

Uloga živčanih matičnih stanica u regulaciji mitofagije nakon ishemijskog oštećenja stanica živčanog tkiva

Jagečić, Denis

Doctoral thesis / Disertacija

2024

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/urn:nbn:hr:105:963192>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-14**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Denis Jagečić

**Uloga živčanih matičnih stanica u
regulaciji mitofagije nakon ishemijskog
oštećenja stanica živčanog tkiva**

DISERTACIJA



Zagreb, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Denis Jagečić

**Uloga živčanih matičnih stanica u
regulaciji mitofagije nakon ishemijskog
oštećenja stanica živčanog tkiva**

DISERTACIJA

Zagreb, 2024.

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.

Zahvaljujem se mentoru Dinku Mitrečiću na pruženoj prilici te iskazanoj pomoći i razumijevanju tijekom izrade ove disertacije.

Od srca se zahvaljujem svim kolegama Zavoda za histologiju i embriologiju i Hrvatskog instituta za istraživanje mozga na stručnim komentarima i znanstvenim raspravama. Posebno hvala svim članovima sobe 118 koji su uvelike uljepšali ovaj izazovni period te pružali bezuvjetnu podršku.

Najveće hvala mojoj obitelji i Pauli koji stoje iza svih mojih životnih uspjeha i neuspjeha. Vaša ljubav, bezrezervna podrška i veliko strpljenje u slušanju svih mojih znanstvenih tužaljki bili su najveći izvor snage potrebne za izradu ove disertacije!

Sadržaj

1. Uvod i svrha rada.....	1
1.1. Autofagija.....	1
1.2. Mitohondrij	3
1.3. Mitofagija.....	4
.....	6
1.4. Autofagija i stanična smrt	6
1.5. Živčani sustav.....	7
1.5.1. Razvoj živčanog sustava	7
1.5.2. Uloga mitohondrija u razvoju SŽS-a.....	9
1.6. Perinatalna hipoksijsko–ishemijska encefalopatija (HIE)	10
1.7. Terapijski učinak matičnih stanica	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 na životinjama	16
4.1.1. Parenje životinja i određivanje starosti zametaka.....	16
4.1.2. Žrtvovanje životinja i izolacija zametaka.....	16
4.2. Postupci na 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	18
4.2.4. Nasađivanje stanica za ispitivanje diferencijacije	19
4.3. Model deprivacije kisika i glukoze (model OGD) te reoksigenacije u oštećenju nezrelih stanica živčanog sustava	20
4.4. Izolacija egzosoma iz staničnog medija.....	20
4.4.1. Kvantifikacija i vizualizacija izoliranih egzosoma.....	21
4.5. Izolacija proteina iz stanica	22
4.6. Priprema stanica za metodu imunocitokemije.....	22
4.7. Izolacija RNA iz stanica	22
4.8. Analiza proteinskog izražaja metodom Western blot.....	23
4.9. Analiza proteinskog izražaja metodom imunocitokemije.....	24

4.10. Analiza izražaja mRNA	25
4.11. Određivanje intenziteta stanične smrti mjerenjem oslobođene laktat dehidrogenaze	26
4.12. Analiza strukture i metabolizma mitohondrija	27
4.12.1. Morfološke promjene mitohondrija	27
4.12.2. Detekcija mitohondrijskih slobodnih kisikovih radikala	27
4.12.3. Kvantifikacija membranskog potencijala mitohondrija	27
4.13. Kolokalizacija između LC3/GFP i Lysotracker-a	28
4.14. Statistička obrada rezultata.....	28
5. Rezultati doktorske disertacije	29
5.1. Primijenjen protokol dovodi do izolacije homogene populacije živčanih matičnih stanica	29
5.2. Primijenjen protokol diferencijacije živčanih matičnih stanica dovodi do nastanka većeg broja astrocita i manjeg broja neurona	30
5.3. Akutni nedostatak kisika i glukoze rezultira povećanim brojem odumrlih stanica te utječe na diferencijaciju	31
5.4 Analiza morfologije i metabolizma mitohondrija	36
5.4.1. Proces stanične diferencijacije praćen je porastom broja i kompleksnosti mitohondrija	36
5.4.2. Akutni manjak kisika i glukoze narušava kompaktnost mitohondrija.....	37
5.4.3. Proces stanične diferencijacije i akutni manjak kisika i glukoze uzrokuje promjene fuzijsko/fizijskih ciklusa mitohondrija	38
5.4.4. Oštećenje akutnim manjkom kisika i glukoze dovodi do metaboličkih promjena mitohondrija	41
5.5. Analiza aktivnosti mitofagije	44
5.5.1. Analiza aktivnosti od ubikvitina ovisne mitofagije stanica zahvaćenih akutnim manjkom kisika i glukoze.....	44
5.5.2. Akutni manjak kisika i glukoze potiče receptorima posredovanu mitofagiju sedmog dana diferencijacije stanica živčanog sustava.....	46
5.6. Akutni manjak kisika i glukoze povećava aktivnost autofagije nezrelih stanica živčanog sustava	47
5.7. Kvantifikacija i vizualizacija izoliranih egzosoma.....	51
5.8. Utjecaj živčanih matičnih stanica i egzosoma na ishemijsko reperfuzijsku ozljedu stanica živčanog sustava u diferencijaciji.....	52
5.8.1. Tretman egzosomima smanjuje citotoksičnost stanica izloženih ishemijsko reperfuzijskoj ozljedi petnaestog dana diferencijacije.....	53
5.8.2 Egzosomi uzrokuju smanjenje razine superoksidnih aniona u I/R-om oštećenih stanica drugog dana diferencijacije	54
5.9. Analiza mitofagije	56

5.9.1. Analiza od ubikvitina ovisne mitofagije na stanice oštećene ishemijsko reperfuzijskom ozljedom nakon tretmana živčanim matičnim stanicama i egzosomima	56
5.9.2. Tretman živčanim matičnim stanicama povećava receptorima posredovanu mitofagiju u stanicama oštećenim ishemijsko reperfuzijskom ozljedom osmog dana diferencijacije	58
5.10. Tretman živčanim matičnim stanicama i egzosomima djelomično utječe na aktivnost autofagije u stanicama oštećenima ishemijsko reperfuzijskom ozljedom	59
6. Rasprava	63
6.1. Primjena <i>in vitro</i> modela postupne diferencijacije živčanih matičnih u istraživanju zbivanja tijekom razvoja živčanog sustava	63
6.2. Utjecaj akutnog oštećenja izazvanog manjkom kisika i glukoze na diferencijaciju stanica	64
6.3. Utjecaj stanične diferencijacije i akutnog nedostatka kisika i glukoze na strukturne promjene mitohondrija	65
6.4. Ispitivanje utjecaja akutnog manjka kisika i glukoze na autofagiju i mitofagiju nezrelih stanica živčanog sustava	67
6.5. Učinak živčanih matičnih stanica i egzosoma na ishemijsko reperfuzijsku ozljedu stanica središnjeg živčanog sustava	70
7. Zaključci	73
8. Sažetak	74
9. Summary	75
10. Literatura	76
11. Životopis	90

POPIS OZNAKA I KRATICA

CMA- autofagija posredovana molekulskim pratiteljem (engl. *Chaperon mediated autophagy*)

HSC 70- protein srodan toplinskom šoku (engl. *Heat shock cognate*)

LAMP2- lizosom povezani membranski protein tipa 2 (engl. *Lysosome-associated membrane protein type 2*)

ULK1- Unc-51 slična kinaza (engl. *Unc-51- like kinase*)

ATG- geni povezani s autofagijom (engl. *Autophagy related genes*)

PI3-k- Fosfoinozimid 3-kinaza (engl. *Phosphoinositide 3-kinase*)

PI- Fosfatidilinozitol (engl. *Phosphatidylinositol*)

PI3P- Fosfatidilinozitol 3-fosfat (engl. *Phosphatidylinositol 3-phosphate*)

MAP1LC3- laki lanac proteina 1 povezanog s mikrotubulima (engl. *Microtubule- associated protein 1 light chain*)

GABARAP- protein povezan s GABA receptorom tipa A (engl. *GABA type A receptor-associated protein*)

SNARE- topivi N-etilmaleimid-osjetljivi proteinski receptor za vezanje faktora (engl. *Soluble N-ethylmaleimide- sensitive factor attachment protein receptor*)

VDAC- anionski kanali ovisni o naponu (engl. *Voltage-dependent anion channels*)

SŽS- središnji živčani sustav

ROS- reaktivni kisikovi radikali (engl. *Reactive oxygen species*)

ALS- amiotrofična lateralna skleroza (engl. *Amyotrophic lateral sclerosis*)

PINK1- PTEN inducirajuća kinaza 1 (engl. *PTEN-induced kinase 1*)

LIR- domena za interakciju s LC3 (engl. *LC3 interacting domain*)

NCDD- Odbor za nomenklaturu o staničnoj smrti (engl. *Nomenclature Committee on Cell Death*)

ACD- autofagijska stanična smrt (engl. *Autophagyc cell death*)

BDNF- moždani neurotrofni faktor (engl. *Brain-derived neurotrophic factor*)

BMP- koštani morfogogenetski protein (engl. *Bone morphogenetic protein*)

MFN- mitofuzin

OPA1- protein optičke atrofije 1 (engl. *Optic atrophy-1 protein*)

DRP1- protein povezan s dinaminom 1 (engl. *Dynamin related protein1*)

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

NOS- sintaza dušikova oksida (engl. *Nitric oxide synthase*)

AIF- čimbenik indukcije apoptoze (engl. *Apoptosis inducing factor*)

DHA- dokozaheksenoična kiselina (engl. *Docosahexaenoic acid*)

iPSC- inducirane pluripotentne matične stanice (engl. *induced Pluripotent Stem Cells*)

HMS- hematopoetske matične stanice

MMS- mezenhimske matične stanice

EGF- epidermalni faktor rasta (engl. *Epidermal growth factor*)

bFGF- osnovni faktor rasta fibroblasta (engl. *basic Fibroblast growth factor*)

DMSO- dimetil-sulfoksid (engl. *Dimethyl-sulphoxide*)

PDL- poli-D-lizin (engl. *Poly-D-Lysine*)

FBS- fetalni goveđi serum (engl. *Fetal bovine serum*)

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

PFA- paraformaldehid (engl. *Paraformaldehyde*)

cDNA- komplementarna DNA (engl. *Complementary DNA*)

RT-PCR- Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *Real-time polymerase chain reaction*)

TOMM20- translokaza vanjske membrane mitohondrija (engl. *Translocase of the outer mitochondrial membrane*)

GFP- zeleni fluorescentni protein (engl. *Green fluorescent protein*)

SOX2- biljeg živčanih matičnih stanica (engl. *SRY-box transcription factor 2*)

GFAP- biljeg astrocita (engl. *Glial fibrillary acidic protein*)

MAP2- biljeg neurona (engl. *Microtubule-associated protein 2*)

LDH- laktat dehidrogenaza (engl. *Lactate dehydrogenase*)

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

1. Uvod i svrha rada

Održavanje homeostaze uključuje niz složenih staničnih procesa potrebnih kako bi se održala stabilnost i ravnoteža nužna za normalno funkcioniranje organizma (1). Ovo uključuje i mehanizme kojima se uklanjaju štetni produkti staničnog metabolizma. U eukariotskim stanicama postoje dva mehanizma uklanjanja oštećenih staničnih proteina. Prvi mehanizam degradacije se bazira na ubikvitin-proteasomalnom djelovanju, dok se drugi temelji na reakciji posredovanoj lizosomima (2). Jedan od temeljnih, a još uvijek ne posve dobro istraženih mehanizama, jest proces u kojem stanice odstranjuju vlastite sastavnice koje imaju potencijal nanijeti im štetu. Budući da se radi o svojevrsnoj samo-razgradnji vlastitih organela, to se zbivanje naziva autofagija (3). Ovo istraživanje nije posvećeno svim klasičnim putevima autofagije, već se istraživao specifičan oblik autofagije koji sudjeluje u održavanju funkcionalnosti mitohondrija. Taj se oblik autofagije naziva mitofagija (4). Obzirom da hipoksijsko-ishemijsko oštećenje prvenstveno uzrokuje disfunkciju mitohondrija te s obzirom na činjenicu kako uloga mitofagije u uklanjanju prekomjerno oštećenih mitohondrija i dalje nije u potpunosti razjašnjena, osnovni cilj ovog rada je bio opisati autofagiju i mitofagiju u nezrelim stanicama živčanog sustava oštećenih ishemijskom ozlijedom (4–6).

1.1. Autofagija

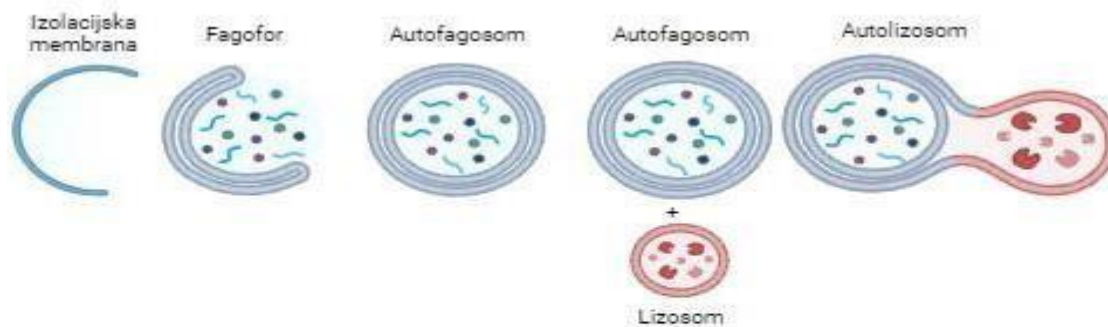
Autofagija predstavlja visoko regulirani proces kojim se uklanjaju potencijalno štetni elementi unutar stanice te održava homeostaza (3, 7). S obzirom na mehanizam djelovanja, razlikujemo tri tipa autofagije: mikroautofagiju, autofagiju posredovanu molekulskim pratiteljem (šaperonima) te makroautofagiju (8, 9).

Mikroautofagijom oštećeni citoplazmatski organeli ili proteini direktno ulaze u lizosome gdje se zatim razgrađuju (8).

Autofagija posredovana šaperonima (CMA od *chaperon mediated autophagy*) je vrsta autofagije specifična isključivo za oštećene proteine koji posjeduju pentapeptidni KFERQ niz. Takav niz prepoznaje specifičan pratitelj HSC 70 koji prenosi protein do vanjske membrane lizosoma gdje se interakcijom s LAMP2-a receptorom premješta i degradira (9).

Makroautofagija, često poznata i samo kao autofagija, naziv je za lizosomalnu degradaciju staničnih sastavnica s ciljem osiguravanja nutrijenata i energije nužnih za preživljenje stanice (10). Središnju ulogu u inicijaciji autofagije ima kompleks ULK sastavljen od proteina ULK1

(ATG1 kvasaca), ATG13, ATG101 i FIP200 (ATG17 kvasaca) proteina (10, 11). Početni korak karakteriziran je povećanom aktivnošću ATG13 i ATG17 koji u suradnji s ULK1 formiraju izolacijsku membranu – fagofor (8). Elongacija i nukleacija je proces nastanka autofagosoma, a počinje kada ULK1 fosforilira i aktivira PI3-k kompleks koji uključuje BECLIN1, AMBRA, VPS34 i ATG14L. PI3-k kompleks se nakuplja na fagoforu gdje se fosforiliranjem PI-a proizvodi PI3P (12). PI3P potiče aktivnost proteinske obitelji WIPI koja na fagofor navodi ubikvitin ovisne konjugacijske sustave i proteine važne u njegovoj elongaciji. Prvi konjugacijski sustav čini kompleks ATG12-ATG5-ATG16L1 (11). WIPI vezanjem na ATG16L1 stimulira ATG3 posredovanu konjugaciju ATG8 ključnog za maturaciju autofagosoma (13). Proteini ATG8 dijele se na 2 velike skupine; proteini MAP1LC3 s važnom ulogom u elongaciji autofagosoma te proteini GABARAP ključni u završnom oblikovanju autofagosoma te njegovom spajanju s lizosomom (14). Djelovanjem proteaze ATG4, MAP1LC3 se proteolitički cijepa te se finalno posredovanjem ATG7, ATG3 i ATG12 konjugira na fosfatidiletinolamin membrane autofagosoma i konvertira u LC3-II (11, 13, 15). Ugrađeni LC3-II koristi se kao pouzdan biljeg procjene razine autofagosoma (8). Završni korak autofagije ovisi o fuziji autofagosoma s lizosomom pri čemu nastaje autolizosom u kojem se u konačnici odvija razgradnja organela ili oštećenih proteina te recikliraju njihove sastavnice. Nastanak autolizosoma posredovan je proteinom SNARE (**Slika 1**) (12). Iako autofagija predstavlja iznimno važan mehanizam staničnog preživljenja, njena prekomjerna aktivnost dovodi do autofagijske stanične smrti. Sukladno tome, u literaturi su dostupne oprečne tvrdnje o ulozi autofagije na stanice SŽS-a zahvaćenim ishemijskim oštećenjem (16–18).



Created in **BioRender.com** 

Slika 1. Pojednostavljeni prikaz procesa autofagije. Proces se sastoji od inicijacije koju karakterizira formiranje izolacijske membrane, elongacije i nukleacije fagofora čime nastaje autofagosom. Autofagija završava sazrijevanjem autofagosoma te njegovim spajanjem sa lizosomom gdje se u konačnici odvija degradacija staničnih sastavnica. Slika izrađena u programu BioRender.com.

1.2. Mitohondrij

Mitohondrij je glavni organel eukariotskih stanica za proizvodnju energije u obliku ATP-a (engl. *Adenosine triphosphate*), sintezu fosfolipida i hema te održavanje homeostaze kalcija (19). Formirao se prije gotovo dvije milijarde godina uspostavom endosimbiotskog odnosa između α -proteobakterije i ancestralne eukariotske stanice, a iako je zadržao svoj osnovni oblik, evolucijski se mijenjao, poprimao dodatne funkcije i postajao sve važniji za stanicu (20). Sadrži vlastitu DNA koja posjeduje upute za proizvodnju 13 proteina uglavom prisutnih u unutarnjoj membrani mitohondrija (20). Građen je od vanjske i unutarnje membrane čiji se lipidni sastav, razina propusnosti, kao i oblik međusobno razlikuju, a zajedno odvajaju matriks mitohondrija od međumembranskog prostora (21). Dok vanjska membrana sadrži anionske kanale ovisne o naponu (VDAC) koji posreduju u prijenosu iona i manjih molekula, unutarnja membrana propusna je isključivo za vodu, kisik i ugljikov dioksid. Razlika u propusnosti membrana omogućuje uspostavu elektrokemijskog gradijenta važnog u sintezi ATP-a. Unutarnju membranu karakterizira veća količina proteina te prisutnost krista (lat. *cristae*) koje nastaju invaginacijom u matriks mitohondrija (21). Upravo se na kristama odvija proces oksidativne fosforilacije ključan u proizvodnji stanične energije (21). Stanica energiju uglavnom osigurava procesom glikolize u citosolu te Krebsovim ciklusom i oksidativnom fosforilacijom u mitohondrijima (22). Početno, anaerobnom glikolizom se jedna molekula

glukoze metabolizira u dvije molekule piruvata čime nastaju dvije molekule ATP-a. Nadalje, Krebsovim ciklusom se piruvat posredovanjem specifičnih nosača premješta u matriks mitohondrija gdje se u nizu reakcija dekarboksilira, oksidira i veže s koenzimom A čime nastaje acetil-CoA. Kao finalni produkt ciklusa, iz dvije molekule piruvata nastaje šest molekula NADH, dvije molekule FADH₂ i dvije molekule GTP-a. NADH i FADH u konačnici ulaze u proces oksidativne fosforilacije gdje se njihovi elektroni, putujući kroz elektronski transportni sustav koriste za izbacivanje protona iz matriksa u međumembranski prostor što stvara protonski gradijent (21). Djelovanjem ATP sintaze protoni se vraćaju u negativnije nabijeni matriks čime kataliziraju proizvodnju ATP (21). Dakle, energija potrebna za rad ATP sintaza ovisi o membranskom potencijalu mitohondrija (23). Iz jedne molekule glukoze nastaje 30 molekula ATP-a (21).

