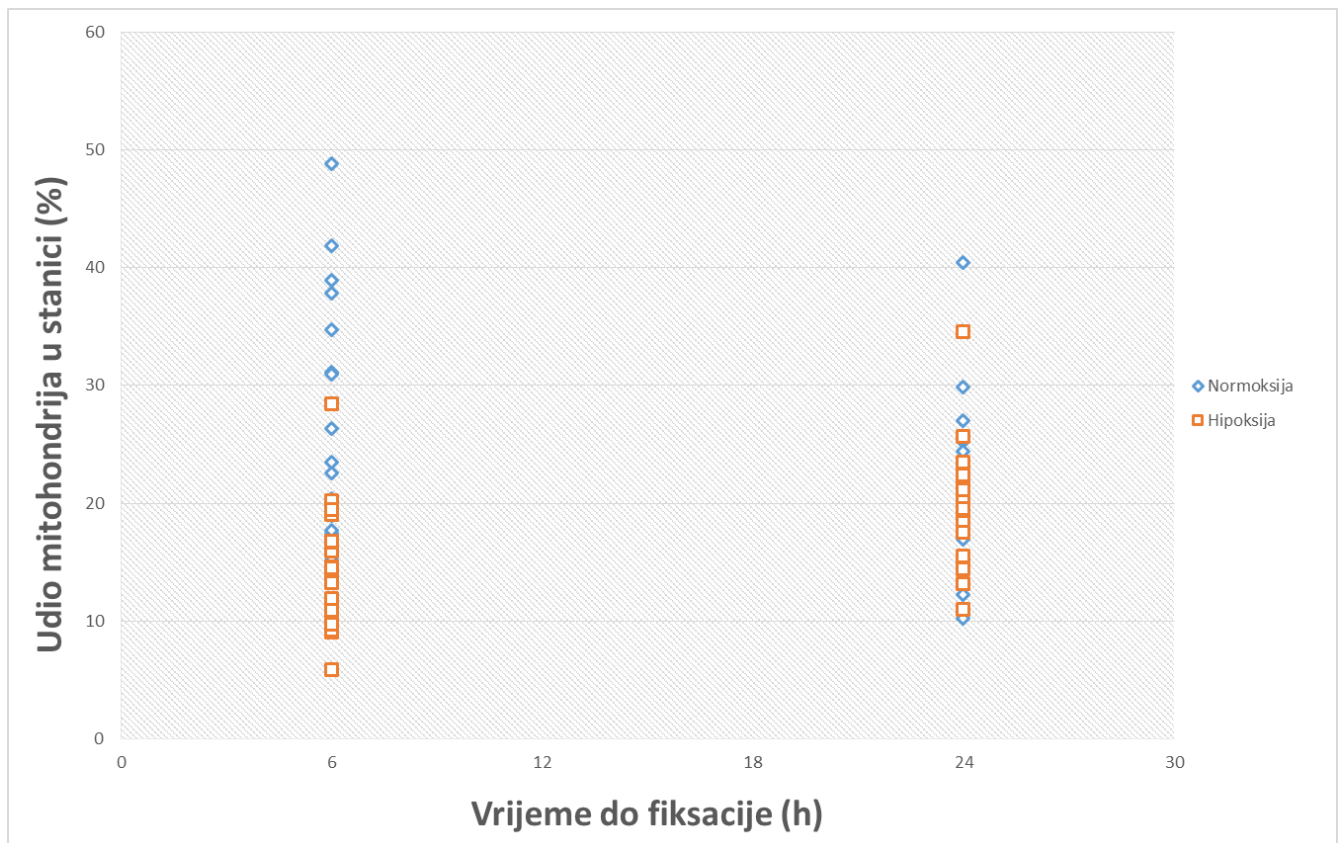


**Slika 7.** Mitohondriji ovalnog i sferičnog oblika u živčanim matičnim stanicama izloženima hipoksijskim uvjetima.



**Slika 8.** Stanice s mitohondrijima tubularnog oblika.

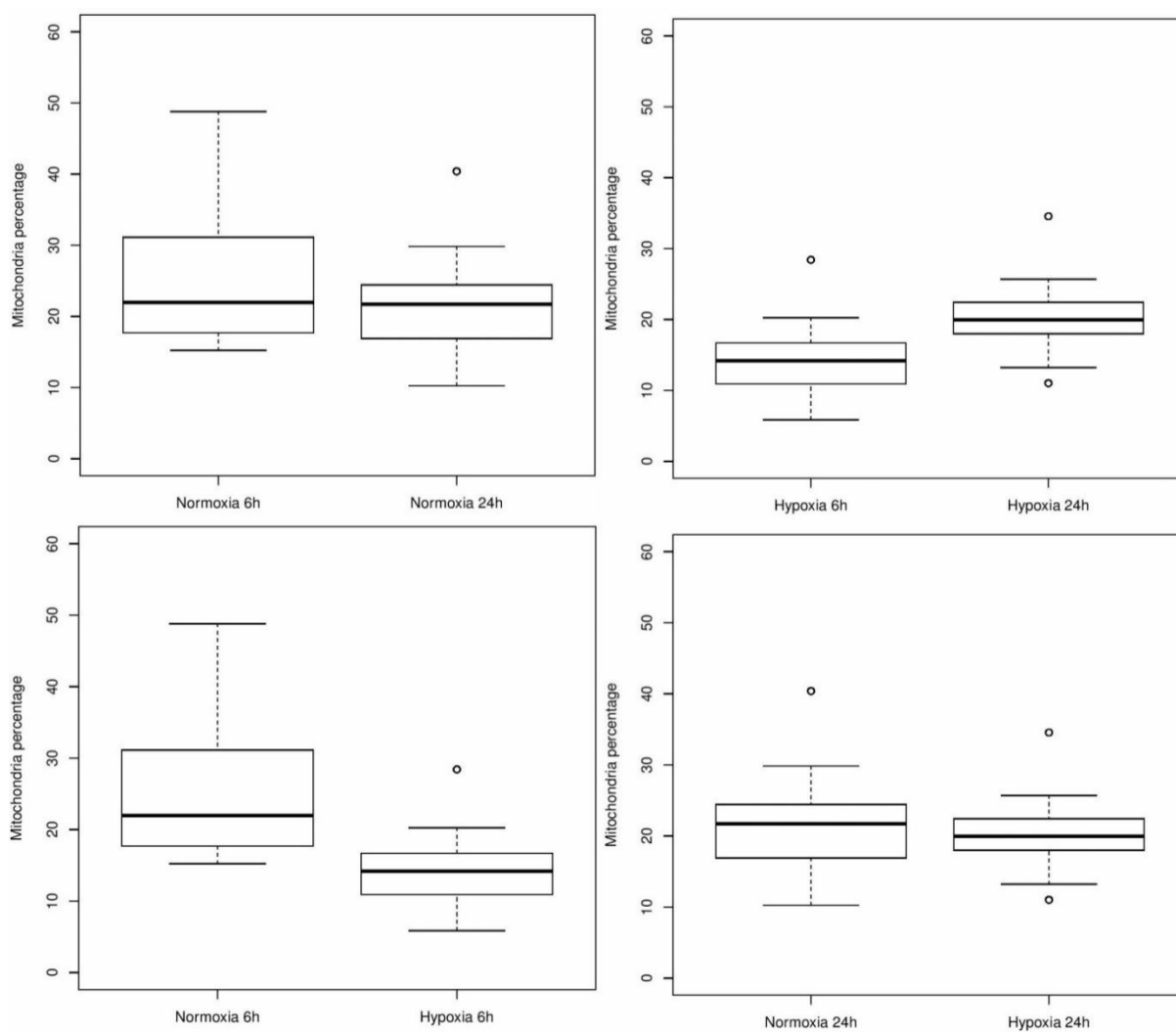
Obradom mikroskopskih slika živčanih matičnih stanica, koje su boravile u hipoksijskim uvjetima, u ImageJ-u dobiveni su podatci o udjela mitohondrija u udjelu u stanici. Udio mitohondrija u živčanim matičnim stanicama, koje su nakon hipoksije boravile u normoksiji 6 sati do fiksacije je iznosio 14.165% (raspon 5,8%-28,4%). U skupini živčanih matičnih stanica, koje su nakon hipoksije boravile u normoksiji 24 sata do fiksacije, udio mitohondrija je iznosio 19.832% (raspon 11,01%-34,5%) (Grafikon 1.) (Slika 9.).



**Grafikon 1.** Prikaz udjela mitohondrija u sastavu stanice ovisno o vremenu fiksacije.

U statističkoj obradi podataka upotrebljen je Wilcoxon signed rank test za usporedbu podgrupa unutar normoksijske skupine stanica i za usporedbu podgrupa unutar hipoksijske skupine stanica. Za usporedbu između normoksijske i hipoksijske skupine živčanih matičnih stanica, koje su fiksirane nakon 6 sati, upotrebljen je Wilcoxon rank sum test te je isti test upotrebljen za usporedbu između normoksijske i hipoksijske skupine živčanih matičnih stanica, koje su fiksirane nakon 24 sata.

Međusobnom usporedbom normoksijskih podgrupa stanica ne postoji statistički značajna razlika između udjela mitohondrija u stanici ( $p=0.058$ ). Usporedbom hipoksijskih podgrupa stanica prisutna je statistički značajna razlika u udjelu mitohondrija u stanici ( $p= 0.00014$ ). Usporedbom skupina normoksijskih i hipoksijskih živčanih matičnih stanica, koje su fiksirane nakon 6 sati, nađena je statistički značajna razlika u udjelu mitohondrija u sastavu stanice ( $p<0.001$ ). Usporedbom skupina normoksijskih i hipoksijskih živčanih matičnih stanica, koje su fiksirane nakon 24 sata, nije nađena statistički značajna razlika u udjelu mitohondrija u stanici ( $p= 0.395$ ) (Slika 9.).



**Slika 9.** Kutijasti dijagrami skupina živčanih matičnih stanica.

## 5. RASPRAVA

Rezultati potvrđuju da je upotrebom MitoTracker® Red CMXRos moguće vizualizirati mitohondrije u oralnim matičnim stanicama čovjeka i živčanim matičnim stanicama s ciljem praćenja mitohondrijske dinamike i njihova izgleda. Inkubacija MitoTracker® Red CMXRos boje sa stanicama tijekom 20 minuta pokazala se dostatnom za bojenje mitohondrija bez neželjenih učinaka poput bojenja drugih staničnih organela i citotoksičnosti.

U većini živčanih matičnih stanica mitohondriji imaju perinuklearni smještaj. Prednosti perinuklearnog smještaja mitohondrija u matičnim stanicama nije do kraja razjašnjenja. Pretpostavlja se da takav smještaj omogućuje uzajamno djelovanje mitohondrija i jezgre iz nekoliko razloga. U jezgri su smješteni geni koji kodiraju određeni broj mitohondrijskih proteina. Za transkripciju mtDNA potrebna je mitohondrijska DNA polimeraza čiji je dio POLG. Polipeptidi poput POLG-a prenose se u mitohondrije, a prijenos je možda učinkovitiji ukoliko su mitohondriji grupirani oko jezgre. Prijenos makromolekula iz i u jezgru preko jezgrinih pora zahtjeva energiju, pa se smatra da perinuklearni smještaj osigurava dovoljnu količinu energije za transport makromolekula. Nagađa se da nakupljanje mitohondrija oko jezgre štiti samu jezgru od promjena razine  $Ca^{2+}$  u citoplazmi(21).