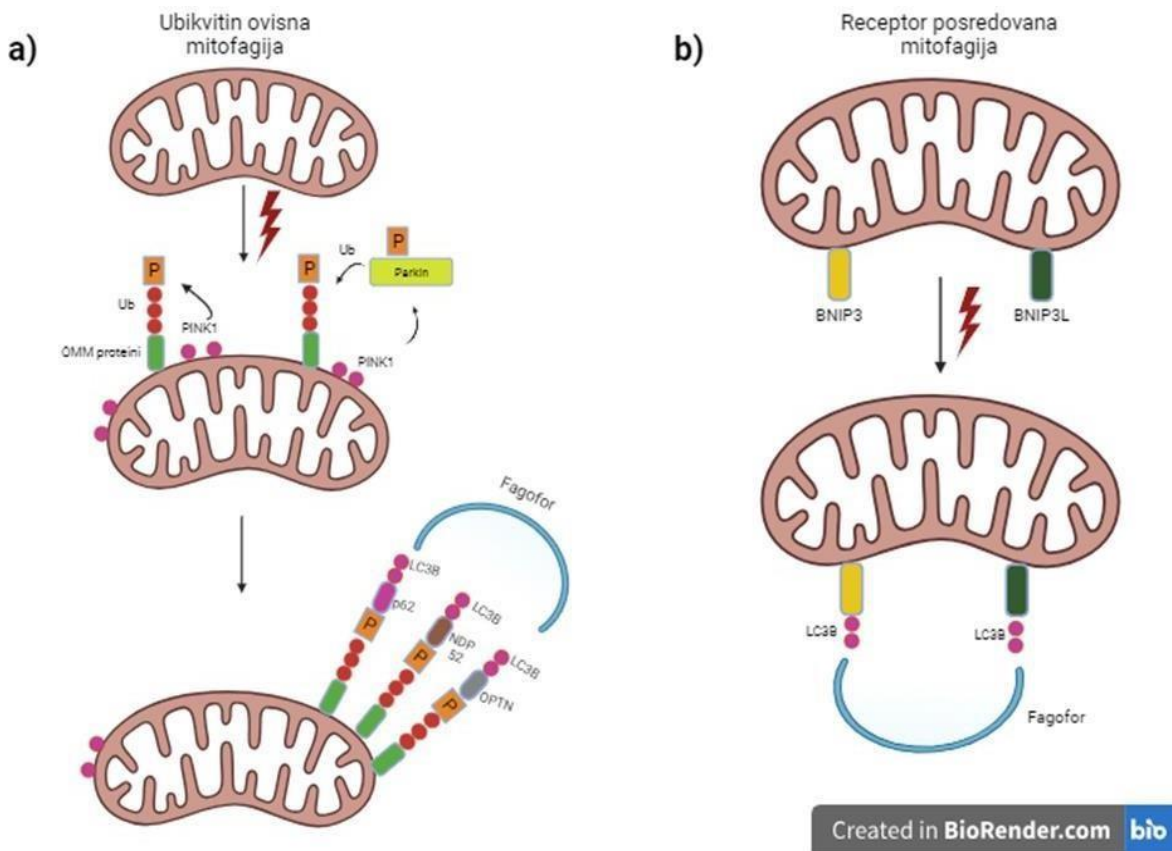
Razni fiziološki i patološki čimbenici poput embrionalnog razvoja, starenja, oštećenja DNA, oksidativnog stresa i drugih čimbenika dovode do apoptotičke stanične smrti. Iako vanjski put aktivacije započinje vezanjem na receptor smrti i neovisan je o mitohondrijima, unutarnjim putem aktivacije oni utječu na stanično preživljenje (21). Poremećaji koji narušavaju bioenergetiku stanice poput ishemijsko-reperfuzijske ozlijede uzrokuju depolarizaciju i permeabilizaciju vanjske membrane mitohondrija što rezultira izlaskom proapoptotičkih čimbenika među kojima je najvažniji citokrom c (21, 24). Citokrom c zatim aktivira Apaf 1 (engl. *Apoptotic protease activating factor-1*) i pro-kaspazu 9 koja finalno aktivira efektorsku kaspazu 3. Iako bioenergetski poremećaji uzrokuju apoptozu, oni često aktiviraju i autofagiju specifičnu za mitohondrije (21).

1.3. Mitofagija

Iako se autofagija dugo smatrala generalnim, relativno nespecifičnim staničnim procesom, aktivacijom specifičnih staničnih receptora pojedinih organela postiže se njena selektivnost. Prema selektivnosti djelovanja razlikujemo oblik autofagije koji specifično uklanja mikroorganizme (ksenofagija), proteinske agregate (agrefagija) te stanične organele (lizofagija, ER-fagija, ribofagija te mitofagija) (3, 25, 26).

Mitofagija je poseban oblik autofagije koju s obzirom na aktivnost možemo podijeliti u programiranu te induciranu. Programiranom se mitofagijom uklanjaju zdravi mitohondriji tijekom razvoja i diferencijacije pojedinih staničnih tipova. Najpoznatiji primjeri su opisani kod razvoja očne leće, eritrocita i sazrijevanja spermija (2). Inducirana mitofagija je aktivirana tijekom staničnog stresa i oštećenja, a temelji se na uklanjanju oštećenih mitohondrija (5).

Važno je naglasiti kako mitohondrijska oštećenja te pogreške u procesu autofagije i mitofagije uzrokuju nekontrolirano stvaranje ROS-eva, oksidativni stres stanica i nakupljanje oštećenih proteina što u konačnici dovodi do razvoja i nastanka velikog broja srčanih i neurodegenerativnih poremećaja poput Parkinsonove, Alzheimerove i Huntingtonove bolesti te ALS-a (2, 7, 27). S obzirom na mehanizam djelovanja, mitofagiju još možemo podijeliti na ovisnu o ubikvitinu te receptorima posredovanu mitofagiju (28). Od ubikvitina ovisna mitofagija ovisi o aktivnosti PINK1 i Parkina (E3 ligaza- transferira ubikvitin na proteinski substrat na vanjskoj membrani mitohondrija). U uvjetima mitohondrijskog stresa gdje je vidljivo smanjenje membranskog mitohondrijskog potencijala dolazi do nakupljanja, dimerizacije i autofosforilacije PINK1. PINK1 zatim potiče mitofagiju fosforiliranjem Parkina i ubikvitina. Važno je napomenuti kako PINK1 nije dovoljan za uspješan mitofagijski proces te je potreban i amplifikacijski signal Parkina. Fosfoubikvitin ima visoki afinitet za Parkin gdje potiče aktivnost i sintetizira poliubikvitinske lance koji se vežu na određene proteine mitohondrija (4, 28). Specifični receptori nužni za pokretanje mitofagije uglavnom su proteini vanjske membrane mitohondrija (*Mitochondrial outer membrane*- MOM proteini), a među najvažnije se ubrajaju BNIP3/BNIP3L te FUNDC1. Spomenuti receptori posjeduju domenu LIR kojom se vežu na LC3 dio autofagosoma i tako potiču mitofagiju (**Slika 2**) (25, 28).



Slika 2. Prikaz od ubikvitina ovisne mitofagije i receptorima posredovane mitofagije. Mitohondrijskim oštećenjem dolazi do nakupljanja PINK1 proteina na vanjskoj membrani mitohondrija koji primarno fosforilira Parkin. Fosforilirani Parkin ubikvitinira proteine vanjske membrane mitohondrija (OMM) koji se zatim ponovno djelovanjem PINK-a fosforiliraju i interakcijom sa LC3B vežu na rani autofagosom (a). Receptorima posredovana mitofagija temelji se na izravnoj interakciji proteina vanjske membrane mitohondrija koji posjeduju domenu LIR (engl. *LC3 interacting region*) i proteina LC3B autofagosoma u razvoju (b). Preuzeto i prilagođeno prema (4). Slika izrađena u programu BioRender.com.

1.4. Autofagija i stanična smrt

Stanična smrt naziv je za biološki proces uklanjanja oštećenih ili prekomjernih stanica. Ravnoteža između stanične proliferacije i smrti nužna je u održavanju homeostaze i integriteta organizma (29). Odbor koji predlaže nazivlje različitih oblika stanične smrti (NCDD od engl. *Nomenclature Committee on Cell Death*) je prema načinu djelovanja tipove stanične smrti odvojio na reguliranu i slučajnu (30, 31). Regulirana stanična smrt pojam je koji opisuje tip smrti s točno definiranim molekularnim mehanizmima i aktivacijskim putevima. Suprotno tome, slučajna stanična smrt karakterizirana je iznenadnim, trenutnim uklanjanjem stanice nastalim djelovanjem raznih fizikalnih, kemijskih ili mehaničkih oštećenja (30, 31). Morfološki, najviše istraživani tipovi regulirane stanične smrti su: stanična smrt tipa 1

(apoptoza), tipa 2 (autofagija) te tipa 3 (nekroza) (31). Autofagijska stanična smrt (ACD od engl. *Autophagic cell death*) je opisana kao proces staničnog umiranja nastalog kao posljedica prekomjerne i produžene aktivnosti autofagije. S obzirom na to da su takve okolnosti prisutne u teškim staničnim oštećenjima razlikujemo: a) autofagijom povezanu staničnu smrt gdje je aktivnost autofagije povezana s aktivnošću apoptoze, b) autofagijom posredovanu staničnu smrt gdje aktivnost autofagije stimulira apoptozu, te c) autofagijom ovisnu staničnu smrt koja se opisuje isključivo u situacijama kada se genetskim manipulacijama i kemijskim inhibitorima glavnih autofagijskih proteina (Vps 34, BECLIN1 ATG5 i 12) ona može zaustaviti (32, 33).

1.5. Živčani sustav

1.5.1. Razvoj živčanog sustava

Embrionalni razvoj započinje formiranjem zigote (34). Brojni kontrolni mehanizmi te okolišni signali proliferacije, morfogeneze i diferencijacije usmjeravaju i osiguravaju pravilnu organizaciju i razvoj organizma (35). Zigota se opisuje kao totipotentna stanica nastala spajanjem haploidne jajne stanice i spermija (34). Isključivo totipotentne matične stanice posjeduju neograničenu sposobnost diferenciranja, posljedično tvoreći cijeli organizam (36). Zigota, uzastopnim staničnim diobama tvori blastocistu koja prijanjanjem za endometrij maternice osigurava embrionalnu implantaciju (34). Strukturno, blastocista se sastoji od vanjskog trofoblasta, zaduženog za stvaranje ekstraembrionalnih tkiva te unutarnje stanične mase, embrioblasta koji diferencijacijom embrionalnih matičnih stanica tvori hipoblast i epiblast (35). Embrioblast je građen od pluripotentnih matičnih stanica s potencijalom diferencijacije u sve adultne stanične tipove (37, 38).

Prvih šest tjedana embrionalnog razvoja karakteriziraju tri iznimno važna procesa u razvoju SŽS-a; gastrulacija, neurulacija te ventralna indukcija (odvajanje moždanih hemisfera, formiranje olfaktornih bulbosa i strukture lica) (39). Oko 9. dana embrionalnog razvoja, po završetku implantacije, epiblast formira tri zametna listića; endoderm, ektoderm i mezoderm, čime završava prvi ključni proces embrionalnog razvoja – gastrulacija (35). Nadalje, iz svakog zametnog listića, specifično, započinje proces organogeneze (35). Ektoderm je ključan u razvoju središnjeg živčanog sustava koji počinje oko 18. dana embrionalnog razvoja, formiranjem neuralnog žlijeba (35, 40). Zadebljanjem rostralnog djela ektoderma nastaje neuralna ploča (40). Lateralni krajevi neuralne ploče formiraju neuralne nabore između kojih je neuralni žlijeb. Oko 20. dana razvoja, spajanjem neuralnih nabora nastaje neuralna cijev (39–41). Zatvaranjem neuralne cijevi počinje razvoj primarnih moždanih struktura; prednji

(*prosencephalon*), srednji (*mesencephalon*) i stražnji (*rhombencephalon*) mozak (39–41). Iz cefaličnog djela *prosencephalona* nastaje *telencephalon* (prekursor moždanih hemisfera), a iz kaudalnog djela *diencephalon* i talamičke strukture. Iz *mesencephalona* se razvija srednji mozak s akveduktom, dok se *rhombencephalon* dijeli na *metencephalon* koji tvori mali mozak te pons i *myelencephalon* koji razvija produženu moždinu (39). Neuralna cijev građena je od jednog sloja epitelnih stanica (neuroepitela) (40–42). Naglo povećanje broja neuroepitelnih stanica omogućuje širenje i razvoj neuralne cijevi (39, 41). Neuroepitelne stanice, poznate kao i živčane matične stanice (ŽMS) ključne su u razvoju SŽS-a. Opisuju se kao multipotentne matične stanice sa sposobnošću diferencijacije u neurone i stanice glije (astrocite i oligodendrocite) (43, 44). Iako je neurogeneza u odraslih vrlo ograničena te se broj ŽMS-a smanjuje, one su i dalje prisutne u subventrikularnoj zoni lateralnih ventrikula kao i subgranularnoj zoni dentatnog girusa hipokampusa sudjelujući u održavanju homeostaze SŽS-a (43).

Neuroni su temeljne strukturne i funkcionalne jedinice SŽS-a. Metabolički su iznimno aktivni te energiju proizvode procesom oksidativne fosforilacije (45). Njihova glavna zadaća je primanje, obrađivanje i slanje živčanih impulsa. Prijenos živčanih signala omogućen je uspostavom sinapsi između presinaptičkog aksonalnog završetka jednog te postsinaptičkog aksonalnog završetka drugog neurona (46). Neuroni lokalnih neuronalnih mreža imaju kratke aksone te služe samo kao posrednici u signalnom prijenosu dok se neuroni čiji aksoni prenose signale do udaljenijih moždanih struktura nazivaju projekcijski neuroni (46). Stanice glije ovisno o vrsti imaju različite uloge u normalnom funkcioniranju SŽS-a. Astrociti, najbrojnije stanice živčanog sustava služe kao potpora neuronima koje okružuju. Kontroliraju stvaranje sinapsi te reguliraju neurogenezu u odrasloj dobi kao i tonus krvnih žila mozga. Metabolički nisu zahtjevni te energiju osiguravaju procesom glikolize (45, 47, 48). Suprotno astrocitima, oligodendrociti i mikroglia posjeduju specifične uloge, pa tako oligodendrociti mijeliniziraju aksone, dok mikroglia kao dio monocitno-makrofagnog sustava predstavlja glavne imunosne stanice SŽS-a (47, 49).

Neurogeneza i gliogeneza su procesi kojima se iz ŽMS-a, proliferacijom i diferencijacijom razvijaju neuroni i stanice glije (39). Diferencijacijom neuroepitelnih stanica nastaju stanice radialne glije koje reguliraju razinu progenitorskih stanica. Simetričnom diobom nastaju dvije identične stanice čime se povećava njihova brojnost, dok se asimetričnom diobom stvaraju po jedna progenitorska i stanica nove radialne glije (50, 51). Postupnom diferencijacijom iz ŽMS-a, nezreli neuroni prolaze kroz procese strukturnog i metaboličkog reprogramiranja (52, 53).

Strukturno reprogramiranje stanice započinje reorganizacijom mikrotubula i razvojem aktinskih vlakana čime se utječe na oblik (formiranje dendrita i aksona) kao i na njena proliferativna i migracijska svojstva (39, 53). Metaboličke promjene karakterizira prijelaz s procesa glikoze prisutne u progenitorskim stanicama na proces oksidativne fosforilacije, praćene pojačanom lipogenezom (54, 55). Zreli neuroni, izlučivanjem specifičnih faktora poput BDNF-a, neurotrofina 3 i BMP-a dodatno stimuliraju neurogenezu (56). Kako bi se spriječile abnormalnosti razvoja mozga, ravnoteža između proliferacije i diferencijacije je strogo regulirana i kontrolirana procesom apoptoze (39).

1.5.2. Uloga mitohondrija u razvoju SŽS-a

Mitohondriji su glavne organele eukariotskih stanica u proizvodnji ATP-a ključnog za metabolizam i opstanak stanice. Obavijeni su dvostrukom membranom, sadrže vlastitu DNA (mitohondrijsku DNA) te su ovisno o vrsti stanice, veličine između 0,5 i 3 μm (57, 58). Osim proizvodnje ATP-a, mitohondriji imaju važnu ulogu u staničnoj signalizaciji, regulaciji metabolizma kalcija, staničnoj proliferaciji, diferencijaciji te cjelokupnoj staničnoj homeostazi (59–61).

Oblik, veličina te aktivnost mitohondrija ovisi o staničnom tipu, stupnju stanične diferenciranosti i metaboličke aktivnosti (58, 62). Poznato je kako nediferencirane stanice poput ŽMS-a posjeduju sferične mitohondrije s malim brojem krista zbog čega se energija uglavnom osigurava procesom aerobne glikolize (63, 64). Diferencijacijski proces u zrele neurone praćen je porastom broja kopija mitohondrijske DNA, povećanom biogenezom i izražajem mitohondrijskih gena ključnih u procesu oksidativne fosforilacije te istovremenim utišavanjem gena za sintezu glikolitičkih proteina te enzima heksokinaze i laktat dehidrogenaze (54, 55, 64). Iako u energetske smislu aerobna glikoliza nije pretjerano učinkovita, većom dinamikom reakcije osigurava se mala količina ATP-a, ali i veća dostupnost intermedijara potrebnih za sintezu nukleinskih i amino kiselina te lipida nužnih u održavanju proliferativnih svojstava matičnih stanica (65, 66). Dinamične promjene i razvoj mitohondrijske mreže omogućen je procesima fuzije i fisije kada se ovisno o njihovoj aktivnosti utječe na sudbinu stanice (63). Iako zrele stanice karakterizira razgranata mreža uglavnom tubularnih mitohondrija, fisija mitohondrija je ključna u poticanju diferencijacije stanica (67). Fuzija je proces kojim se aktivnošću MFN1 i 2 uz posredovanje proteina OPA1 stapaju unutarnje membrane mitohondrija (62). U diferenciranim stanicama, OPA1 oblikuje mitohondrijske kriste čime direktno utječe na uspostavu elektronskog transportnog sustava (63). Također,

tijekom staničnog stresa, fuzijom je omogućen proces brze izmjene mitohondrijske DNA i metabolita između zdravih i blago oštećenih mitohondrija (4, 62). Suprotno fuziji, fisija je proces kojim se pod utjecajem citosolnog DRP1 proteina cijepa mitohondrijska membrana tvoreći dva manja mitohondrija. Tako se osigurava dovoljan broj mitohondrija potreban za rast i dijeljenje stanice (62). U patološkim uvjetima poput HIE, fragmentacijom mitohondrija nastalom kao rezultat djelovanja fisije te posljedičnom mitofagijom uklanjaju se oštećeni mitohondriji čime se pokušava uspostaviti bioenergetska ravnoteža stanice (4, 6, 62).

Metabolizam neurona usko je povezan te ovisi o astrocitima. Glukoza je glavni energetska supstrat SŽS-a. U astrocitima se aerobnom glikolizom glukoza metabolizira do laktata koji se zatim u neuronima transformira u piruvat. Prijenosom piruvata u mitohondrije ponovno započinje Krebsov ciklus (68–71). Iznimno oksidativan metabolizam neurona doprinosi proizvodnji molekula ROS koje u kontroliranoj količini imaju važnu ulogu u staničnoj signalizaciji gdje utječu na diferencijaciju neurona, rast aksona te formiranje sinapsi (72). Prekomjerna indukcija molekula ROS premašuje antioksidativne sposobnosti stanice što rezultira oštećenjima staničnih lipida, proteina, nukleinskih kiselina, pa i staničnom smrću (72, 73).

1.6. Perinatalna hipoksijsko–ishemijska encefalopatija (HIE)

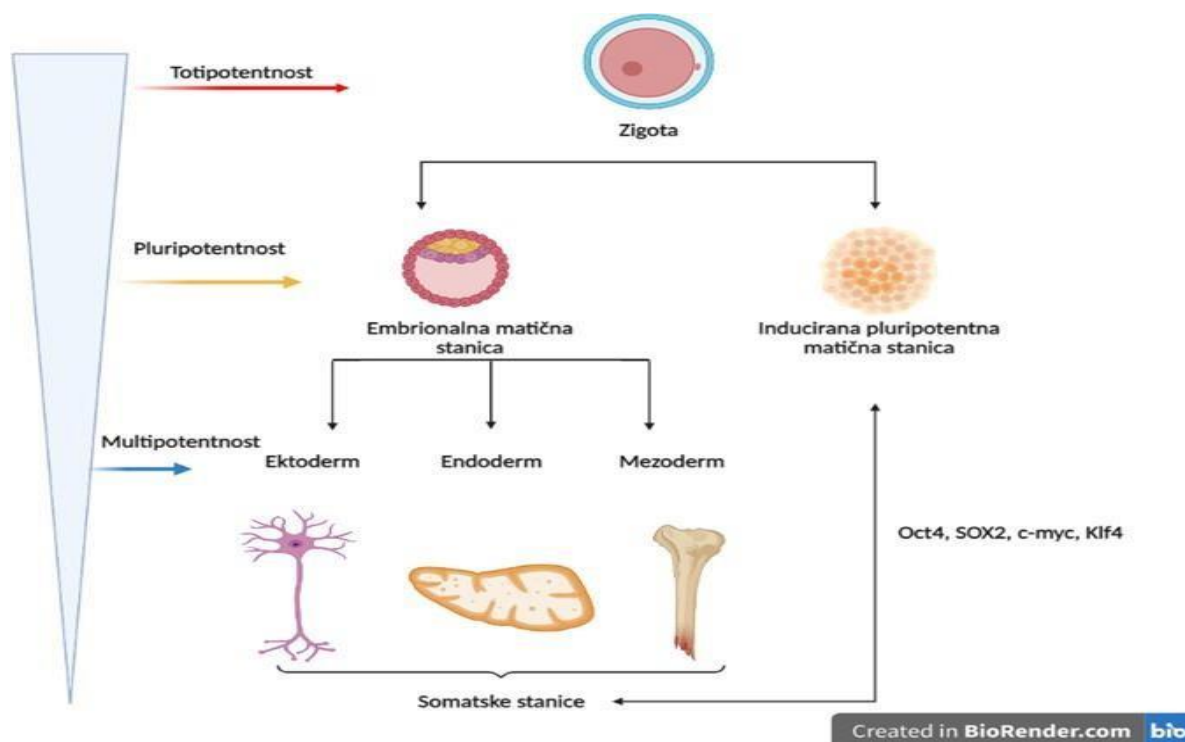
HIE je naziv patološkog stanja u kojem se mozgu iznenada prekida dovod kisika i krvi. Učestalost od 1,5 do 3 na 1000 novorođene djece, HIE se smatra jednom od najtežih komplikacija tijekom razvoja SŽS-a (74). Stupanj oštećenja kao i pojava cjeloživotnih komplikacija ovisi o duljini trajanja ozljede, gestacijskom periodu te učinkovitosti terapijskog postupka. S obzirom na to da oko 60% zahvaćene novorođene djece do 2. godine života umire ili razvija teške neurološke poremećaje poput epilepsije, mentalne retardacije, cerebralne paralize i sljepoće, HIE predstavlja ogroman teret za pojedinca, zahvaćene obitelji te društvo u cijelosti (75–77). Složeni patofiziološki mehanizmi HIE otežavaju razvoj primjerenog terapijskog postupka. Smanjen protok krvi uzrokuje deprivaciju glukoze i kisika što dovodi do perioda primarnog i sekundarnog energetskeg deficita (75, 76). Uslijed nedostatka glukoze i kisika, primarni energetska poremećaj ponajviše zahvaća mitohondrije te je praćen periodom smanjene oksidativne fosforilacije i količine proizvedenog ATP-a (75–77). Istovremeno, dolazi do prelaska na anaerobnu glikolizu i postupnog nakupljanja laktata. Nedostatak energije, na koji su posebno osjetljivi neuroni uzrokuje poremećaj u radu ATP ovisnih Na/K pumpi što posljedično rezultira unutarstaničnim nakupljanjem natrija, kalcija i vode, depolarizacijom

membrane, povećanom proizvodnjom ekscitacijskih neurotransmitera, razvojem edema i nekrotičkom staničnom smrću (75, 76). Nadalje, glutamat kao glavna ekscitacijska molekula vezanjem na svoje receptore uzrokuje porast citosolnog kalcija koji dovodi do aktivacije NOS-a, fosfolipaza, proteaza i nukleaza čime se degradiraju sve stanične sastavnice (75–77). Oštećeni mitohondriji dodatno proizvode ROS-ove čime se još više oštećuje proteinski i lipidni sastav njene membrane što finalno dovodi do njene depolarizacije, povećane propusnosti, otpuštanja citokroma c i AIF-a te apoptotske smrti stanice (75–77). Sekundarni energetske deficit nastaje u periodu između 8 i 48 h nakon HIE te ga karakterizira prisutnost oksidativnog stresa, upale i dodatne ekscitotoksičnosti. Zbog smanjene razine antioksidativnih enzima i povećane koncentracije nesaturiranih masnih kiselina, mozak novorođenčadi posebno je osjetljiv na oksidativni stres (75, 76).