Mitohondriji u živčanim matičnim stanicama, koje su cijelo vrijeme bile u normoksijskim uvjetima, imaju ovalan, sferičan ili tubularan oblik. Nakupine sferičnih mitohondrija označavaju preklapanje zasebnih sferičnih mitohondrija, koji nisu međusobno povezani u mitohondrijsku mrežu. Prisustvo sferičnih, ovalnih i tubularnih oblika mitohondrija u živčanim matičnim stanicama ukazuju na ravnotežu između mitohondrijskih procesa fuzije i fisije. Ravnoteža između ta dva procesa dovodi do podjednake zastupljenosti različitih oblika mitohondrija(18). Medijan udjela mitohondrija normoksijske skupine stanica, koje su fiksirane nakon 6 sat, iznosi 21.438% (raspon 15,2%-48,7%). Medijan normoksijske skupine stanica, koje su fiksirane nakon 24 sata, iznosi 21.784% (raspon 10,2%-40,4%). Usporedbom medijana udjela mitohondrija između tih dviju skupina stanica iz normoksije vidljivo je da nema znatne razlike između skupina stanica koje su do fiksacije provele različito vrijeme u normoksijskim uvjetima. Podjednaki udio mitohondrija između tih dviju skupina ukazuje da konstantni normoksijski uvjeti održavaju homeostazu između mitohondrijskih procesa fisije i fuzije. Mitohondriji živčanih matičnih stanica, koje su bile u normoksiji 6 sati nakon hipoksije, imaju samo sferičan ili ovalan oblik. U ovoj skupini stanica hipoksija je dovela do izraženije fisije tj. fragmentiranja mitohondrija, pa su zbog toga mitohondriji samo sferičnog i ovalnog izgleda. Izlaganje hipoksiji prouzročilo je stanični odgovor na hipoksiju putem HIF-1.

Povećanje HIF-1 povećava ekspresiju gena za glikolitičke enzime uz istovremeno smanjenje aktivnost oksidativne fosforilacije mijenjajući sastav transportnog lanca elektrona kako bi se smanjila količina slobodnih radikala kisika(25). Porast HIF-1 promiče fisiju mitohondrija putem Drp1(26). Fisiju možemo smatrati preventivnim mehanizmom za smanjenje slobodnih kisikovih radikala tijekom hipoksije, ali i usmjeravanjem mitohondrija k mitofagiji u slučaju dugotrajnije hipoksije(25). S druge pak strane mitohondriji živčanih matičnih stanica, koje su provele 24 sata u normoksiji nakon hipoksije, imaju uz sferičan i ovalni oblik još i tubularne mitohondrije što ukazuje da su se u međuvremenu odvijali procesi fuzije te da su se u stanici obnovili metabolički putevi koji se odvijaju putem mitohondrija.

Medijan udjela mitohondrija hipoksijske skupine stanica, koje su fiksirane nakon 6 sati, iznosi 14.165%. Medijan udjela mitohondrija hipoksijske skupine stanica, koje su fiksirane nakon 24 sata, iznosi 19.832%. Živčane matične stanice koje su fiksirane 6 sati nakon izlaganja hipoksiji imaju za 5,667% manji udio mitohondrija u staničnom sastavu u odnosu na stanice koje su fiksirane 24 sata nakon hipoksije. Manji udio mitohondrija može se objasniti utjecajem hipoksije. Naime, hipoksija reducira mitohondrijsku masu pokretanjem mitofagije(25). Druga skupina stanica koja je provela 24 sata nakon hipoksije u normoksijskim uvjetima uspjela povećati svoj broj mitohondrija. Povećanje udjela mitohondrija tijekom boravka u normoksijskim uvjetima nakon dvadeset četverosatne hipoksije može se objasniti prestankom poticaja hipoksije na mitofagiju. Osim toga, povećanje udjela mitohondrija može biti posljedica transfera mitohondrija između živčanih matičnih stanica. Istraživanja su pokazala da matične stanice imaju mogućnost transfera mitohondrija drugim matičnim i somatskim stanicama s ciljem zamjene oštećenih mitohondrija i obavljanja njihove funkcije(27).