Terapijske metode liječenja HIE usmjerene su na inhibiciju otpuštanja glutamata i blokiranje njegovih receptora, protuupalno djelovanje te smanjenje energetske gubitka (75, 76). Najčešće korištena i jedina dosad dokazano učinkovita metoda liječenja je proces umjerene hipotermije čime se tijekom 48–72 h tjelesna temperatura održava između 33 °C i 36 °C. Glavni cilj hipotermije je smanjenje negativnih učinaka oksidativnog stresa, glutamata te smanjena potreba tijela za kisikom (75, 76). Manje istraživani terapijski pristupi liječenja HIE uključuju korištenje eritropoetina, hematopoetskih matičnih stanica, antiepileptika, ksenona, DHA te kanabinoidnih agonista (75).

1.7. Terapijski učinak matičnih stanica

Matične stanice naziv su za nezreli oblik stanica koji posjeduje mogućnost diferencijacije u zreli stanični tip (78). S obzirom na podrijetlo i prisutnost u organizmu, možemo ih podijeliti na embrionalne i adultne (79). Dok su embrionalne matične stanice prisutne isključivo tijekom embrionalnog razvoja, adultne matične stanice su stanice koje su u različitim količinama prisutne u određenim vrstama tkiva odraslih jedinki. Ograničenog su diferencijacijskog potencijala s mogućnošću sazrijevanja u točno određenu staničnu populaciju (38, 80). Diferencijacijski potencijal stanica objašnjava se kao svojstvo matičnih stanica kojim one postupno sazrijevaju u zreli, specifični stanični oblik (38). Metaboličke promjene, utjecaji faktora rasta, hormona, molekula izvanstaničnog matriksa, kao i djelovanje transkripcijskih faktora te određeni epigenetski mehanizmi kontroliraju specifične signalne puteve stanica nužne za diferencijaciju (66, 81, 82). Prema diferencijacijskom potencijalu, matične stanice se mogu podijeliti na totipotentne, pluripotentne te multipotentne (**Slika 3**) (37).



Slika 3. Različiti stupanj potentnosti među stanicama. Slika izrađena u programu BioRender.com.

Terapijski potencijal matičnih stanica ostvaruje se direktnom zamjenom oštećenih ili dotrajalih stanica te indirektno, proizvodnjom različitih blagotvornih, biološki aktivnih molekula i faktora, prvenstveno egzosoma koji utječu na stanični mikrookoliš (83). Međustanična komunikacija je ključna u održavanju homeostaze i pokretanju mehanizama popravka. Egzosomi koji izlaze iz stanica u obliku izvanstaničnih mjehurića predstavljaju iznimno važne komunikacijske molekule u staničnoj interakciji (84). Okruglaste su strukture, veličine 30-100 nm koje pohranjujući razne bioaktivne molekule (mRNA, miRNA, DNA, enzime, citokine) komuniciraju s okolnim stanicama te tako utječu na njihov metabolizam (84, 85).

Iako pluripotentne matične stanice prisutne u embrionalnom tkivu posjeduju najveći terapijski potencijal, njihova izolacija i primjena predmet je mnogih etičkih dvojbi i rasprava (86). Iznimno veliki napredak u korištenju pluripotentnih matičnih stanica u terapijske svrhe omogućen je razvojem iPSC stanica koje se genskim reprogramiranjem preoblikuju iz adultnih somatskih stanica (87). Metodu je 2006. godine razvio Yamanaka kada je koristeći kombinaciju četiri transkripcijska faktora (OCT4, SOX2, KLF4 te C-MYC) uspio reprogramirati fibroblaste u iPSC (88). Stvorene iPSC zadržavaju mogućnost pluripotentnosti, strukturno su vrlo slične embrionalnim stanicama, i predstavljaju revolucionaran model u istraživanju mnogih staničnih procesa, bolesti kao i mogućem razvoju terapijskih strategija

(89). Glavni nedostatak korištenja pluripotentnih matičnih stanica su njihova iznimno visoka proliferativna svojstva koja u određenim uvjetima mogu potaknuti proces tumorigeneze zbog čega se pri razvoju terapijskih pristupa preporučuje korištenje zrelijih oblika matičnih stanica (44).

Multipotentne matične stanice su zbog dostupnosti u adultnom tkivu, kao i lakoći izolacije i dalje predmet velikog broja istraživanja s potencijalnim terapijskim i kliničkim primjenama (79). U istraživanjima liječenja neuroloških poremećaja, dosadašnje studije su se uglavnom temeljile na učinku hematopoetskih (HMS), mezenhimskih (MMS) i živčanih (ŽMS) matičnih stanica. U razdoblju od 1999. do 2018. registrirana je 201 klinička studija ispitivanja utjecaja matičnih stanica na neurološke poremećaje, ali ih je samo 10 dospjelo do završnih faza (faze 2 i 3) (44). U istraživanjima prednjače MMS koje su uključene u čak 120 studija od kojih je 7 dospjelo do kliničkih ispitivanja. ŽMS su korištene u 27 registriranih kliničkih ispitivanja gdje se istraživao njihov učinak u liječenju moždanog udara (n=5), multiple skleroze, ozlijede leđne moždine, ALS-a, Parkinsonove bolesti te tumora mozga (44). Iako postoje brojni radovi o neuroprotektivnim i regenerativnim svojstvima ŽMS-a nakon ishemijske ozljede, oni su uglavnom usmjereni na pretklinička istraživanja, fazu 1 i 2 kliničkih ispitivanja te nisu odobrena u liječenju (44, 90–93). Istraživanja pokazuju kako tretman matičnim stanicama (MMS-ma i ŽMS-ma) rezultira smanjenjem zahvaćenog područja te neuroprotektivnim, protuupalnim i antiapoptotskim učincima nakon pojave encefalopatije (94–97).

2. Hipoteza

Dodane matične stanice reguliraju autofagiju i mitofagiju u stanicama u kojima je nastalo hipoksijsko oštećenje te tako povećavaju njihovo preživljenje.

3. Ciljevi rada

3.1. Opći cilj

Cilj ove disertacije je istražiti kako hipoksijsko oštećenje djeluje na autofagiju i mitofagiju tijekom diferencijacije živčanih matičnih stanica. Istovremeno je cilj istražiti povećavaju li egzogeno dodane matične stanice preživljenje hipoksijom oštećenih stanica te je li taj učinak posredovan regulacijom autofagije i mitofagije.

3.2. Specifični ciljevi

1. Kvantitativnim metodama usporediti biljege autofagije i mitofagije tijekom diferencijacije živčanih matičnih stanica u normoksičnim i hipoksičnim uvjetima.
2. Opisati morfološke promjene mitohondrija (posebno fuzijsko/fisijske cikluse) tijekom diferencijacije živčanih matičnih stanica u normoksičnim i hipoksičnim uvjetima.
3. Istražiti utjecaj dodanih živčanih matičnih stanica na intenzitet i obilježja autofagije i mitofagije u stanica koje su bile oštećene hipoksijom.

4. Materijali i metode

4.1. Postupci na životinjama

U svrhu izrade doktorske disertacije korišteni su mišji zameci stari 14.5 dana dobiveni iz skotnih ženki visokosrodne linije B6 Albino (B6N-Tyrc-Brd/BrdCrCrI). Životinje su uzgajane u kontroliranim uvjetima nastambe za laboratorijske životinje (HRPOK-006). S ciljem minimalizacije boli i patnje životinja, istraživanje se provodilo prateći direktivu 2010/63/EU, Zakon o zaštiti životinja RH (NN br. 102/2017), FELASA smjernice te smjernice i odredbe nadležnog Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Ur. broj: 380-59-10106-17-100/27) odobrilo je provedbu eksperimentalnih postupaka nad spomenutim životinjama.

4.1.1. Parenje životinja i određivanje starosti zametaka

S ciljem dobivanja zametaka, parenje se potaknulo grupiranjem triju ženki i jednog mužjaka u isti kavez. Prisutnost sjemene tekućine u obliku vaginalnog čepa rodnice sparenih ženki potvrdilo je njihovu skotnost. Kako bi dobili zametke točno određene starosti, ženke su žrtvovane 14. dana skotnosti.

4.1.2. Žrtvovanje životinja i izolacija zametaka

Skotne ženke su postupkom cervikalne dislokacije žrtvovane nakon 14.5 dana. Cervikalna dislokacija je tehnika koja dovodi do trenutne smrti, bez patnje za jedinku. Nakon dezinfekcije 70%-tnim etanolom, otvorila se trbušna šupljina mišica te su se iz rogova maternice izolirali zameci. Zameci su se zatim premjestili u sterilnu Petrijevu posudicu ispunjenu HBSS-om (Gibco, 14175095). Kako bi se osigurala sterilnost postupka, zametci su se prenijeli u laminar gdje su se postupkom dekapitacije žrtvovali.

4.2. Postupci na stanicama

4.2.1. Izolacija živčanih matičnih stanica i uzgoj neurosfera

Izolacija ŽMS-a započela je odvajanjem *telencephalona* te njegovim premještanjem u sterilnu Petrijevu posudicu ispunjenu HBSS-om. *Telencephalon* se prvo mehanički usitni škaricama te zatim premjestili u sterilnu Falcon epruvetu od 50 mL gdje se dodavanjem 1 mL akutaze (StemPro®Accutase® Cell Dissociation Reagent, Gibco by life Technologies, A11105-01) po *telencephalonu* potaknula njihova enzimatska razgradnja. Akutaza je mješavina enzima proteaza i kolagenaza koja se rutinski koristi za odvajanje pojedinačnih stanica iz tkivne

nakupine. Pomoću akutaze tkivo se proteolitički razgrađuje što pospješuje oslobađanje pojedinačnih stanica. Uzorci uronjeni u akutazu su se inkubirali 20 minuta u vodenoj kupelji na 37 °C. Po završetku inkubacije, u svrhu dodatnog poticanja staničnog odvajanja, uzorci su se nekoliko puta resuspendirali. S ciljem inaktivacije djelovanja akutaze, stanice su se prebacile u novu Falcon epruvetu ispunjenu medijem za proliferaciju (DMEM/F12 + Glutamax (Gibco, 31331-093) obogaćenim s 1% N2 Supplement 100x (Gibco, 17502-048), 1% Pen/Strep (Penicillin/Streptomycin, 5000U/ml, Gibco, 15070063), 2% B27 Supplement 50x (Gibco, 17502), 20 ng/ml EGF (Gibco, PMG8041), 10 ng/ml bFGF (Gibco, PMG0035) te 5 mM HEPES (Sigma-Aldrich, H0887). Centrifugiranjem uzoraka na 200 RCF (engl. *Relative Centrifugal Force*) 6 minuta, stanice su se iztaložile na dno Falcon epruvete. Mješavina proliferacijskog medija i akutaze (supernatant) se zatim odbacila, a stanični talog se nježno resuspendirao u 1 mL novog medija za proliferaciju. Završno, stanicama izoliranim od 2 do 3 *telencephalona* dodalo se 12 mL ugrijanog medija za proliferaciju nakon čega su oprezno prebačene u sterilne posude za uzgoj stanica površine 75 cm² (T75, BD Falcon, 353110). Takve su se stanice obilježile kao nulta pasaža te su se u kontroliranim uvjetima (37 °C i 5% CO₂ s vlagom od minimalno 90%) uzgajale u inkubatoru. U svrhu održavanja njihova proliferativnog potencijala, stanicama su se svaka dva dana dodali novi čimbenici rasta.

Izolirane, individualne stanice se dijeljenjem i rastom spajaju s okolnim stanicama u strukture specifične isključivo za ŽMS– neurosfere. Važno je napomenuti kako ŽMS nisu adherentne, već se nalaze u suspenziji. Nekoliko dana nakon izolacije, kada su neurosfere prevladavale u posudi za uzgoj stanica, uslijedila je njihova disocijacija tj. ponovni proces akutazom potpomognute enzimatske razgradnje. Ukoliko neurosfere previše narastu nije moguća njihova razgradnja, pa je stoga iznimno važno optimizirati i nadzirati broj i rast nasađenih stanica. Disocijacija je započela nježnim prebacivanjem u sterilnu 50 mL Falcon epruvetu i centrifugiranjem na 200 RCF 1 minutu. Centrifugiranje u trajanju od 1 minute dovoljno je da stanice padnu na dno i odvoje se od medija. Kako bi u Falcon epruveti ostao samo stanični talog, supernatant se nježno odlio, nakon čega se dodalo 1 mL akutaze. Stanice su se uz povremeno nježno resuspendiranje, inkubirale u akutazi 8 min na 37 °C. Inaktivacija akutaze omogućena je dodavanjem medija za neutralizaciju u omjeru 1:5. Stanice su se centrifugirale 6 minuta na 200 RCF, nakon čega su se pažljivo odvojile od supernatanta. Proces brojanja stanica temeljio se na dodavanju i laganom resuspendiranju staničnog taloga s 1 mL medija za proliferaciju. Za brojanje stanica korištena je Neubauerova komorica. Ukupno je korišteno 600 000 stanica resuspendiranih u 12 mL medija za proliferaciju nasađenih u T75 posudu za uzgoj

stanica (50 000 stanica po mililitru). Stanice koje su zatim bile obilježene kao prva pasaža rasle su u sterilnom inkubatoru pri kontroliranim uvjetima temperature (37 °C), vlage (87-90 %) i ugljičnog dioksida (5%).

4.2.2. Zamrzavanje živčanih matičnih stanica

Uobičajeno se izolacijom dobiva veliki broj stanica koji se u jednom ciklusu pokusa uglavnom ne iskoristi. S ciljem smanjenja prekomjernog žrtvovanja ženki, stanice se mogu smrznuti, pohraniti u tekućem dušiku te prema potrebi koristiti u daljnjim istraživanjima. Smrzavanje stanica odvijalo se u prvoj pasaži, dva dana nakon disocijacije, kada su one prisutne u obliku malih neurosfera veličine oko 50 µm. Iako se točan broj stanica nije mogao sa sigurnošću utvrditi, zamrznuto je oko 600 000 stanica (50 000 po mL) nasadenih prilikom zadnje disocijacije. Proces staničnog smrzavanja provodio se u posebnom mediju sačinjenom od medija za proliferaciju izmijenjenog sastava uz prisutnost dvostruko veće doze B27 suplementa i 20% DMSO-a (D2650, Sigma-Aldrich). DMSO je standardno korišten krioprezervacijski spoj koji formira pore na staničnoj membrani čime potiče izlazak vode iz unutarstaničnog prostora te sprječava nakupljanje kristala i oštećenje stanica (98). Proces smrzavanja započeo je prebacivanjem staničnog sadržaja posude za uzgoj stanica u Falcon epruvetu od 50 mL. Centrifugiranjem 5 minuta na 200 RCF stanice su se odvojile od supernatanta. Staničnom talogu se zatim dodalo 1 mL medija za smrzavanje, lagano se resuspendirao i prebacio u krio epruvetu (Thermo Scientific, Nunc, 368632). Krio tube su premještene u prethodno ohlađeni kalup za smrzavanje (Corning, CLS432004) te je sve zajedno pohranjeno preko noći na -80 °C. Drugi dan, stanice su bile prebačene iz -80 °C u tekući dušik za dugotrajno skladištenje.

4.2.3. Odmrzavanje živčanih matičnih stanica i priprema za pokuse

Neposredno prije odmrzavanja stanica bilo je potrebno pripremiti i ugrijati 22 mL medija za proliferaciju. Proces odmrzavanja ŽMS-a započeo je njihovim vađenjem iz tekućeg dušika i naglim otapanjem u toploj kupelji na 37 °C. Kako bi se spriječio štetan učinak DMSO-a, otopljene stanice bilo je potrebno nježno prebaciti u 10 mL prethodno pripremljenog medija za proliferaciju. Stanice su se zatim centrifugirale 5 minuta 200 RCF. Odbacio se supernatant, a stanice su se nježno resuspendirale u 1 mL medija za proliferaciju. Završno, 1 mL medija sa stanicama se lagano, kap po kap, dodao u preostalih 11 mL medija za proliferaciju te se koristeći jednokratnu serološku pipetu ispustio u sterilnu posudu za uzgoj stanica T75. Kako bi se održali optimalni uvjeti za njihov rast, stanice su bile prebačene u inkubator s konstantnom temperaturom od 37 °C te razinom ugljičnog dioksida od 5% i vlage 85-90%. Ovisno o veličini

i gustoći neurosfera, stanice su se nakon par dana nasađivale ili alternativno, ponovno disocirale istim postupkom opisanim u poglavlju 4.2.1.. Kako bi zadržali mitogeni potencijal, disociranim su se stanicama svaka dva dana dodali svježi faktori rasta. U istraživanju su korištene stanice između pasaža 2 i 5 (P2-P5).

4.2.4. Nasađivanje stanica za ispitivanje diferencijacije

U svim provedenim pokusima koristile su se ŽMS u diferencijaciji. Proces diferencijacije započinje njihovom prianjanjem na sterilne pločice s bunarićima ili Petrijeve posudice sa staklenim dnom koje su prethodno bile presvučene proteinima izvanstaničnog matriksa, PDL-om (Sigma-Aldrich, P6407) i lamininom (Sigma-Aldrich, L2020). Dodatno, u imunocitokemijskoj metodi, stanice su bile nasađene na presvučena okrugla stakalca promjera 12 mm (Menzel, CB00120RA1) koja su se nalazila u sterilnoj pločici s 24 bunarića. PDL se otapao u dvostruko destiliranoj sterilnoj vodi do koncentracije od 50 µg/ml te inkubirao na sobnoj temperaturi preko noći. Drugi dan se ispirao 3 puta po 10 min u sterilnoj vodi nakon čega je dodan laminin. Korištena koncentracija laminina bila je 10 µg/mL, a pripremila se otapanjem u DPBS-u (engl. *Dulbecco's phosphate-buffered saline*) bez Ca^{2+} i Mg^{2+} (Gibco, 14190144). Korišteni volumen obje otopine morao je prekriti dno te je varirao ovisno o vrsti korištene sterilne pločice. Inkubacija laminina provodila se u sterilnom inkubatoru na 37 °C 2 do 3 h nakon čega se nježno aspirirao i jednom isprao u punom mediju za nasađivanje. Medij se također aspirirao te se završno dodao novi puni medij u kojem će biti nasađene stanice. Pločice su se do nasađivanja stanica držale u inkubatoru na 37 °C. Medij za nasađivanje, za razliku od proliferacijskog medija nije sadržavao faktore rasta (EGF i FGF) i suplement B27 koji su zamijenjeni dodatkom FBS-a (Gibco, 10270106) u koncentraciji od 1% te 2% suplementa B27 plus 50x (Gibco, A3582801). Ukupni volumen punog medija za diferencijaciju iznosio je 4 mL za pločice s 6 bunarića, 1 mL za pločice s 24 bunarića te 150 µL za pločice s 96 bunarića. U Petrijevim zdjelicama sa staklenim dnom nalazilo se 2 mL medija za diferencijaciju. Pripremanje, disocijacija i brojanje stanica radilo se po identičnom protokolu opisanom u poglavlju 4.2.1.. Završno, nasađeno je 600 000 – 750 000 stanica u pločice s 6 bunarića, 60 000 – 70 000 stanica u pločice s 24 bunarića, 10 000 stanica u pločice s 96 bunarića te 200 000 – 250 000 stanica u Petrijeve posudice sa staklenim dnom. Optimalni uvjeti za rast stanica osigurani su premještanjem pločica i Petrijevih posuda sa staklenim dnom u sterilni inkubator s kontroliranim uvjetima. Polovica medija za nasađivanje se svaka četiri dana mijenjala s novim medijem za nasađivanje istog sastava uz iznimku korištenja Neurobasal CST-a (Gibco, A13712-01) umjesto DMEM/F12 (1:1)(1x) + Glutamax.

4.3. Model deprivacije kisika i glukoze (model OGD) te reoksigenacije u oštećenju nezrelih stanica živčanog sustava

ŽMS su 1., 7., i 14., dana diferencijacije (D1, D7 i D14) bile izložene *in vitro* modelu ishemijskog moždanog udara (OGD model). Kako bi se induciralo ishemijsko oštećenje, stanicama je oprezno aspiriran medij te dodan novi, prethodno ugrijani medij bez glukoze (DMEM, no glucose, Gibco, 11966025). Ovisno o vrsti pločice s bunarićima, stanicama je dodano 4 mL medija u pločicu s 6 bunarića, 1 mL medija u pločicu s 24 bunarića te 150 μ L u pločicu sa 96 bunarića. U Petrijevu posudu sa staklenim dnom dodano je 2 mL medija. Hipoksijski uvjeti uspostavili su se prebacivanjem stanica u inkubator s kontroliranom razinom kisika od 1% uz konstantnu razinu ugljikova dioksida od 5% te vlage od 85-90%. Tretman je trajao 24 h, a analiza stanica se provodila usporedno s kontrolnim stanicama smještenim u ambijentalnim uvjetima s razinom kisika 18-20%.

Drugi dio doktorskog rada temeljio se na analizi reoksigenacije, utjecaja ŽMS-a te njihovih izoliranih egzosoma na OGD-om oštećene stanice. Po završetku OGD tretmana u trajanju od 24 h, medij bez glukoze je aspiriran te je oštećenim i kontrolnim stanicama (sada označene kao D2, D8 i D15) dodan novi puni medij za diferencijaciju. Dodano je 2 mL u pločice sa 6 bunarića, 150 μ L u pločice sa 96 bunarića te 2 mL u Petrijevu posudu sa staklenim dnom. Reoksigenacija, kao i tretmani trajali su novih 24 h. Ko-kultura OGD-om oštećenih stanica i nezrelih ŽMS-a uspostavila se korištenjem sterilnih staničnih inserata (Merck Millipore, PICM03050). U insertima se nalazilo 300 000 stanica u 2 mL medija za proliferaciju koji su nježno dodani u pločicu sa 6 bunarića gdje su se prethodno oštećene stanice nalazile u 2 mL medija za diferencijaciju. Glavni razlog zbog kojeg su se u tretmanu ŽMS-ma, stanice umjesto u mediju za diferencijaciju nalazile u mediju za proliferaciju bila je dužina trajanja ko-kulture (24 h) uslijed koje dolazi do morfoloških promjena stanica te mogućeg gubitka matičnosti koji je na ovaj način spriječen. Egzosomi otopljeni u ExoR otopini dodavali su se direktno u medij s oštećenim stanicama. U istraživanju su korištene sljedeće skupine: kontrola, I/R (ishemija/reoksigenacija), I/R + ŽMS, I/R + proliferacijski medij, I/R + egzosomi te I/R + ExoR. Skupine I/R + medij te I/R + ExoR korištene su u svrhu isključivanja njihova učinka u tretmanima s ŽMS-ma i egzosomima.

4.4. Izolacija egzosoma iz staničnog medija

Egzosomi su izolirani s pomoću *Cell Culture Media Exosome Purification and RNA Isolation Midi Kit-a* prema uputama proizvođača (Norgen Biotek, 60800). Ukratko, za izolaciju

egzosoma, ŽMS su 2-4 dana rasle u sterilnoj posudi za uzgoj stanica T75. Njihovim centrifugiranjem 5 minuta 200 RCF nastao je stanični talog, a 10-20 mL staničnog medija koristilo se za izolaciju egzosoma. S ciljem uklanjanja staničnih ostataka, medij bez stanica se ponovno centrifugirao 15 minuta 200 RCF te nježno prebacio u novu Falcon epruvetu. Za svaki mL medija dodalo se 2.5 μ L otopine *ExoC* i konstantnih 400 μ L smole za izolaciju (*Slurry E*). Nakon temeljitog vorteksiranja u trajanju od 10 sek, mješavina egzosoma i smole se inkubirala na sobnoj temperaturi 10 minuta. Centrifugiranjem 2 minute na 2000 RPM (engl. *revolutions per minute*) egzosomi su se vezali na smolu, a supernatant se odbacio. Kako bi se odvojili vezani egzosomi, talogu se dodalo 400 μ L otopine *ExoR*. Novim vorteksiranjem osigurala se homogenizacija taloga s otopinom *ExoR*. Inkubacijom od 10 minuta te centrifugiranjem 2 minute na 500 RPM od smole se odvojio proziran supernatant. Završno, koristeći mini filter kolumnu, supernatant se centrifugiranjem na 6000 RPM 1 minutu pročistio pri čemu su u otopini ostali samo egzosomi. Izolirani egzosomi su se do korištenja pohranili otopljeni u otopini *ExoR* na -20 °C.

4.4.1. Kvantifikacija i vizualizacija izoliranih egzosoma

Veličina i koncentracija izoliranih egzosoma kvantificirala se pomoću qNANO Gold uređaja (Izon Science Ltd, Cambridge, MA, USA). Princip rada uređaja temelji se na uspostavljanju napona koji nastaje dodavanjem otopine elektrolita. Kada čestice iz uzorka prolaze kroz poru na membrani, ometa se protok struje što rezultira smanjenim naponom. Svaki blokirajući signal ekvivalentan je jednoj čestici iz uzorka. Istraživanje se provodilo na nanopori (NP100, IzonScience Ltd, Cambridge, MA, USA) širine 49 nm koja se utvrdila s pomoću digitalnog kalipera. Umetanje, čišćenje i kalibriranje pore provodilo se sukladno uputama proizvođača. Izolirane čestice su se detektirale korištenjem tlaka od 10 atm (standardna atmosfera), frekvencije njihova prolaska od 200 po minuti, a u analizi ih je korišteno više od 500. Kvantifikacije izoliranih čestica se provodila koristeći Izon control suite program (Izon Science Ltd).

Prisutnost egzosoma u živim stanicama utvrdila se njihovim označavanjem s fluorescentnom bojom PKH26 (Sigma-Aldrich, PKH26GL) sukladno optimiziranim protokolu. Ukratko, otopina izoliranih egzosoma se u omjeru 1:1 pomiješala s otopinom A nakon čega im je dodana PKH26 boja (200 μ L nosača + 0.8 μ L PKH26 boje). Smjesa se lagano par puta resuspendirala, inkubirala 5 minuta na 37 °C te pomiješala s 400 μ L otopine 10 % BSA. Mješavina otopina se lagano resuspendirala i razrijedila u PBS-u do finalnog volumena od 10

mL. Fluorescentno označeni egzosomi su se ponovno izolirali istim procesom opisanim u poglavlju 4.4. te dodali u medij sa stanicama.

4.5. Izolacija proteina iz stanica

Proteini su izolirani iz stanica nasadenih u pločice sa 6 bunarića. Kako bi se uklonile mrtve stanice, početno je iz bunarića aspiriran stanični medij, a stanice su bile isprane s 1 mL PBS-a. S ciljem smanjenja aktivnosti degradacijskih enzima proteaza i fosfataza, pločice sa stanicama su se prebacile na led te im se dodalo 150 μ L otopine RIPA-e (Millipore, 20-188) s proteaznim (Roche, 11836170001) i fosfataznim (Roche 4906837001) inhibitorima. Stanice su se korištenjem staničnog strugača (Falcon, 353086) odvojile od bunarića te prebacile u 1.5 mL epruvetu (Thermo Scientific, 3451). Izolacija proteina pospješila se uvlačenjem staničnog lizata kroz 27G sterilnu iglu. Stanični lizati su zatim, uz povremeno vorteksiranje, držani na ledu 30-ak minuta. Završno, uzorci su centrifugirani na 14 000 RCF 10 minuta uz temperaturu od +4 °C, pažljivo odvojeni od taloga te alikvotirani i skladišteni na – 20 °C do korištenja.

Kvantifikacija proteina određivala se korištenjem Bradford (Thermo Scientific, 1863028) i BCA metode (Thermo Scientific, 23227) prema uputama proizvođača. Rezultati su dobiveni mjerenjem apsorbance na GloMax® Explorer System na 600 nm za Bradford te 560 nm za BCA metodu. Zbog premale koncentracije proteina izoliranih iz stanica D1 analiziran je proteinski izražaj stanica preostala spomenuta dva dana diferencijacije.

4.6. Priprema stanica za metodu imunocitokemije

Stanice nasadene u pločicu s 24 bunarića i umetnutim stakalcima promjera 12 mm su se koristile za metodu imunocitokemije (ICC). Iz bunarića se prvo pažljivo aspirirao medij nakon čega se dodalo 500 μ L 4 % otopine PFA u PBS-u. PFA je standardno korišten kao fiksativ u kojem se proteini stanica međusobno kovalentno povežu. Inkubacija je trajala 10-15 minuta, nakon čega su se stanice 3x10 minuta ispirale s 500 μ L otopine PBS-a. Pločice s 24 bunarića su se zamotale u parafilm i skladištile na +4 °C do 2 tjedna.

4.7. Izolacija RNA iz stanica

Izolacija RNA molekula iz stanica odradila se s pomoću RNeasy kita (Qiagen, 74104). Stanicama nasadenim u pločice s 6 bunarića početno je aspiriran medij nakon čega im se dodalo 600 μ L otopine RLT obogaćene s beta merkaptetanolom do završne koncentracije od 1%. Korištenjem sterilnih staničnih strugača, stanice su sastrugane, lizat prebačen u sterilne epruvete od 1.5 mL, vorteksiran 1 minutu te pohranjen na -80 °C. Na dan izolacije, uzorci su

otopljeni na 37 °C, a RNA je izolirana sukladno uputama proizvođača. Koncentracija izolirane RNA mjerila se na spektrofotometru (Thermo Scientific, NanoDrop ND-1000).

4.8. Analiza proteinskog izražaja metodom Western blot

Western blot metoda za specifičnu analizu proteinskog izražaja počinjala je pripremom 12%-tnih akrilamidnih gelova sačinjenih od djela za sabijanje te djela za razdvajanje proteina. U pokusima su korišteni *Stain free* gelovi (Bio-Rad, 1610185) pripremljeni prema uputama proizvođača u koje su umetnuti češljevi s 10 ili 15 jažica. Neposredno prije unosa proteinskih lizata u gel, uzorci su se pripremali otapanjem na ledu, reduciranjem disulfidnih veza koristeći NuPAGE™ Sample Reducing Agent otopinu (Invitrogen™, NP0009) koja se pomiješala s otopinom za uzorke (NuPAGE™ LDS Sample Buffer, Invitrogen™, NP0007). Pripremljena mješavina otopina i uzoraka se zatim zagrijavala u termalnom bloku 10 minuta na 70 °C. Gelovi su se prebacili u kadicu s posebnim kalupom za vertikalnu elektroforezu (Mini PROTEAN Tera Cell, Bio-Rad), a unos uzoraka je započeo dodavanjem 5 µL proteinskog standarda s pomoću kojeg se lakše odredila veličina ostalih proteina od interesa. U ostale jažice dodani su uzorci s 3-5 µg proteina. Kadica za vertikalnu elektroforezu bila je do točno određene razine ispunjena otopinom za razdvajanje proteina sastava: 3 g Trizma baza (Sigma-Aldrich, T8524), 14.4 g Glicin (Sigma-Aldrich, G8898), 1 g natrijev dodecil sulfat (SDS, Sigma-Aldrich, L4390) otopljenih u 1 L destilirane vode. Induciranjem napona od 80 V potaknulo se razdvajanje negativno nabijenih proteina. Kada su proteini prošli dio gela za sabijanje, napon se pojačao do 120 V. Vrijeme potrebno za razdvajanje proteina variralo je ovisno o jačini napona te ga je bilo potrebno pažljivo kontrolirati kako bi se osiguralo njihovo potpuno razdvajanje. Po završetku razdvajanja proteina, gelovi su se isprali u destiliranoj vodi. Prijenos proteina s gela na membranu započeo je prethodnom aktivacijom PVDF membrane (poliviniliden fluorid, Merck Millipore, IPVH15150) u metanolu 1 minutu te njenom kalibracijom u otopini za prijenos 10 minuta. Proteinski prijenos temeljio se na slaganju posebne konstrukcije koja omogućava blizak kontakt membrane i gela, a sam prijenos se odvijao putem elektrotransfera u prethodno ohlađenoj otopini za prijenos sastava: 3 g Trizma base (Sigma-Aldrich, T8524) i 14.4 g Glicina (Sigma-Aldrich, G8898) otopljenih u otopini sačinjenoj od 200 mL metanola i 800 mL destilirane vode. Prijenos je trajao 70 minuta uz korištenje konstantnog napona od 30 V. Po završetku prijenosa proteina, s ciljem smanjenja nespecifičnog vezanja, membrana je 2 sata inkubirana u 3-5% mlijeku s niskim udjelom masnoće (Sigma-Aldrich, 70166) otopljenom u TBST-u (tris-buffered saline + 0.1 % Tween 20 (Sigma-Aldrich, P1379)). Sukladno proizvođačevim uputama primarno protutijelo se

razrijedilo u 3% mlijeku niskog udjela masnoće i nanijelo na blokiranu membranu. Inkubacija se odvijala preko noći, uz laganu trešnju klackalice, na +4 °C. Drugi dan se membrana ispirala 3x10 minuta u TBST-u nakon čega je 1 sat inkubirana u sekundarnom protutijelu razrijeđenom u TBST-u u omjeru 1:200 000. Proteini od interesa su detektirani djelovanjem kemiluminiscentnog reagensa (Thermo Scientific, 34095) prema uputama proizvođača na uređaju ChemiDoc MP (Bio-Rad).

Tablica 1. Primarna protutijela i njihova razrjeđenja korištena u procjeni proteinskog izražaja metodom *Western blot*.

Podrijetlo	Protein od interesa	Razrjeđenje	Proizvođač	Kataloški broj
Kunić	PINK1	1:1000	Abcam	ab23707
Miš	Parkin	1:1000	Abcam	ab77924
Kunić	FUNDC1	1:2500	Novus biologicals	NBP1-81063
Kunić	BECLIN1	1:1000	Abcam	ab207612
Kunić	LC3-II	1:1000	Cell signalling	#3868
Kunić	p62	1:15 000	Abcam	ab109012

Tablica 2. Sekundarna protutijela i njihova razrjeđenja korištena u procjeni proteinskog izražaja metodom *Western blot*.

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

4.9. Analiza proteinskog izražaja metodom imunocitokemije

Imunocitokemijska metoda započela je permeabilizacijom fiksiranih stanica u otopini 0.2% Tritona (Sigma Aldrich, T8787) u PBS-u kroz 10 minuta. Stanice su se zatim ispirale 3x10 minuta u PBS-u te blokirale 2 sata na sobnoj temperaturi u 500 µL 3% kozjeg seruma (Thermo Fisher Scientific, 16210064). Po završetku blokiranja, stakalca sa stanicama su se inkubirala preko noći na +4 °C u 90 µL specifičnog primarnog protutijela. Idući dan, stanice su se ispirale u PBS-u 3x10 min te potom inkubirale u otopini 3% kozjeg mlijeka u PBS-u i odgovarajućih

sekundarnih protutijela. Inkubacija je trajala 2 sata na sobnoj temperaturi, a stanice su bile zaštićene od svjetla. Po završetku inkubacije, višak sekundarnog protutijela se ispirao 3x10 minuta u PBS-u. S ciljem vizualizacije staničnih jezgara, stanice su se 10 min bojale otopinom DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole, Roche, 10236276001) koncentracije 0.1 µg/mL. Stanice su se zatim ponovno ispirale 3x10 minuta u PBS-u, a stakalca sa stanicama su se korištenjem otopine za uklapanje fluorescentnih preparata (Dako Fluorescent Mounting Medium, Agilent S3023) uklopila na mikroskopska stakalca. Nakon što se medij za uklapanje osušio na sobnoj temperaturi, stakalca sa stanicama su se zaštitila od svjetla te dugoročno pohranila na +4 °C.

Tablica 3. Primarna protutijela i njihova razrjeđenja korištena u procjeni proteinskog izražaja metodom imunocitokemije.

Podrijetlo	Protein od interesa	Razrjeđenje	Proizvođač	Kataloški broj
Kunić	SOX2	1:200	Cell Signalling	#23064S
Miš	Nestin	1:200	Milipore	MAB353
Pile	GFAP	1:1000	Abcam	ab4674
Pile	MAP2	1:10 000	Abcam	ab5392
Kunić	TOMM20	1:250	Abcam	ab186735

Tablica 4. Sekundarna protutijela i njihova razrjeđenja korištena u procjeni proteinskog izražaja metodom imunocitokemije.

Podrijetlo	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

4.10. Analiza izražaja mRNA

Kako bismo procijenili genski izražaj, RNA molekule izolirane iz uzoraka su se s pomoću *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor Kit-a* (Applied Biosystems, 4374966) početno prepisala u cDNA. U istraživanju su korištene specifične *TaqMan Gene Expression* probe i početnice. Koncentracija uzoraka cDNA iznosila je 25 ng/µL, a ukupna reakcijska smjesa bila je volumena 20 µL te je uključivala 1 µL *TaqMan* kombinacije proba i početnica, 10 µL *TaqMan™ Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems™, 4369016) te jednaku koncentraciju cDNA razrijeđenu u DEPC vodi bez

nukleaza. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu odrađena je prema uputama proizvođača u uređaju 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Uzorci su pipetirani u triplikatima, a analiza genskog izražaja se određivala tako što se početno od vrijednosti CT-a (*threshold cycle*) specifičnog gena oduzela CT vrijednost endogene kontrole čime se dobila vrijednost Δ CT. Zaključno, Δ CT gena od interesa nakon tretmana se oduzimao s Δ CT-om istog gena u kontrolnom uvjetu pri čemu se dobivaju vrijednosti $\Delta\Delta$ CT. Kao endogena kontrola korišten je beta aktin, a rezultati su prikazani pomoću formule $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tablica 5. Popis specifičnih kombinacija proba i početnica korištenih za analizu genskog izražaja metodom RT-PCR.

Kombinacija proba i početnica (<i>assay</i>)	Kataloški broj
Nestin	Mm00450205_m1
Gfap	Mm01253033_m1
Map2	Mm00485230_m1
Fundc1	Mm00511132_m1

4.11. Određivanje intenziteta stanične smrti mjerenjem oslobođene laktat dehidrogenaze

S ciljem određivanja postotka stanične smrti koristio se LDH-Glo™ *Cytotoxicity Assay* (Promega, J2380) prema uputama proizvođača. Ukratko, stanice su u triplikatima bile nasade u pločici s 96 bunarića iz kojih se za analizu uzelo 5 μ L medija. Medij se pomiješao s 95 μ L otopine za pohranu (200mM Tris-HCl (pH 7.3), 10% Glicerol, 1% BSA) te pohranio na -20 °C do analize. Na dan analize, uzorak se u omjeru 1:1 pomiješao s LDH detekcijskim reagensom te se po završetku inkubacije u trajanju 45-50 minuta mjerila luminiscencija. Postotak stanične citotoksičnosti mjerio se prema formuli: $100 * (\text{eksperimentalno otpuštanje LDH} - \text{LDH iz medija bez stanica}) / (\text{maksimalno otpuštanje LDH} - \text{LDH iz medija bez stanica})$, pri čemu eksperimentalno otpuštanje LDH opisuje razinu LDH iz staničnog medija nakon tretmana, dok je maksimalno otpuštanje LDH mjera za razinu LDH nakon što se u novi triplikat stanica kroz 15 minuta dodao Triton X-100 u finalnoj koncentraciji od 10%. Tako se induciralo stanično oštećenje i osigurao najveći stanični izlazak LDH. Kako bi isključili mogućnost interferencije LDH iz medija s dobivenim rezultatima, u formuli se koristila i razina LDH isključivo iz medija bez stanica.

4.12. Analiza strukture i metabolizma mitohondrija

4.12.1. Morfološke promjene mitohondrija

Strukturna analiza mitohondrija i mitohondrijske mreže analizirala se metodom imunocitokemije opisanom u poglavlju 4.9.. U ispitivanju je korišteno anti-TOMM20 protutijelo specifično za vanjsku membranu mitohondrija. Prikupljene slike obrađene su u ImageJ/Fiji programu (NIH, engl. *National Institutes of Health*, SAD) na temelju kojeg su dobivene vrijednosti o ukupnoj površini, duljini te razgranatosti mitohondrijske mreže. Dobiveni rezultati normalizirani su prema ukupnom broju stanica. Za potrebe klasifikacije mitohondrija, koristila se poluautomatska kvantifikacija s pomoću Lusca (Šimunić i sur.) makro-a u ImageJ/Fiji programu na temelju koje su se mitohondriji, s obzirom na njihovu cirkularnost razvrstavali u 3 kategorije: tubularni filamenti (cirkularnost od 0-0.33), intermedijarni filamenti (cirkularnost od 0.34-0.66) te fragmentirani filamenti (cirkularnost od 0.67-1). Rezultati specifičnih mitohondrijskih oblika dobiveni su normalizacijom prema ukupnoj površini mitohondrija.

4.12.2. Detekcija mitohondrijskih slobodnih kisikovih radikala

Superoksidni anioni predstavljaju vrstu slobodnih kisikovih radikala koji nastaju kada elektroni izlazeći iz elektronskog transportnog sustava reduciraju molekule kisika. Specifični su za mitohondrije, a detektiraju su korištenjem kit-a MitoSOX red (ThermoFisher, M36008). Ulaskom u stanice, fluorescentna boja MitoSOX red se djelovanjem superoksidnih aniona oksidira što rezultira fluorescentnim signalom. Ukratko, u medij živih stanica dodala se fluorescentna boja razrijeđena u HBSS-u do finalne koncentracije od 500 nM. Inkubacija je trajala 15 minuta nakon čega su se stanice 2 puta lagano ispirale ugotinjom HBSS. Korištenjem Olympus FV3000 konfokalnog mikroskopa signal se detektirao na 580 nm. Dobivene slike živih stanica su se analizirale u Imaris 9.9 programu.