Uspoređivanjem normoksijske i hipoksijske skupine živčanih matičnih stanica, koje su fiksirane nakon 6 sati, prisutna je razlika od 7,273% između udjela mitohondrija u stanicama što ukazuje na negativan učinak hipoksije na udio mitohondrija u živčanim matičnim stanicama. Uspoređivanjem normoksijske i hipoksijske skupine živčanih matičnih stanica, koje su fiksirane nakon 24 sata, razlika u udjelu mitohondrija je 1,606% što ukazuje da dvadeset četverosatni boravak živčanih matičnih stanica u normoksiji nakon hipoksije dovodi do oporavka mitohondrija.



## **6. ZAKLJUČCI**

1. MitoTracker® Red CMXRos boja omogućuje vizualizaciju mitohondrija u matičnim stanicama i proučavanje oblika mitohondrija.
2. MitoTracker® Red CMXRos omogućuje praćenje mitohondrijske dinamike u matičnim stanicama.
3. Različito vrijeme boravka živčanih matičnih stanica u normoksijskim uvjetima ne utječe na oblik i udio mitohondrija u živčanim matičnim stanicama.
4. Hipoksija utječe na oblik i udio mitohondrija u matičnim stanicama.

**7. ZAHVALA**

Zahvaljujem se svom mentoru, prof.dr.sc.Dinku Mitrečiću, na podršci i pomoći tijekom pisanja diplomskoga rada. Srdačno se zahvaljujem Valentini Hribljan, Damiru Lisjaku i Denisu Jagečiću na strpljenu, savjetima i tehničkoj pomoći prilikom izrade rada. Veliko hvala prijatelju i kolegi Igoru Radanoviću na pomoći oko statistike.

Posebnu zahvalu iskazujem svome ocu i majci, koji su mi uvijek bili podrška i pomoć tijekom moga obrazovanja i koji su me usmjeravali na pravi put. Zahvaljujem se svojim sestrama, bratu, ujaku i ujni što su bili uvijek uz mene tijekom studija. Zahvaljujem se svim svojim prijateljima koji su mi bili podrška i pomoć tijekom učenja i koji su mi studentski život učinili lijepim i radosnim razdobljem života.

## 8. LITERATURA

1. Matične stanice [Internet]. 2019. Available from: <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=39441>
2. C. Mummery, A. van de Stolpe BR H Clevers. What are stem cells? In: Stem Cell Scientific Facts and Fiction. 2nd Edition. London: Elsevier; 2014. p. Str. 53-64.
3. Stem Cell Basics | stemcells.nih.gov [Internet]. [cited 2019 May 27]. Available from: <https://stemcells.nih.gov/info/basics.htm>
4. G.M.Cooper, R.E.Hausman. Bioenergetika i metabolizam. In: Stanica molekularni pristup. 5.izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. p. Str. 433-444.
5. Marynka-Kalmani K, Treves S, Yafee M, Rachima H, Gafni Y, Cohen MA, et al. The Lamina Propria of Adult Human Oral Mucosa Harbors a Novel Stem Cell Population. STEM CELLS. 2010;N/A-N/A.
6. Alajbeg I. ISOLATION, CHARACTERIZATION AND DIFFERENTIATION POTENTIAL OF ORAL MUCOSAL STEM CELLS. Med Sci. 2018;10.
7. Zavod za fiziologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, Grubić Kezele T, Fužinac-Smojver A, Čurko-Cofek B, Jakovac H, Turković K. Adult neurogenesis – accent on subgranular and subventricular zone in mammals. Med Flum. 2017 Jun 1;53(2):136–46.
8. Faris Q. B. Alenzi. Stem cells: Biology and clinical potential. Afr J Biotechnol [Internet]. 2011 Dec 30 [cited 2019 May 27];10(86). Available from: <http://www.academicjournals.org/AJB/abstracts/abs2011/30Dec%20Special%20Review/Alenzi%20et%20al.htm>
9. Buravkova LB, Andreeva ER, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mesenchymal stem cells and hypoxia: Where are we? Mitochondrion. 2014 Nov;19:105–12.
10. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. Cell. 2008 Feb;132(4):645–60.
11. Bergström T, Forsberg-Nilsson K. Neural stem cells: Brain building blocks and beyond. Ups J Med Sci. 2012 May;117(2):132–42.
12. What are Stem Cells? Types of Stem Cell and their Uses [Internet]. [cited 2019 May 28]. Available from: <https://www.eurostemcell.org/types-stem-cells-and-their-uses>
13. The History of Stem Cell Treatment [Internet]. National Stem Cell Centers. 2017 [cited 2019 May 28]. Available from: <https://www.nationalstemcellcenters.com/2017/12/29/history-stem-cell-treatment/>
14. Berebichez-Fridman R, Gómez-García R, Granados-Montiel J, Berebichez-Fastlicht E, Olivos-Meza A, Granados J, et al. The Holy Grail of Orthopedic Surgery: Mesenchymal Stem Cells—Their Current Uses and Potential Applications. Stem Cells Int. 2017;2017:1–14.