4.12.3. Kvantifikacija membranskog potencijala mitohondrija

Membranski potencijal mitohondrija kvantificirao se korištenjem kita TMRE (*tetramethylrhodamine, ethyl ester*) (abcam,113852) prema uputama proizvođača pri čemu pozitivno nabijena boja kita specifično veže negativno nabijenu membranu mitohondrija. Ukratko, boja se razrijedila direktno u mediju do finalne koncentracije od 200 nM te se sa stanicama inkubirala 20 minuta. Po isteku inkubacije, stanice su se 2 puta lagano ispirale s prethodno ugrijanim PBS-om nakon čega je signal detektiran na 575 nm. Slikanje živih stanica

provodilo se korištenjem Olympus FV3000 konfokalnog mikroskopa, a obrada slika u Imaris 9.9 (Oxford Instruments) programu.

4.13. Kolokalizacija između LC3/GFP i LysoTracker-a

S ciljem potvrde aktivnosti autofagije, u istraživanju je analizirana kolokalizacija između GFP-om obilježenih autofagosoma te lizosoma obilježenih komercijalnim kitom LysoTracker Deep Red (ThermoFisher, L12492) prema uputama proizvođača. Ukratko, obilježavanje zrelih autofagosoma provodilo se korištenjem kita Premo Autophagy sensor (ThermoFisher, P36235) temeljenog na ne-replikativnoj, stabilnoj BacMAM (Baculovirus posredovana genska transdukcija stanica sisavaca) virusnoj tehnologiji kojom nastaje himera LC3B-GFP. Virusi su uz MOI=20 (engl. *multiplicity of infection*) direktno dodani u medij sa živim stanicama te inkubirani preko noći u inkubatoru s kontroliranim uvjetima. Sljedećeg dana, stanicama je direktno u medij dodan *LysoTracker Deep Red* do finalne koncentracije od 50 nM koji je inkubiran 30 minuta. Po završetku inkubacije, stanice su se jednom nježno isprale s ugrijanim medijem te su slikane koristeći Olympus FV3000 konfokalni mikroskop. Signal LC3/GFP himere detektiran je na 488 nm, a *LysoTracker Deep Red-a* na 633 nm. Analiza kolokalizacije provodila se mjerenjem Pearsonova koeficijenta korelacije u programu Imaris 9.9.

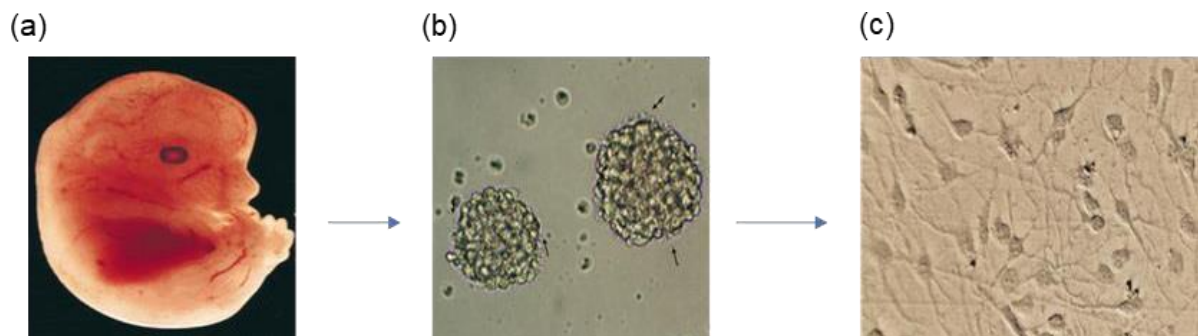
4.14. Statistička obrada rezultata

Statistička obrada rezultata temeljila se na podacima prikupljenim provedbom 3 neovisna eksperimentalna ponavljanja pokusa. Za prvi dio rezultata, gdje se ispitivao samo utjecaj OGD-a, pod pretpostavkom normalne distribucije podataka, koristio se Studentov T-test gdje se $p < 0.05$ smatrao statistički značajnim (*), $p < 0.01$ statistički iznimno značajnim (**), a $p > 0.05$ statistički beznačajnim (ns). Za rezultate dobivene u drugom djelu ispitivanja gdje se pratio utjecaj perioda reoksigenacije te tretmana ŽMS-a, kao i egzosoma na stanice oštećene ishemijsko-reperfuzijskom ozljedom korištena je jednosmjerna ANOVA uz višestruku usporedbu parova te *post hoc* analiza prema Benjamini Hochberg-u gdje se $p < 0.05$ smatrao statistički značajnim (*), a $p < 0.01$ statistički iznimno značajnim (**). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD (standardna devijacija). Statistička analiza i grafički prikazi napravljeni su u programu GraphPad Prism verzija 9.4.1. (GraphPad program, San Diego, California, SAD).

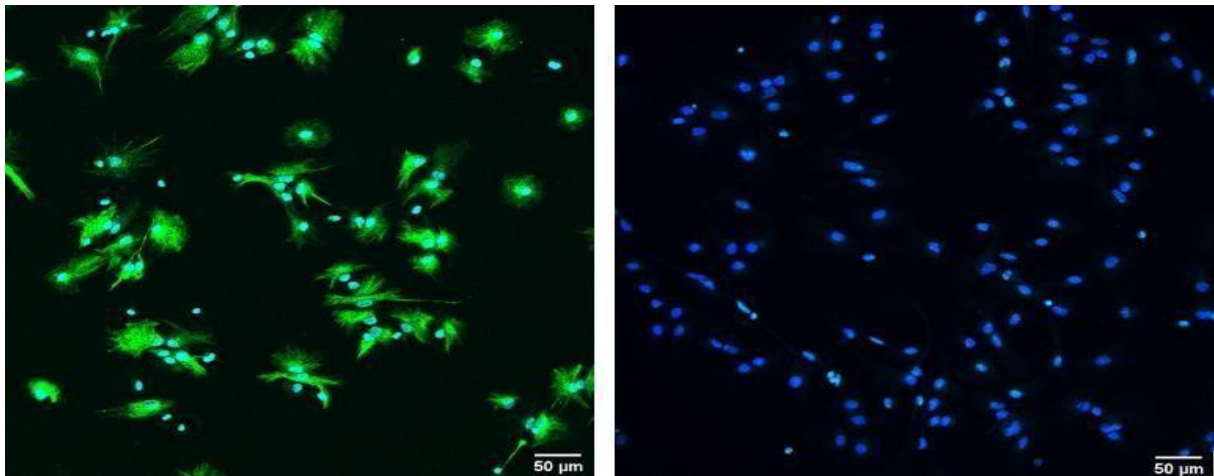
5. Rezultati doktorske disertacije

5.1. Primijenjen protokol dovodi do izolacije homogene populacije živčanih matičnih stanica

ŽMS izolirane su i kultivirane sukladno protokolu opisanom u poglavlju 4.2.1. Rast i proliferacija se odvijala u sterilnoj posudi za rast stanica T75 uz dodavanje faktora rasta. ŽMS su prisutne u suspenziji gdje se grupiraju i tvore specifične strukture nazvane neurosfere. Diferencijacija pojedinačnih stanica bila je potaknuta njihovim nasađivanjem na sterilne pločice sastavljene od bunarića presvučenih s PDL-om i lamininom te korištenjem medija za diferencijaciju (Slika 4). U prvom danu diferencijacije, imunocitokemijskom se metodom korištenjem biljega SOX2 i Nestina potvrdila njihova matičnost gdje je bilo pozitivno više od 90% stanica (Slika 5).



Slika 4. Izolacija i kultivacija ŽMS-a. ŽMS izolirane su iz telencephalona mišjih embrija (a). Nakon izolacije nasađene su u sterilnu posudu za uzgoj stanica gdje formiraju strukture nazivane neurosfere (b). Nasađivanjem pojedinačnih stanica u mediju za diferencijaciju započinje proces diferencijacije u populaciju zrelih neurona i astrocita (c).



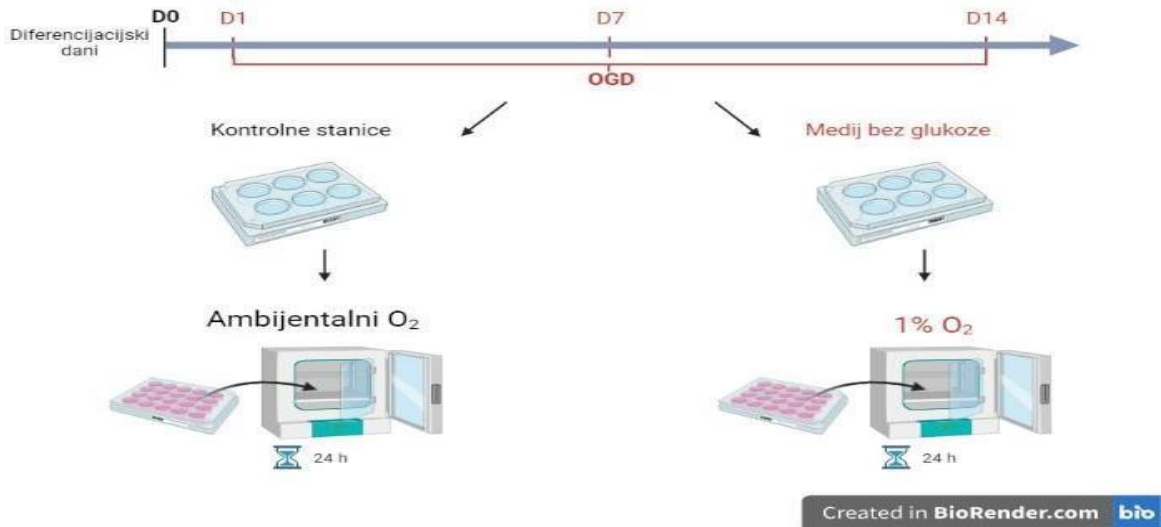
Slika 5. Populacija matičnih stanica pozitivnih na biljegu matičnosti Nestin (zeleno) i SOX2 (tamno plavo). DAPI (svijetloplavo) je korišten za obilježavanje jezgara. Slikano konfokalnim mikroskopom povećanja 20x. Mjerna skala iznosi 50 µm.

5.2. Primijenjen protokol diferencijacije živčanih matičnih stanica dovodi do nastanka većeg broja astrocita i manjeg broja neurona

Nasađene pojedinačne ŽMS su diferencirale kroz 14 dana, a analiza se provodila na stanicama prvog (D1), sedmog (D7) te četrnaestog (D14) dana diferencijacije. U svakoj od navedenih vremenskih točaka pratila se prisutnost nezrelih stanica (biljeg Nestin) te zrele populacije astrocita (biljeg GFAP) i neurona (biljeg MAP2). Dobiveni rezultati sugeriraju kako su stanice u D1 dominantno matične, pozitivne na Nestin, s tek ponekim pozitivnim stanicama na biljegu astrocita i neurona. Zanimljivo, u D7 je bio vidljiv stabilan izražaj Nestina te populacija stanica sačinjena od astrocita i neurona. U zadnjoj diferencijacijskoj točki od interesa, D14, detektirani su gotovo isključivo astrociti. Također, iako stanice poprimaju obilježja i morfologiju zrelih stanica, biljeg Nestin je i dalje prisutan u velikoj većini stanica. Dobiveni rezultati ukazuju kako se korištenjem medija za diferencijaciju uz dodatak FBS-a primarno potiče nastanak populacije astrocita. Također, odabrane točke od interesa ukazuju na različit stupanj zrelosti stanica živčanog sustava, što ovaj model čini pogodnim u istraživanjima u kojima se žele usporediti stanice na različitim diferencijacijskim stupnjevima.

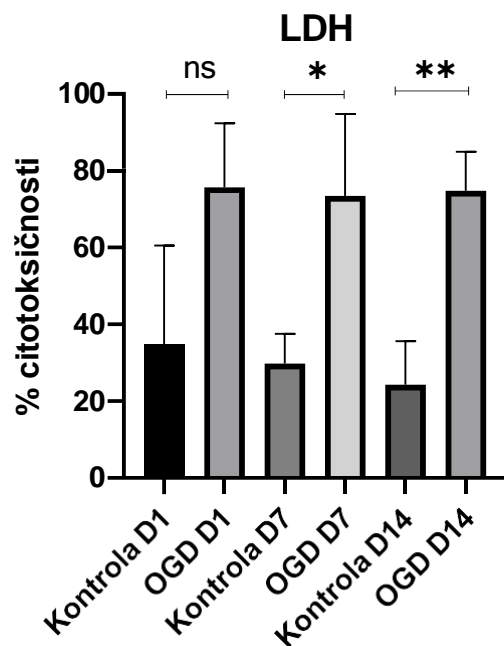
5.3. Akutni nedostatak kisika i glukoze rezultira povećanim brojem odumrlih stanica te utječe na diferencijaciju

In vitro model ishemijske ozljede (OGD model) induciran je tako da se stanicama u trajanju od 24 h uskratila glukoza te smanjila razina kisika na 1% (Slika 6).



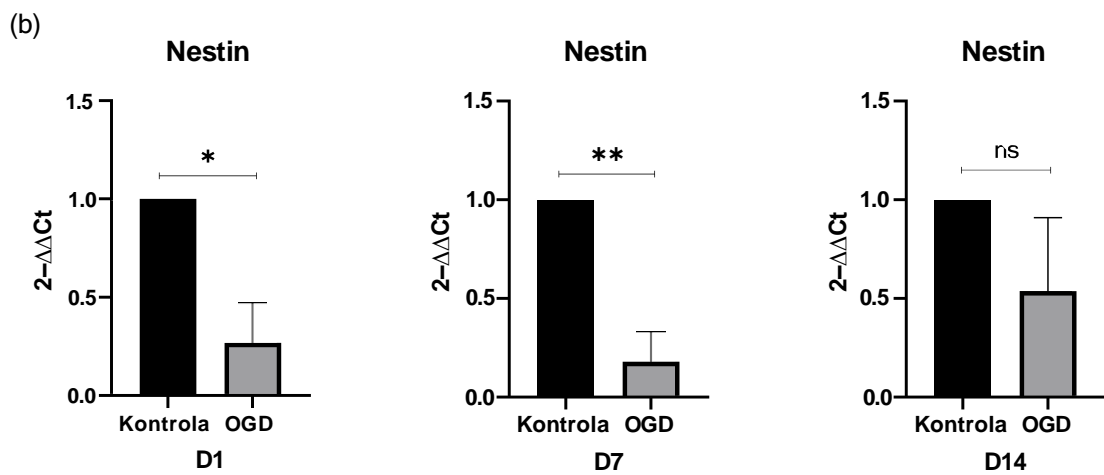
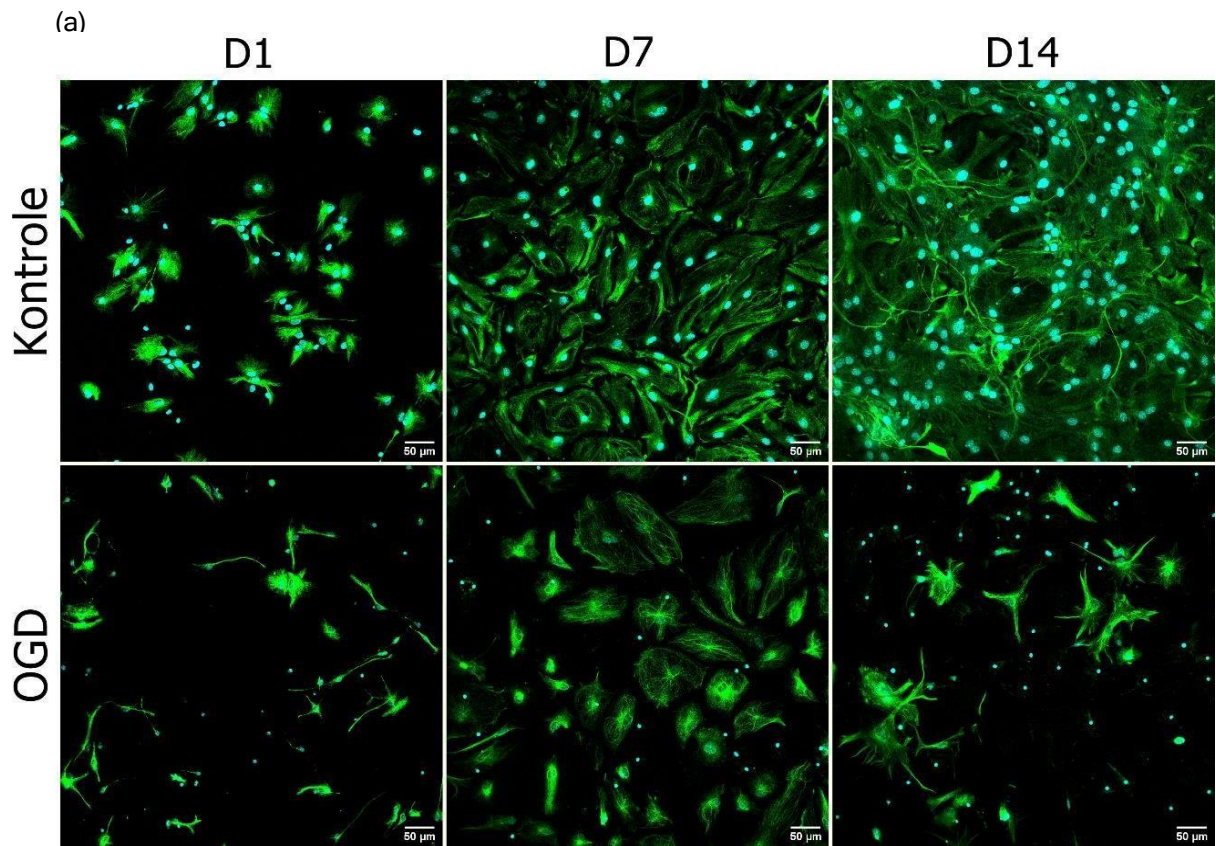
Slika 6. Shematski prikaz izazivanja ishemijske ozljede. Ishemijska ozljeda inducirana je kada se stanicama tijekom 24h uskratila glukoza te smanjenjila razina kisika na 1%. Analizirane su stanice prvog (D1), sedmog (D7) i četrnaestog (D14) dana diferencijacije. Slika je izrađena u programu BioRender.com.

Citotoksičnost korištenog modela se ispitivala analizom otpuštanja LDH iz medija. Stanično otpuštanje LDH izravno korelira sa stupnjem membranskog oštećenja što u konačnici rezultira staničnom smrću. Dobiveni rezultati su pokazali kako je razina LDH u vremenskoj točki D1 bila 35% u kontrolnoj te 75% u OGD-om tretiranoj skupini. Razina otpuštenog LDH se u kontrolnoj grupi stanica D7 smanjivala te je iznosila 30% dok je u OGD-om tretiranoj grupi ostala slična D1 i iznosila je oko 75% ($p = 0.023$). U D14 detektiran je daljnji pad otpuštenog LDH kontrolne skupine gdje je iznosio nešto manje od 30% usporedno s OGD-om tretirane grupe gdje je ponovno izmjereno otpuštanje iznosilo oko 75% ($p = 0.004$). Nešto viši LDH kontrolne skupine u D1 u odnosu na D7 i D14 može se pripisati staničnom stresu nastalom kao posljedica djelovanja akutaze i nasađivanja (Slika 7).



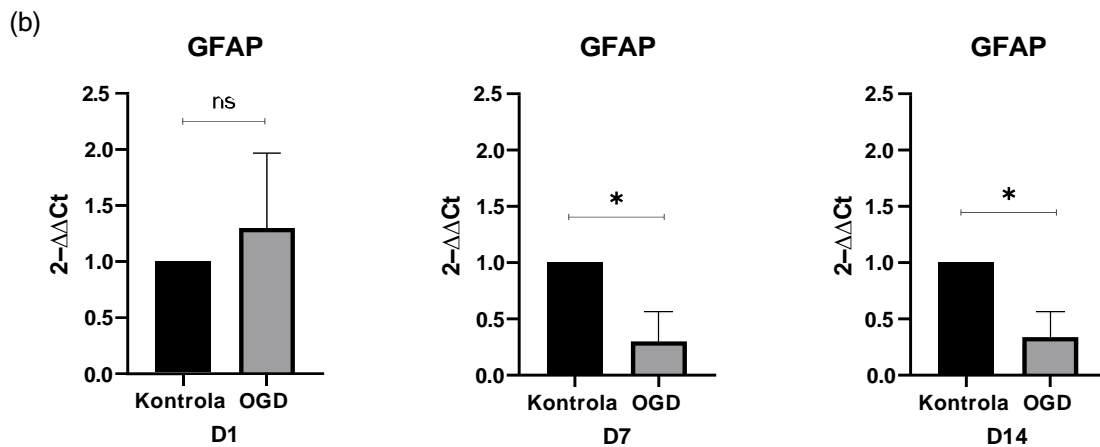
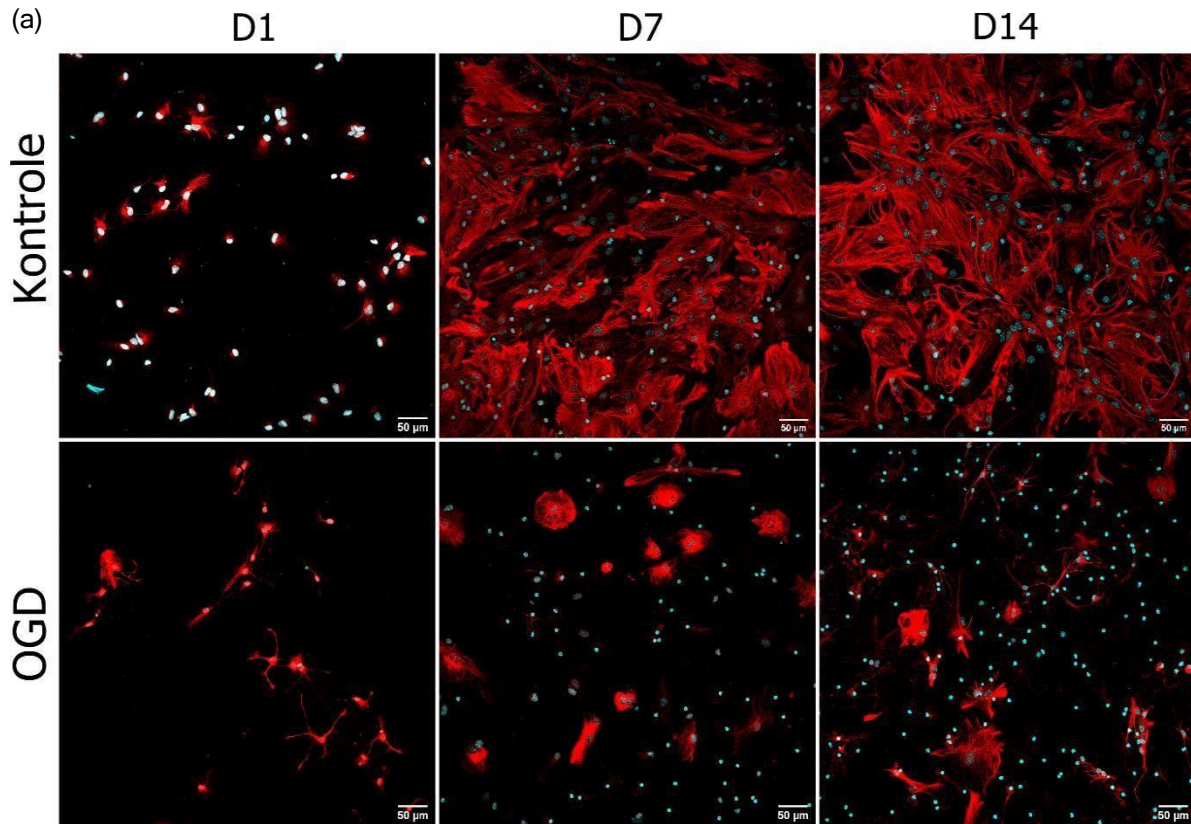
Slika 7. Postotak citotoksičnosti kontrolnih i OGD-om oštećenih ŽMS-a u diferencijaciji dobiven mjerenjem razine otpuštenog LDH.

Osim stanične citotoksičnosti, metodama RT-PCR-a i imunocitokemije ispitivao se učinak ishemijske ozljede na pojedine stanične populacije. Deskriptivna imunocitokemijska analiza Nestina ukazuje na njegov pad u sve 3 diferencijacijske točke od interesa u OGD-om oštećenim skupinama (**Slika 8 (a)**). Kvantitativna analiza rezultata dobivenih metodom RT-PCR potvrđuje smanjen izražaj ovog biljega u OGD-om tretiranim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu ($2^{-\Delta\Delta CT}$) uz statističku značajnost prisutnu u D1 ($p = 0.012$) i D7 ($p = 0.005$) (**Slika 8 (b)**).



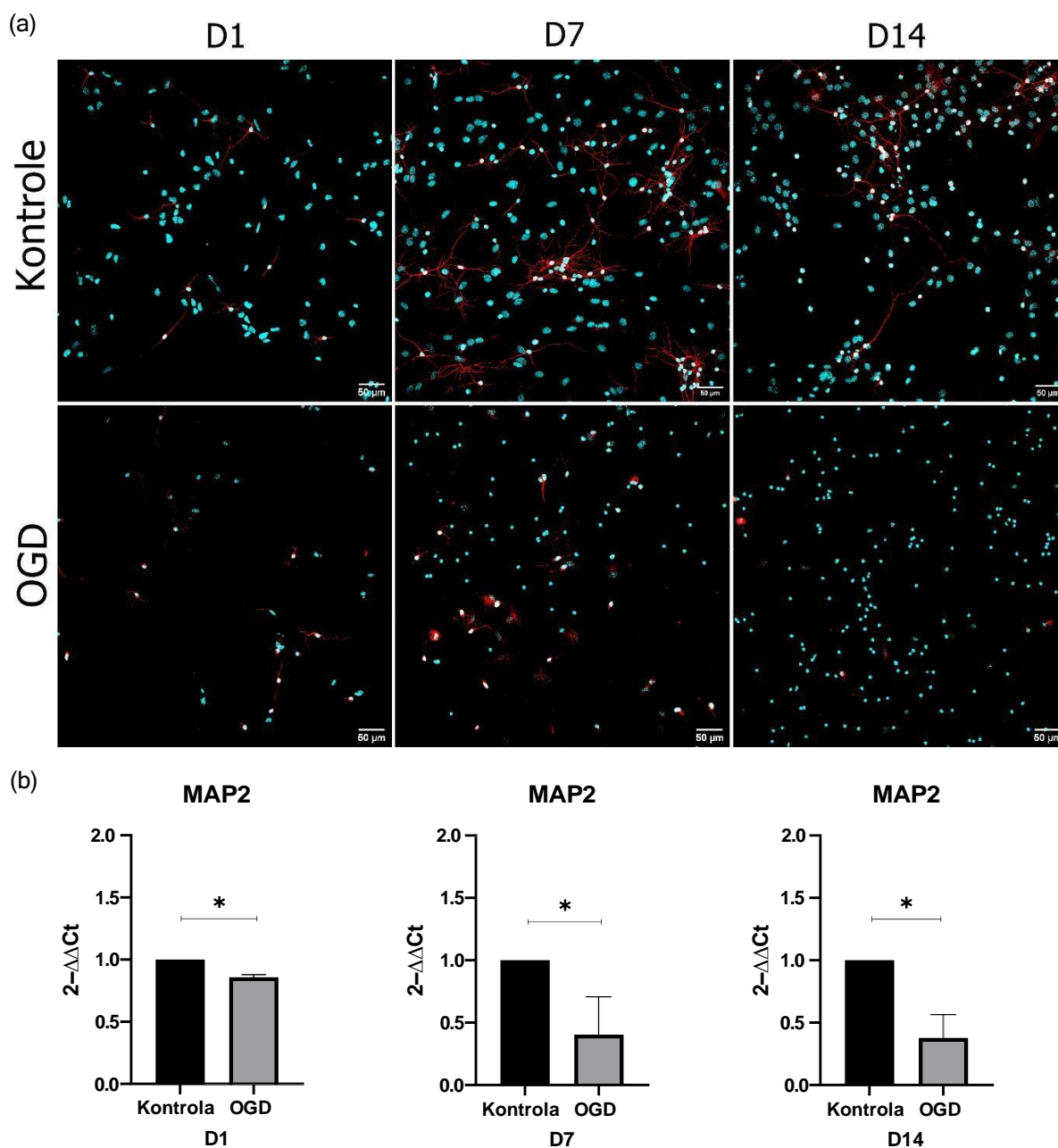
Slika 8. Utjecaj OGD-a na proteinski (a) i genski (b) izražaj Nestina. Slike dobivene korištenjem konfokalne mikroskopije prikazuju matične stanice (zeleno) te jezgre stanica (svijetloplavo). Upotrijebljeno je 20x povećanja, a mjerna skala iznosi 50 μm . Rezultati promjene genskog izražaja OGD-om tretiranih stanica u odnosu na kontrolnu ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) prikazani su kao srednja vrijednost \pm SD.

Zanimljivo, imunocitokemijska analiza otkriva prisutnost prezasićenih piksela u OGD-om tretiranih astrocita što upućuje na strukturno sabijanje stanica kao i prisutnost astroglioze (**Slika 9 (a)**). Kvantifikacija genskog izražaja astrocitnog biljega ukazuje na porast razine mRNA u D1 te statistički značajan pad u D7 ($p = 0.020$) i D14 ($p = 0.017$) OGD-om oštećenih skupina (**Slika 9 (b)**).



Slika 9. Utjecaj OGD-a na proteinski (a) i genski (b) izražaj astrocitnog biljega (GFAP). Slike dobivene korištenjem konfokalne mikroskopije prikazuju astrocite (crveno) te jezgre stanica (svjetloplavo). Upotrijebljeno je 20x povećanja, a mjerna skala iznosi 50 μm . Rezultati promjene genskog izražaja OGD-om tretiranih stanica u odnosu na kontrolnu ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) prikazani su kao srednja vrijednost \pm SD.

Završno, deskriptivna imunocitokemijska analiza otkriva gotovo potpuno odumiranje stanica koje su pozitivne na biljege neurona u OGD-om tretiranim skupinama (Slika 10 (a)). Kvantitativnom analizom genskog izražaja neurona uočen je statistički značajan pad u sve 3 točke od interesa u skupinama tretiranih OGD-om (u D1 $p = 0.033$, u D7 $p = 0.037$, a u D14 $p = 0.014$) (Slika 10 (b))

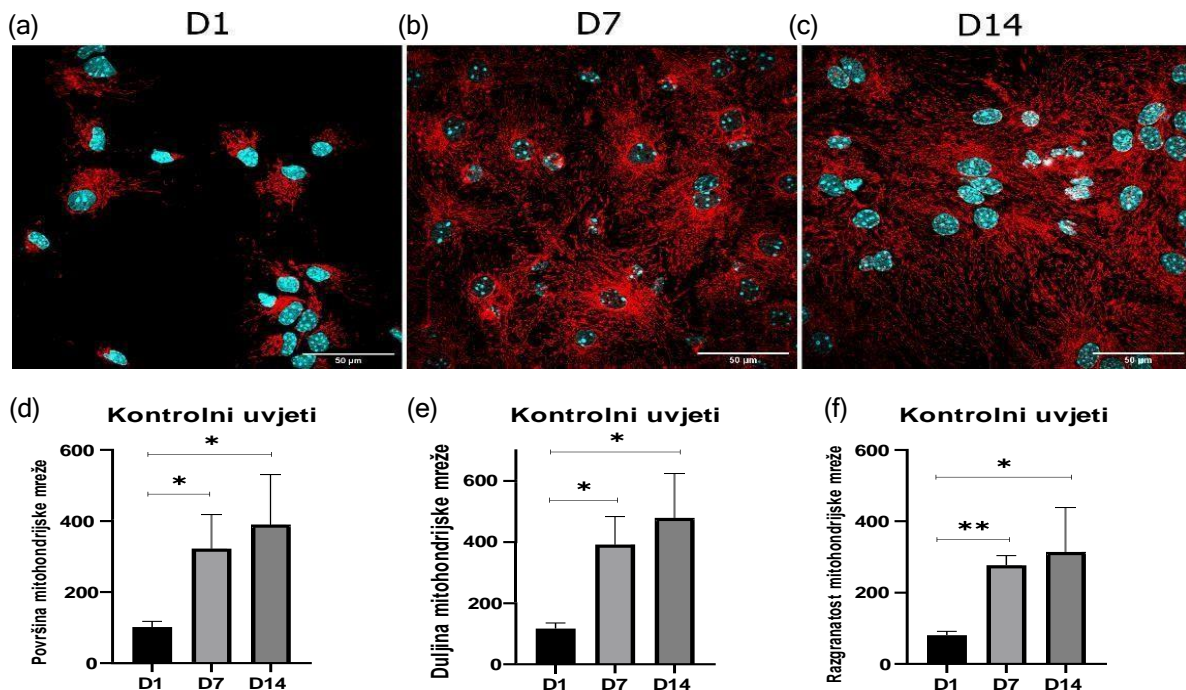


Slika 10. Utjecaj OGD-a na proteinski (a) i genski (b) izražaj neuronalnog biljega (MAP2). Slike dobivene korištenjem konfokalne mikroskopije prikazuju neurone (crveno) te jezgre stanica (svijetloplavo). Upotrijebljeno je 20x povećanja, a mjerna skala iznosi 50 μm . Rezultati promjene genskog izražaja OGD-om tretiranih stanica u odnosu na kontrolnu ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) prikazani su kao srednja vrijednost \pm SD.

5.4 Analiza morfologije i metabolizma mitohondrija

5.4.1. Proces stanične diferencijacije praćen je porastom broja i kompleksnosti mitohondrija

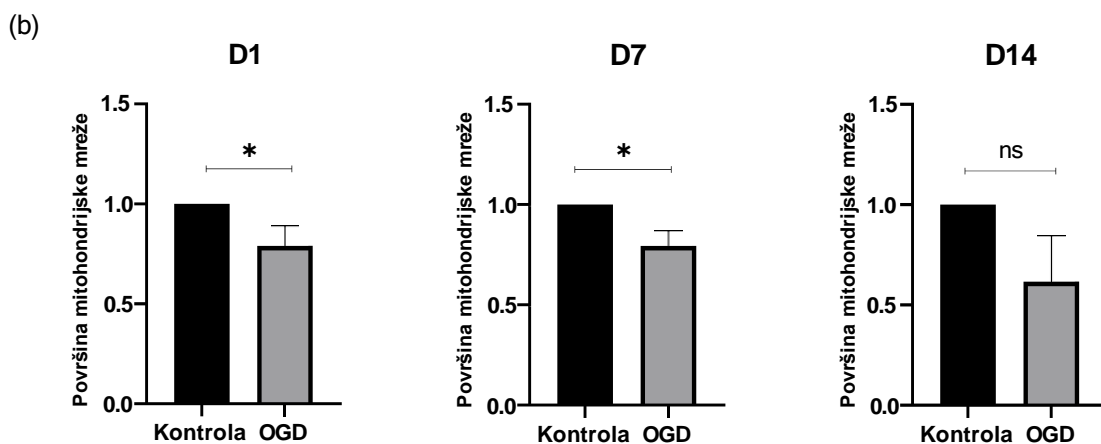
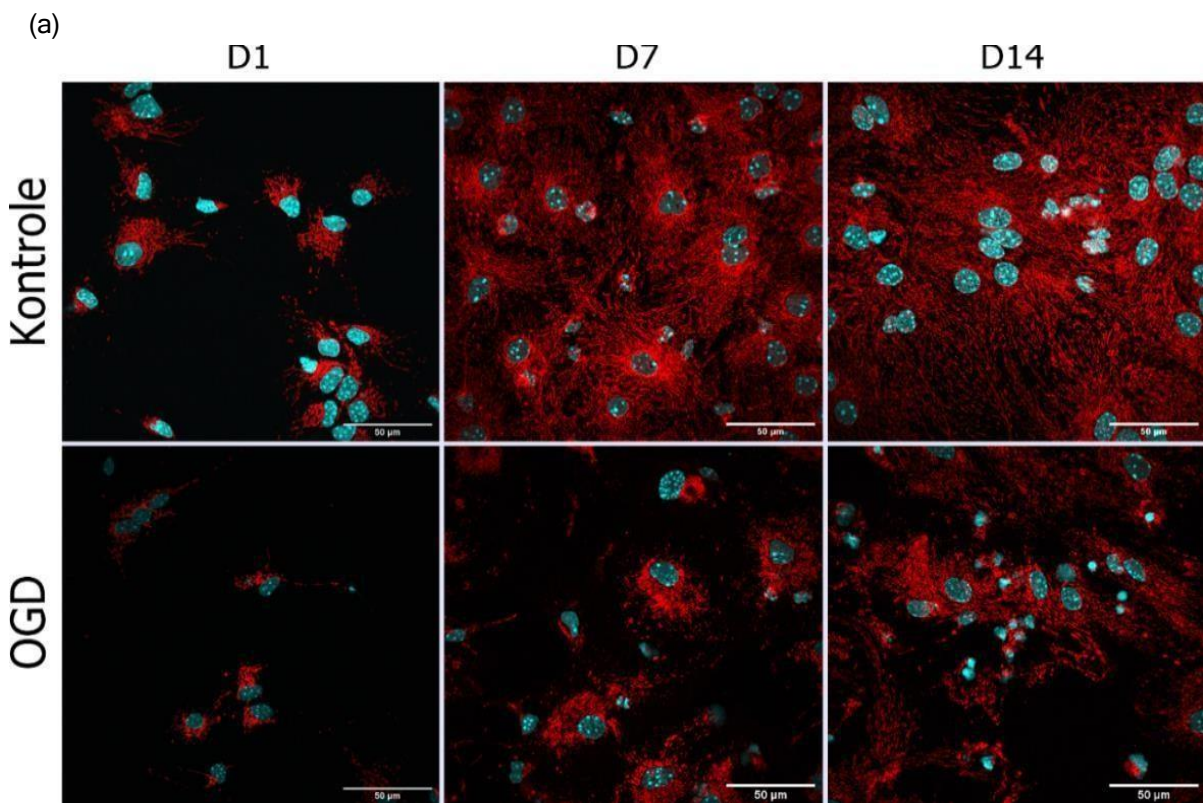
Proces diferencijacije stanica praćen je njihovim strukturnim i metaboličkim promjenama. Kako bi se utvrdile promjene u broju i kompleksnosti mitohondrija u kontrolnim uvjetima spomenutih točaka od interesa (D1, D7, D14), imunocitokemijskom metodom se analizirao proteinski izražaj TOMM20, biljega vanjske membrane mitohondrija. Razvoj mitohondrija opisivao se kvantifikacijom ukupne površine mitohondrija, duljine mitohondrijske mreže te njihove razgranatosti. Rezultati potvrđuju kako se diferencijacijom stanica povećava ukupna površina, duljina te razgranatost mitohondrija. Tako je, usporedno s D1, izmjeren 3.5 puta veći porast površine mitohondrijske mreže na D7 ($p = 0.020$) odnosno 4 puta veći porast na D14 ($p = 0.039$). Također, rezultati ukazuju na 4 puta veći porast duljine mitohondrijske mreže u D7 ($p = 0.010$) te još veći porast od 5 puta na D14 ($p = 0.029$). Analiza mitohondrijske razgranatosti otkriva porast od 3 puta u D7 ($p = 0.006$) te gotovo 4 puta u D14 u odnosu na D1 ($p = 0.044$) (Slika 11).

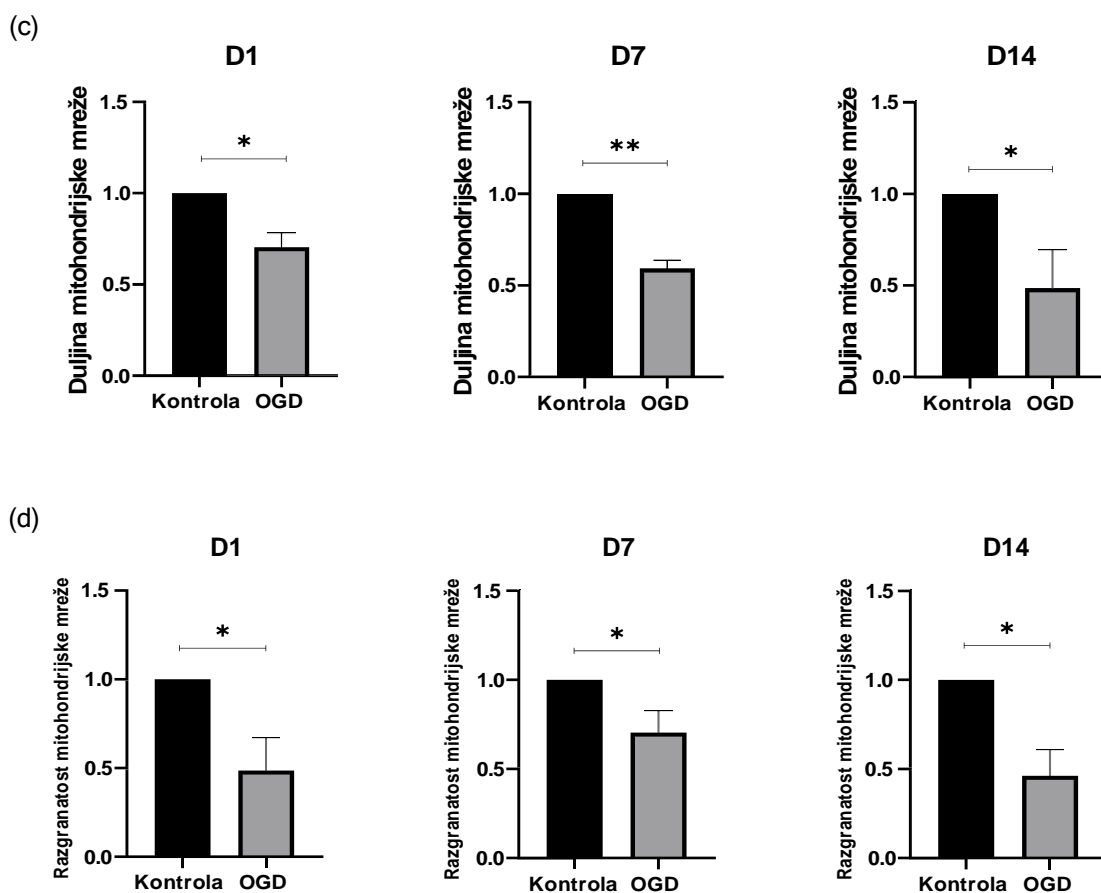


Slika 11. Promjene specifičnih parametara mitohondrija tijekom diferencijacije ŽMS-a. Slike dobivene korištenjem konfokalne mikroskopije prikazuju TOMM20 (crveno) prvi (a), sedmi (b) i četrnaesti (c) dan diferencijacije stanica kontrolnih uvjeta te njihove jezgre (svijetloplavo). Upotrijebljeno je 60x povećanja, a mjerna skala iznosi 50 µm. Rezultati površine (d), duljine (e) te razgranatosti mitohondrijske mreže (f) prikazani su kao srednja vrijednost \pm SD.

5.4.2. Akutni manjak kisika i glukoze narušava kompaktnost mitohondrija

S ciljem utvrđivanja utjecaja OGD-a na morfologiju mitohondrija, ispitivani su isti parametri korišteni u analizi kontrolnih uvjeta normalizirani prema vrijednostima kontrole. Dobiveni rezultati ukazuju na smanjenje ukupne površine mitohondrija u sve 3 diferencijacijske točke od interesa, uz statističku značajnost vidljivu u D1 ($p = 0.032$) i D7 ($p = 0.020$) (**Slika 12 (b)**). Jači učinak OGD-a vidljiv je analizom duljine (u D1 $p = 0.010$, u D7 $p = 0.002$, a u D14 $p = 0.025$) i razgranatosti mitohondrijske mreže (u D1 $p = 0.019$, u D7 $p = 0.026$, a u D14 $p = 0.012$) gdje je kvantificiran statistički značajan pad u svim promatranim točkama (**Slika 12 (c) i (d)**).