15. Anonymous. First stem-cell therapy recommended for approval in EU [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [cited 2019 May 28]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/news/first-stem-cell-therapy-recommended-approval-eu>
16. Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature*. 2006 Jun;441(7097):1094–6.
17. McClatchey PM, Keller AC, Bouchard R, Knaub LA, Reusch JEB. Fully automated software for quantitative measurements of mitochondrial morphology. *Mitochondrion*. 2016 Jan;26:58–71.
18. Wai T, Langer T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab*. 2016 Feb;27(2):105–17.
19. Marchi S, Bonora M, Patergnani S, Giorgi C, Pinton P. Methods to Assess Mitochondrial Morphology in Mammalian Cells Mounting Autophagic or Mitophagic Responses. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 2017 [cited 2019 May 27]. p. 171–86. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687916303536>
20. Seo B, Yoon S, Do J. Mitochondrial Dynamics in Stem Cells and Differentiation. *Int J Mol Sci*. 2018 Dec 5;19(12):3893.
21. Lonergan T, Bavister B, Brenner C. Mitochondria in stem cells. *Mitochondrion*. 2007 Sep;7(5):289–96.
22. Zhang H, Menzies KJ, Auwerx J. The role of mitochondria in stem cell fate and aging. *Development*. 2018 May 1;145(8):dev143420.
23. Zhang R, Niu G, Li X, Guo L, Zhang H, Yang R, et al. Reaction-free and MMP-independent fluorescent probes for long-term mitochondria visualization and tracking. *Chem Sci*. 2019;10(7):1994–2000.
24. Marín-García J. Methods to Study Mitochondrial Structure and Function. In: *Mitochondria and Their Role in Cardiovascular Disease* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2013 [cited 2019 May 27]. p. 13–27. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-4599-9\\_2](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-4599-9_2)
25. Fuhrmann DC, Brüne B. Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia. *Redox Biol*. 2017 Aug;12:208–15.
26. Wolin MS. Novel Role for the Regulation of Mitochondrial Fission by Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  in the Control of Smooth Muscle Remodeling and Progression of Pulmonary Hypertension. *Circ Res*. 2012 May 25;110(11):1395–7.
27. Wang J, Li H, Yao Y, Zhao T, Chen Y, Shen Y, et al. Stem cell-derived mitochondria transplantation: a novel strategy and the challenges for the treatment of tissue injury. *Stem Cell Res Ther*. 2018 Dec;9(1):106.

## **9. ŽIVOTOPIS**

Rođen sam 1994.godine u Vinkovcima. U Vinkovcima sam završio osnovnu školu i Gimanziju Matije Antuna Reljkovića. Medicinski Fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao sam 2013. godine. Tijekom svog fakultetskog obrazovanja sudjelovao sam u izvođenju nastave kao demonstrator na Katedri za anatomiju, Katerdi za internu medicinu i Katedri za kirurgiju. U rujnu 2018. bio sam na stručnoj praksi u Sveučilišnoj bolnici Hamburg-Eppendorf.