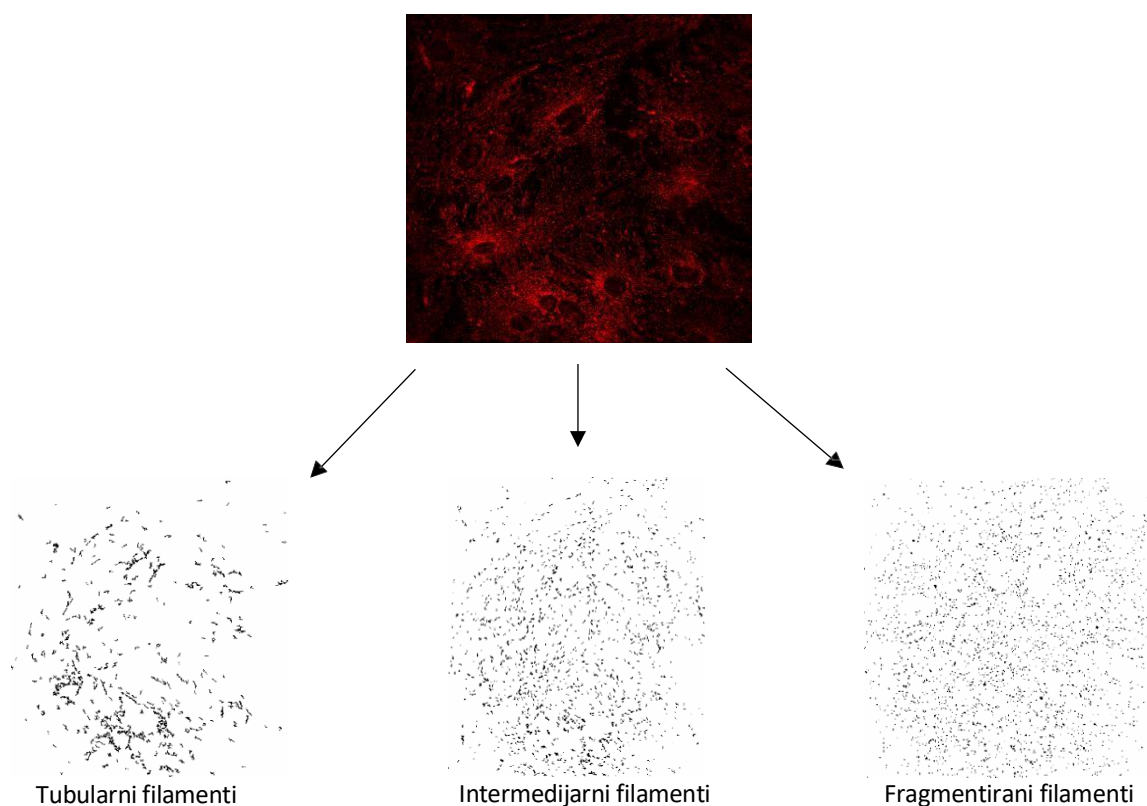


Slika 12. Reprezentativne slike mitohondrijske mreže (crveno) između kontrolnih i OGD-om tretiranih skupina (a). Slike dobivene korištenjem konfokalne mikroskopije na 60x povećanju. Mjerna skala iznosi 50 μ m. Promjene površine (b), duljine (c) i razgranatosti (d) mitohondrijske mreže normalizirane su prema vrijednostima kontrolne skupine.

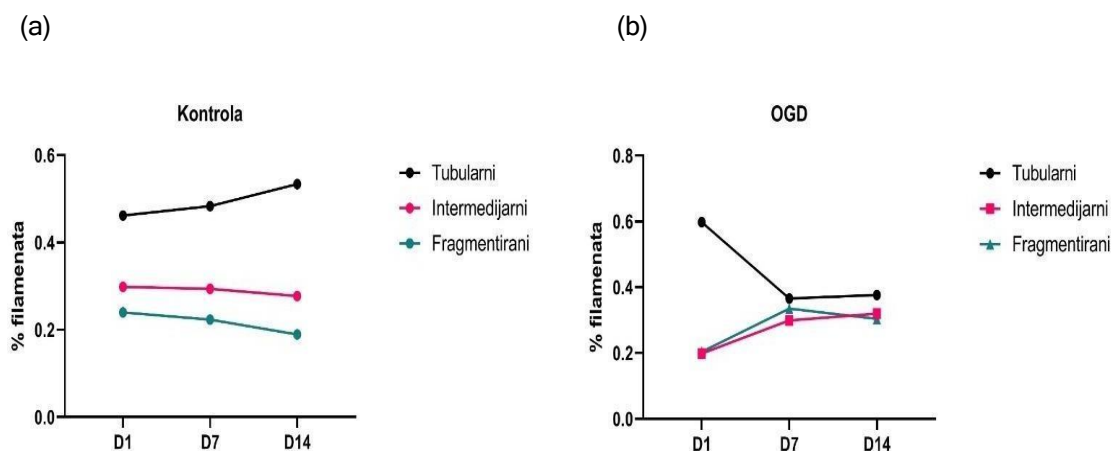
5.4.3. Proces stanične diferencijacije i akutni manjak kisika i glukoze uzrokuje promjene fuzijsko/fizijskih ciklusa mitohondrija

Nakon što je kvantificirana promjena u broju i razgranatosti mitohondrija, sljedeći korak bio je analizirati strukturne promjene oblika mitohondrija te fuzijsko/fizijske procese. U tu svrhu su se korištenjem makro-a Lusca, mitohondriji, s obzirom na njihovu cirkularnost razvrstali u 3 specifične kategorije; tubularne filamente, intermedijarne filamente te fragmentirane filamente (**Slika 13**). Dobiveni rezultati sugeriraju kako se u kontrolnim (fiziološkim) uvjetima postotak tubularnih filamenata povećavao tijekom diferencijacije. Suprotno, diferencijacijskim procesom se postotak fragmentiranih filamenata smanjivao dok je postotak intermedijarnih filamenata ostajao konstantan (**Slika 14 (a)**). Uzevši u obzir parametre mitohondrijske mreže, kao i postotak specifičnih mitohondrijskih filamenata zaključuje se kako su tijekom diferencijacije stanica kontrolnih uvjeta izraženiji fuzijski procesi te kako mitohondriji formiraju kompaktnu, međusobno povezanu mrežu. Suprotno, u OGD-om tretiranim

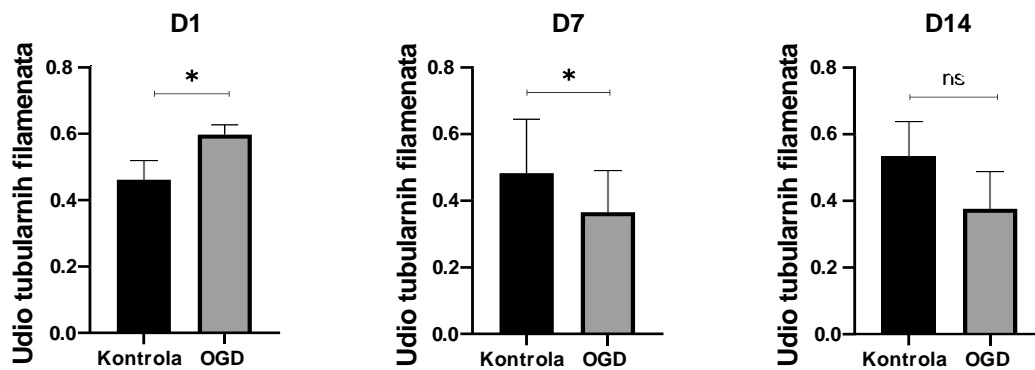
skupinama vidljivo je povećanje postotka fragmentiranih i intermedijarnih filamenata, kao i smanjenja tubularnih filamenata čime se zaključuje kako su aktivniji fizijski procesi i fragmentacija mitohondrija (**Slika 14 (b-e)**). Povećana aktivnost fizijskih procesa potvrdila se 3D analizom sfericiteta mitohondrija gdje je vidljiv porast kod sva 3 diferencijacijska dana u OGD-om tretiranim skupinama sa statističkom značajnošću prisutnom na D7 ($p = 0.031$) i D14 ($p = 0.012$) (**Slika 14 (f)**).



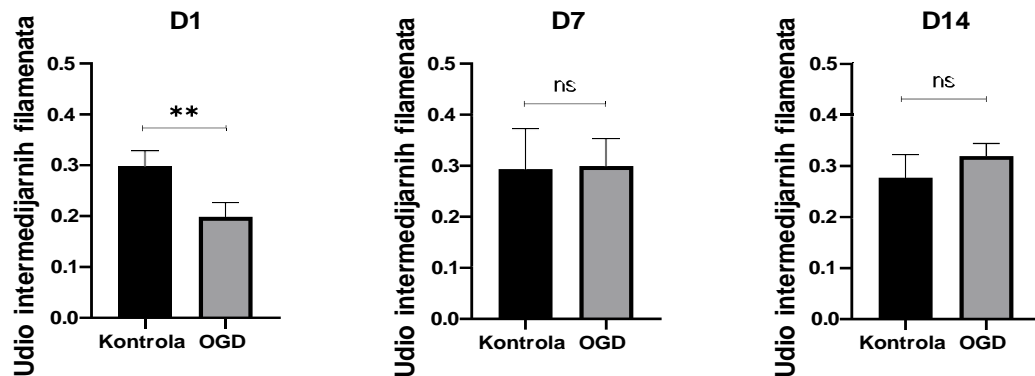
Slika 13. Klasifikacija različitih mitohondrijskih filamenata. Reprezentativna slika mitohondrija (crveno) te njena kategorizacija prema cirkularnosti filamenata koristeći Lusca makro.



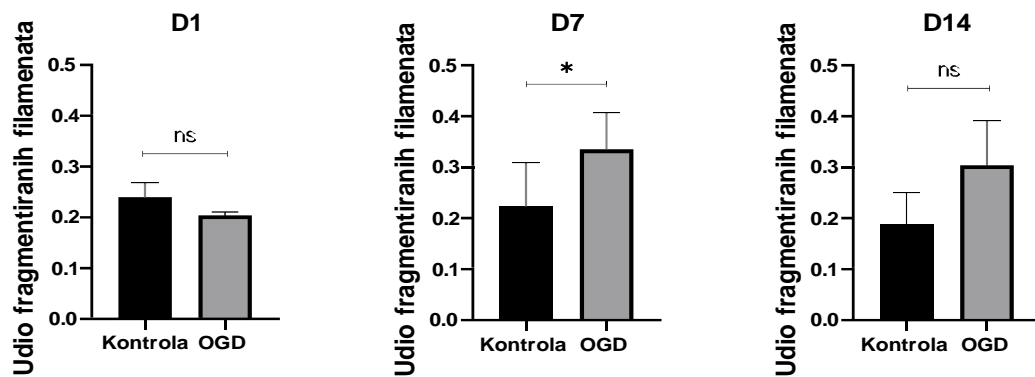
(c)



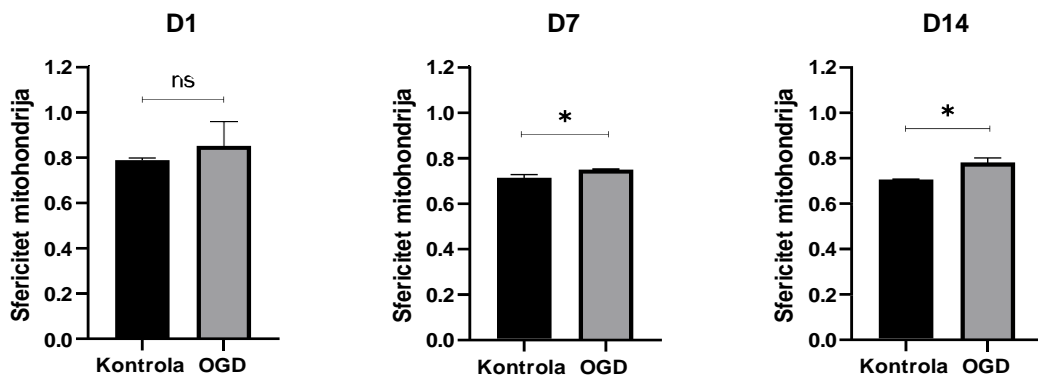
(d)



(e)



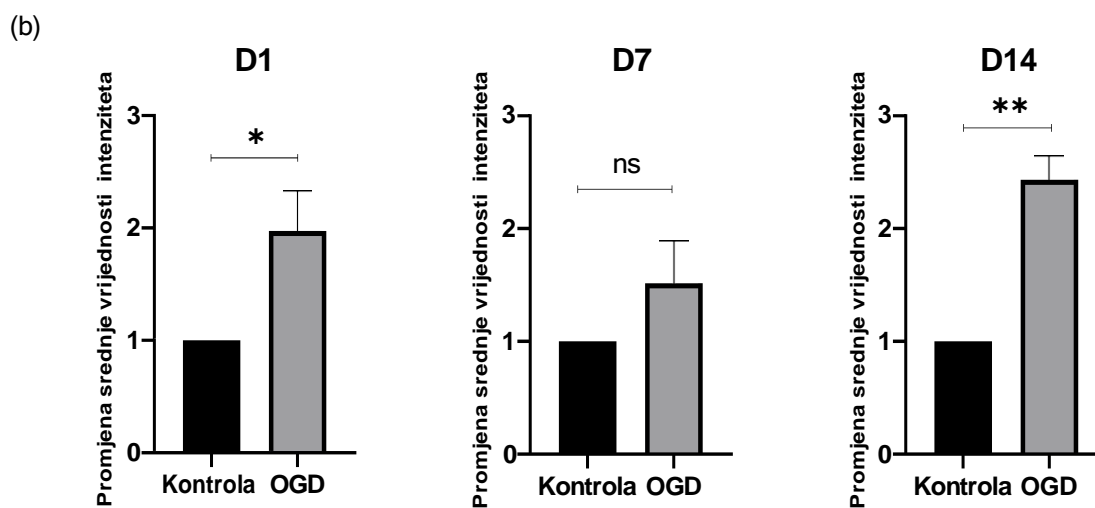
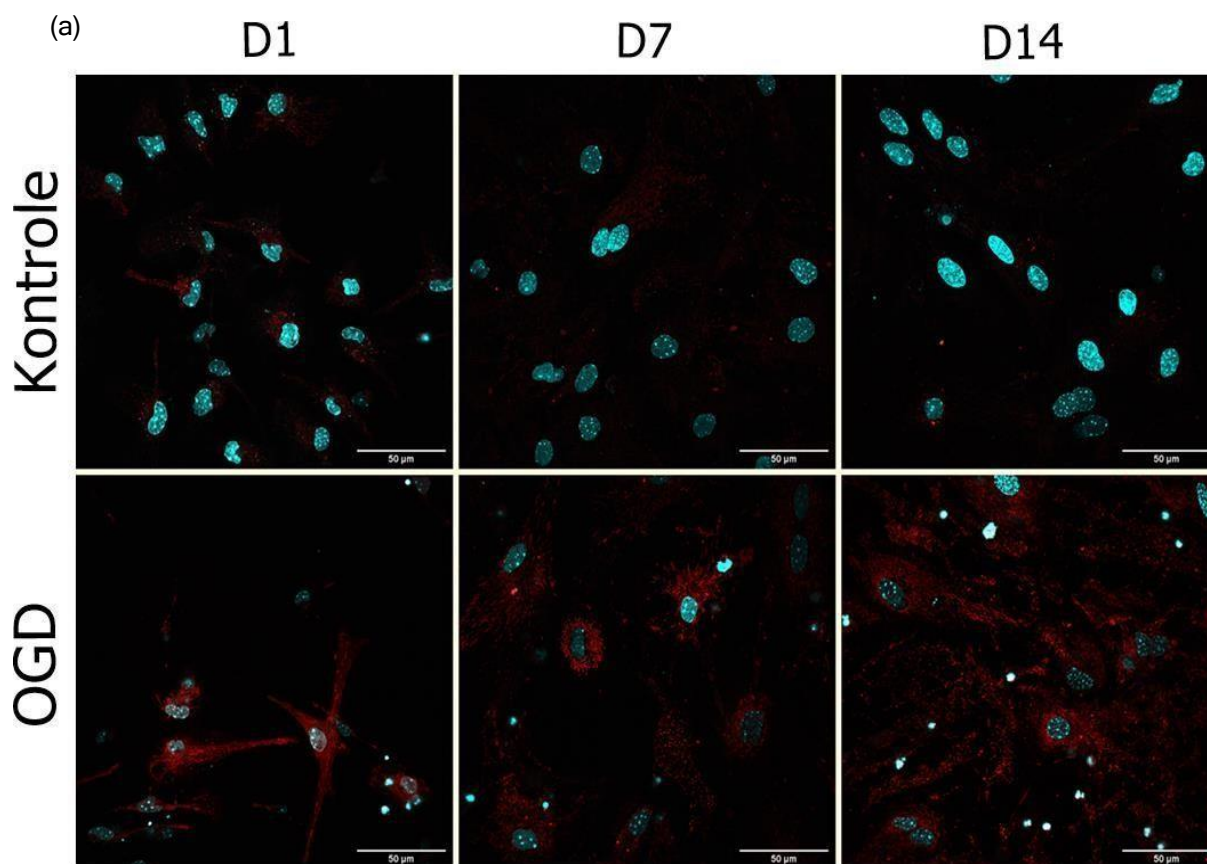
(f)



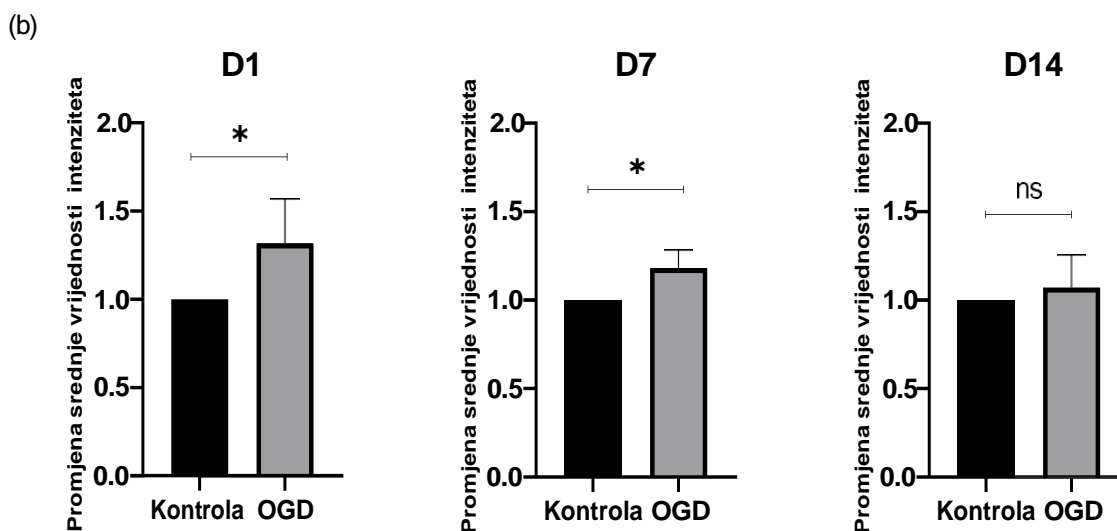
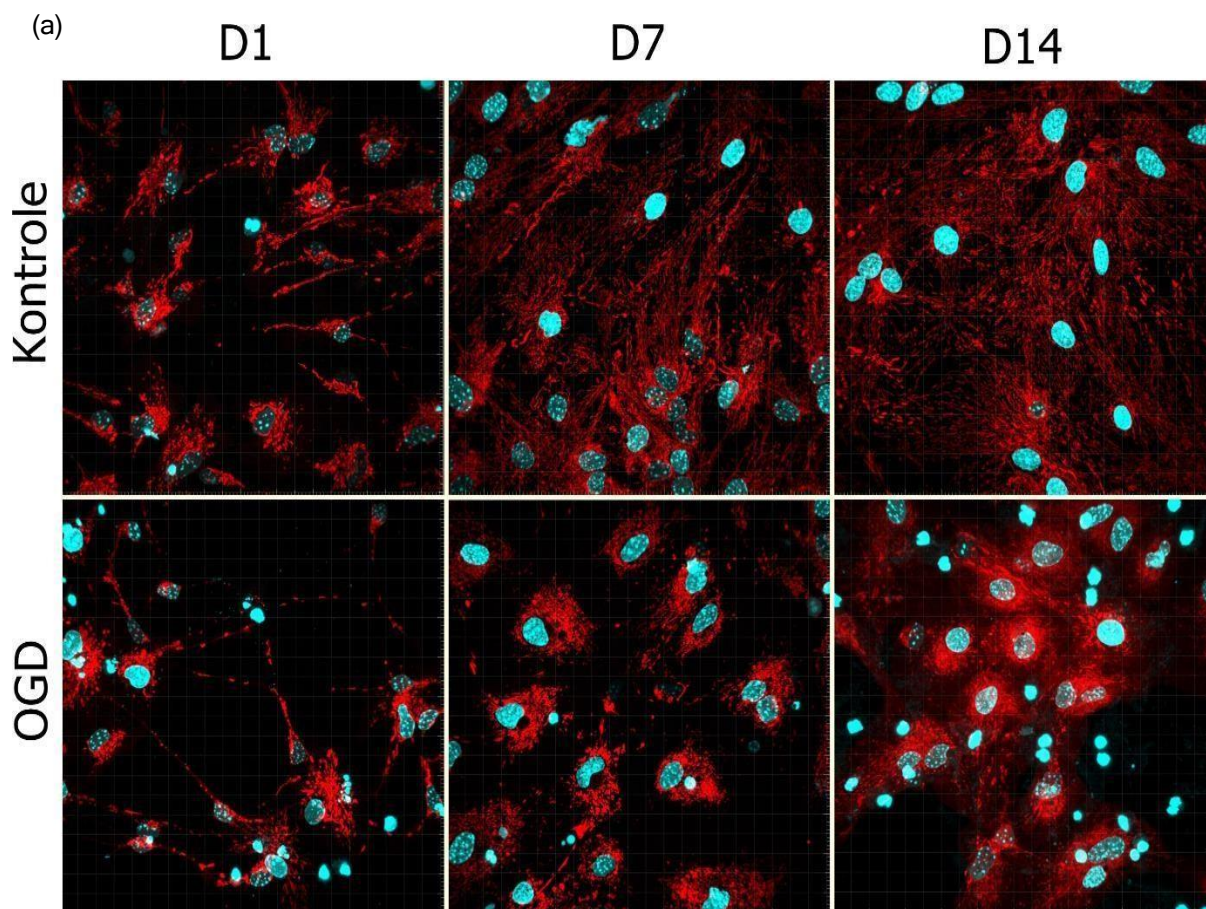
Slika 14. Analiza fuzijsko/fizijskih procesa temeljena na promjenama udjela različitih mitohondrijskih filamenata između kontrolnih (a) i OGD-om tretiranih skupina (b). Promjena udjela tubularnih (c), intermedijarnih (d), fragmentiranih (e) filamenata te povećanje sfericiteta (f) mitohondrija između kontrolnih i OGD-om tretiranih skupina.

5.4.4. Oštećenje akutnim manjkom kisika i glukoze dovodi do metaboličkih promjena mitohondrija

Nakon utvrđenog narušenog integriteta mitohondrijske morfologije nastale uslijed ishemijske ozlijede, sljedeći cilj bio je analizirati razinu mitohondrijskog stresa. Procjena mitohondrijskog metabolizma temeljila se na kvantifikaciji razine mitohondrijskih slobodnih kisikovih radikala te promjene u membranskom potencijalu mitohondrija. Rezultati sugeriraju kako je razina slobodnih kisikovih radikala, točnije superoksidnih aniona porasla u sve 3 ispitane točke u grupama tretiranim OGD oštećenjem. Statistička značajnost bila je vidljiva u danima D1 ($p = 0.020$) i D14 ($p = 0.003$) (**Slika 15 (b)**). Porast razine superoksidnih aniona bio je praćen porastom membranskog potencijala mitohondrija također u svim ispitanim točkama kod OGD-om tretiranih skupina s prisutnom statističkom značajnošću u D1 ($p = 0.042$) i D7 ($p = 0.040$) (**Slika 16 (b)**).



Slika 15. Detekcija superoksidnih aniona (crveno) mjerenih MitoSOX komercijalnim kitom (a). Slike živih stanica (jezgre stanica vidljive svijetloplavim obojenjem) dobivene su korištenjem konfokalne mikroskopije na 60x povećanju. Mjerna skala iznosi 50 μ m. Kvantifikacija srednjih vrijednosti fluorescencije dobivenih signala tretiranih skupina normaliziranih prema kontrolnim uvjetima (b).

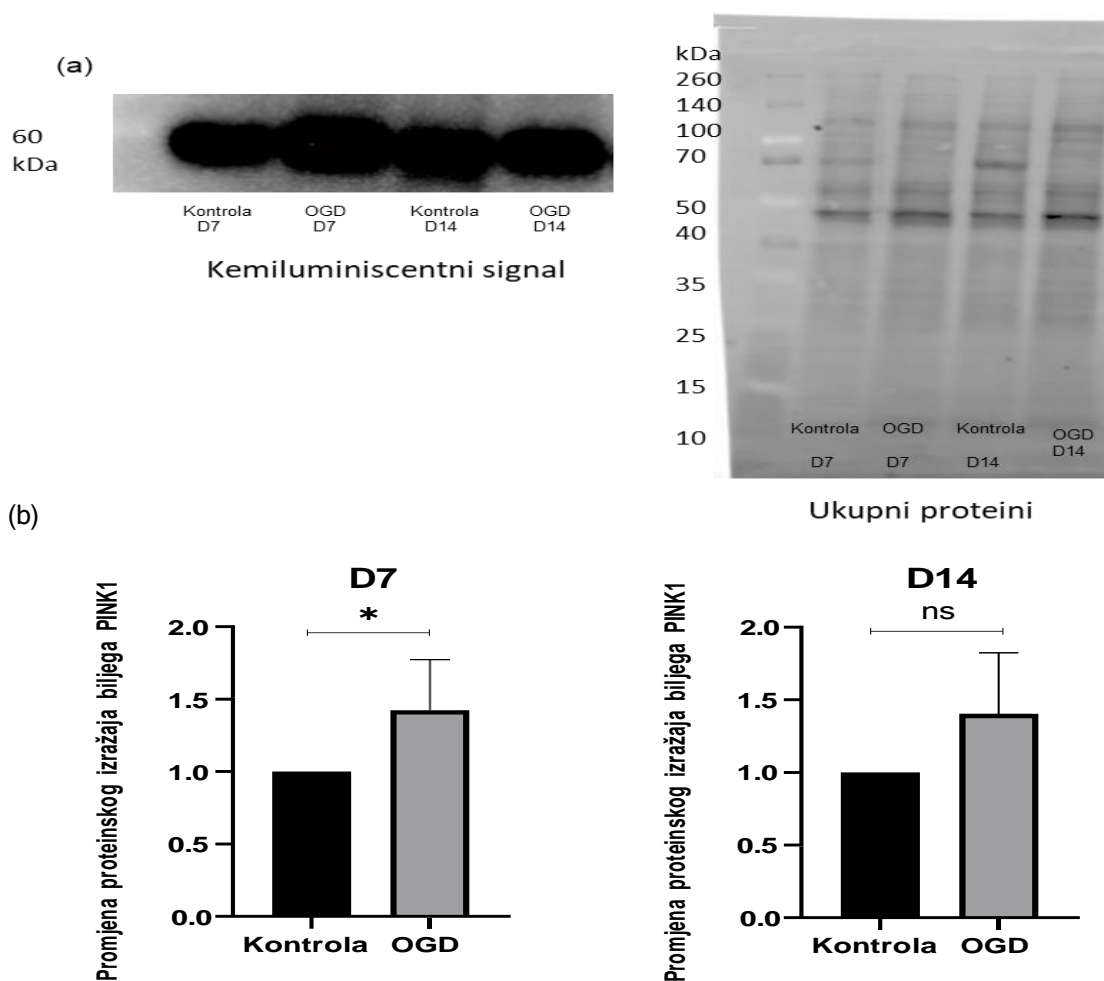


Slika 16. Detekcija membranskog potencijala mitohondrija (crveno) mjenog TMRE komercijalnim kitom (a). Slike živih stanica (jezgre stanica vidljive svijetloplavim obojenjem) dobivene su korištenjem konfokalne mikroskopije na 60x povećanju. Kvantifikacija srednjih vrijednosti fluorescencije dobivenih signala tretiranih skupina normaliziranih prema kontrolnim uvjetima (b).

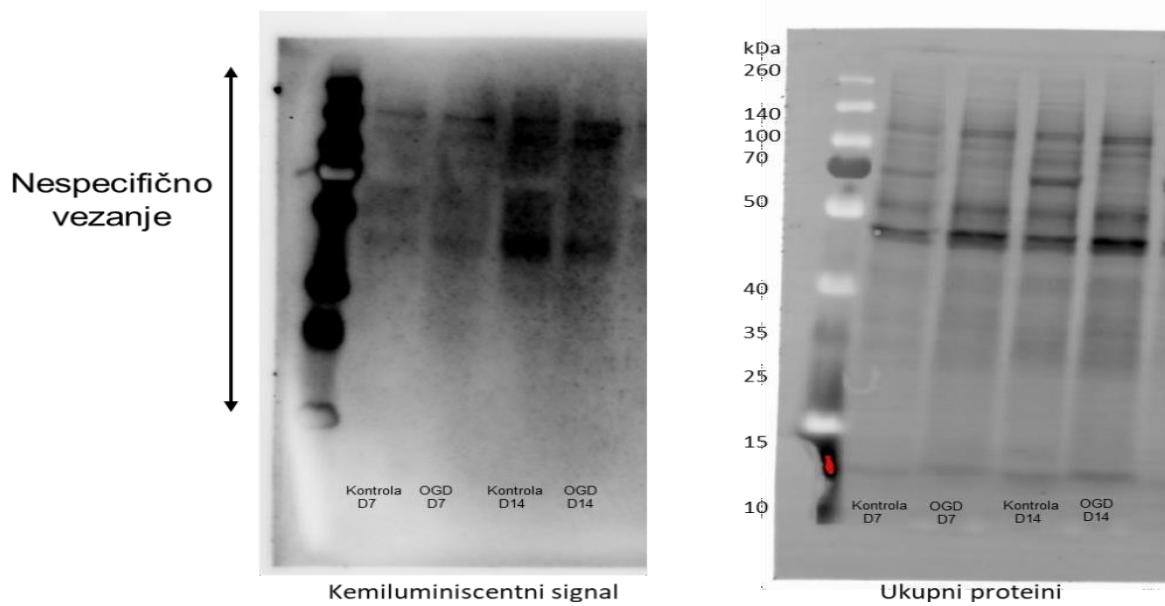
5.5. Analiza aktivnosti mitofagije

5.5.1. Analiza aktivnosti od ubikvitina ovisne mitofagije stanica zahvaćenih akutnim manjkom kisika i glukoze

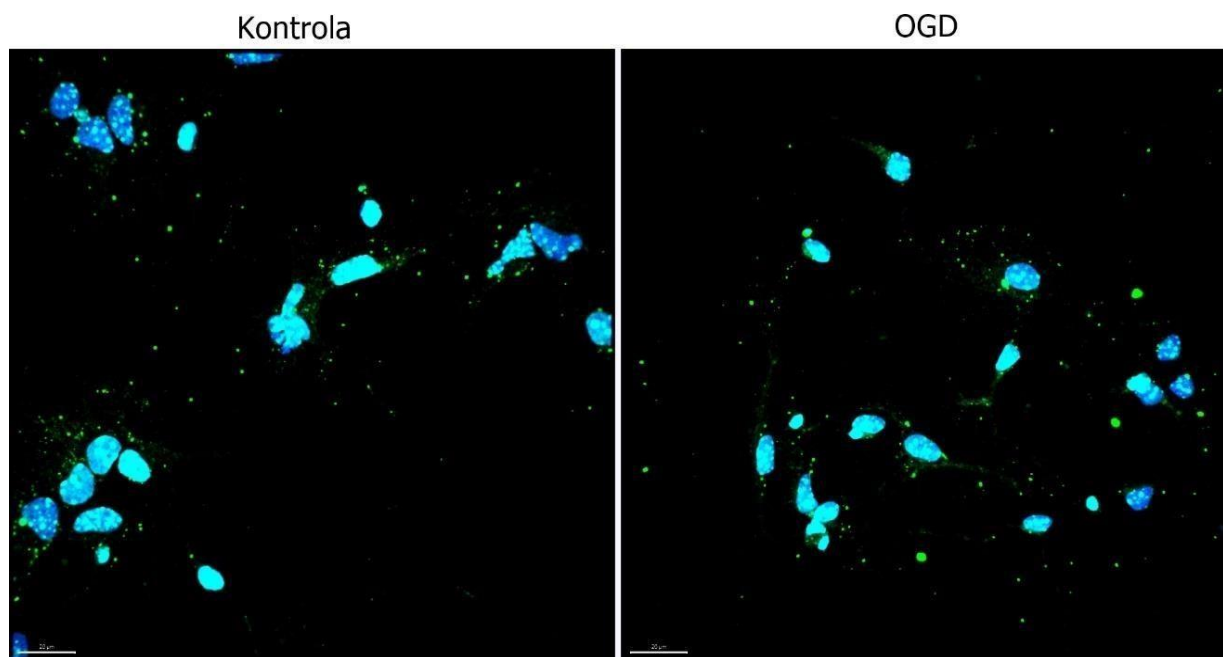
Nakon opisane povećane fragmentacije, kao i narušenog metabolizma mitohondrija, naredni pokusi bili su usmjereni na analizu aktivnosti mitofagije, oblika autofagije specifičnog za mitohondrije. Sukladno rezultatima porasta razine superoksidnih aniona, kvantificiran je i porast proteina PINK1 u oba ispitana dana uz statističku značajnu razliku vidljivu u D7 ($p = 0.045$) (**Slika 17 (b)**). Pouzdana potvrda od ubikvitina ovisne mitofagije analizom kolokalizacije proteina PINK1 i Parkina nije bila moguća zbog nespecifičnog vezanja biljega Parkina (**Slike 18 i 19**).



Slika 17. Intenzitet kemiluminiscencije, normalizacija prema ukupnim proteinima membrane (a) te kvantifikacija razlike PINK1 signala OGD-om tretiranih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu (b). Rezultati prikazani kao srednja vrijednost \pm SD.



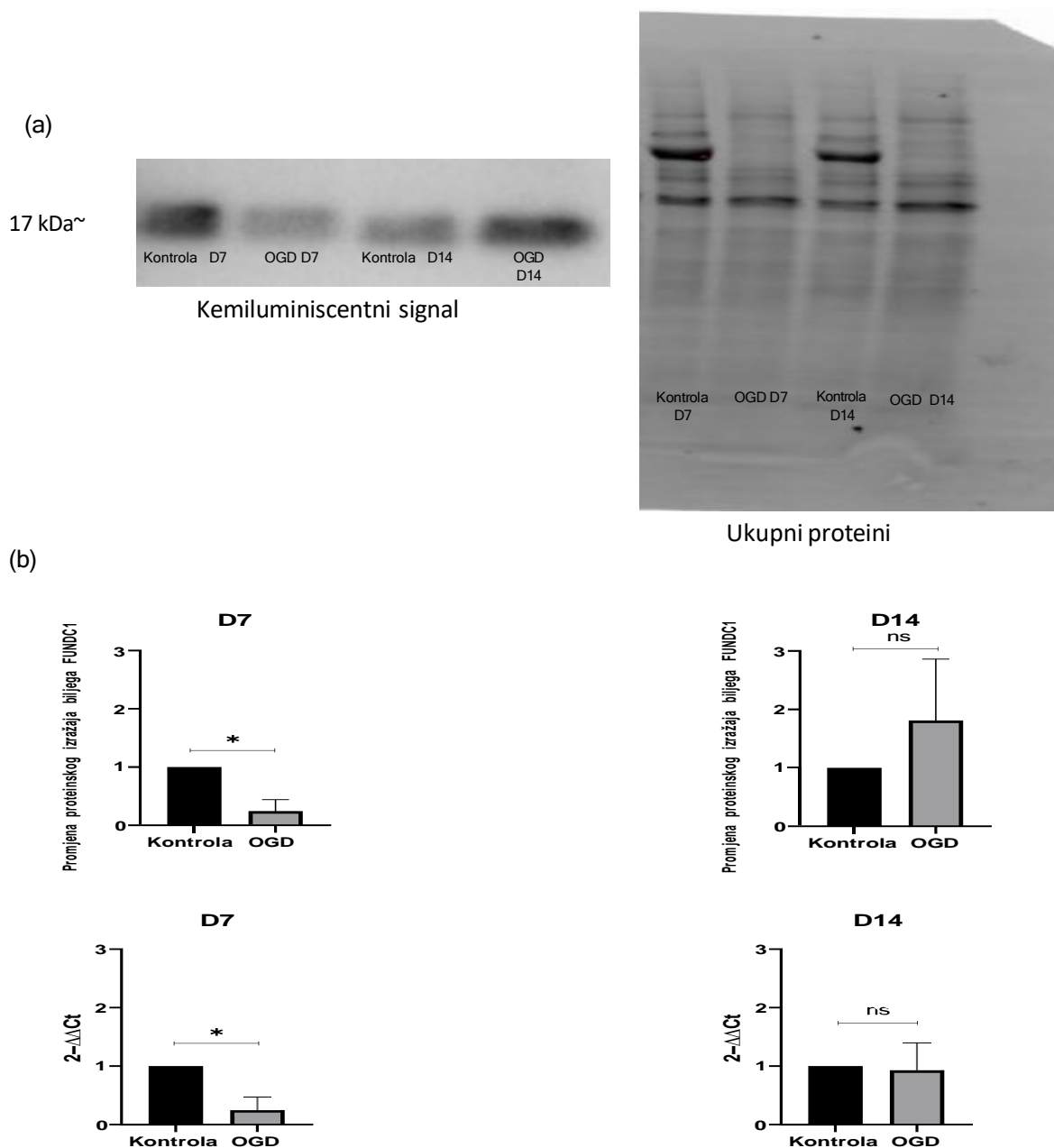
Slika 18. Intenzitet kemiluminiscencije biljega Parkina, te vizualizacija ukupnih proteina membrane. Vidljivo je nespecifično vezanje na proteinski standard s lijeve strane membrane.



Slika 19. Imunocitokemijska detekcija biljega PINK1 (tamno plavo), te Parkina (zeleno) ukazuje na nespecifično vezanje anti-Parkin protutijela gdje su vidljive nakupine signala u prostoru bez stanica (jezgre stanica obojane svijetloplavo). Slike uslikane korištenjem konfokalne mikroskopije na 60x povećanju, a mjerna skala iznosi 20 μm .

5.5.2. Akutni manjak kisika i glukoze potiče receptorima posredovanu mitofagiju sedmog dana diferencijacije stanica živčanog sustava

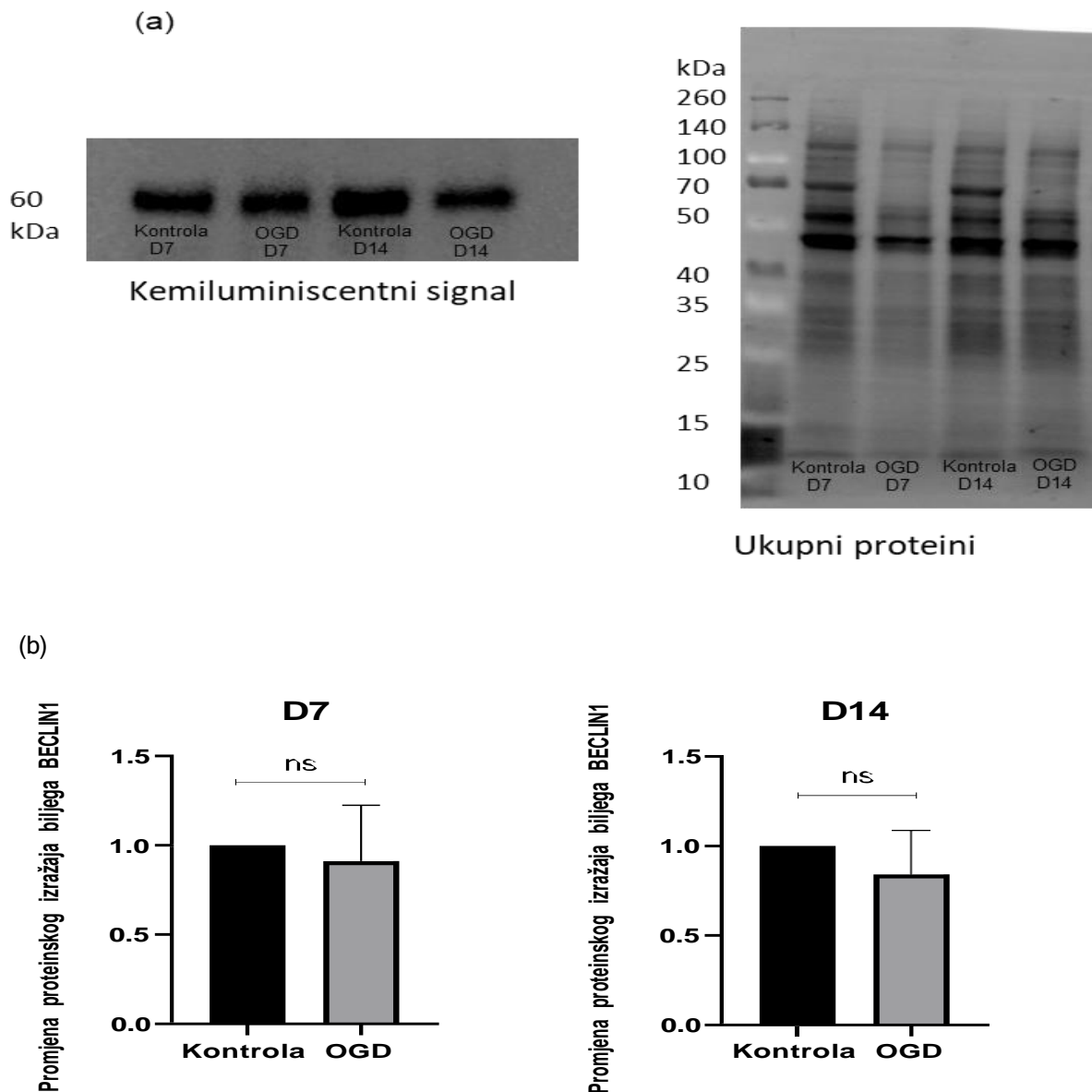
Analiza receptorima posredovane mitofagije bazirala se na kvantifikaciji proteinskog i genskog izražaja biljega vanjske membrane mitohondrija FUNDC1. Dobiveni rezultati ukazuju na statistički značajno smanjenje FUNDC1 u D7 ($p = 0.010$ za proteinski i $p = 0.013$ za genski izražaj). U D14 zabilježen je porast proteinske razine te su uočene gotovo jednake vrijednosti genskog izražaja (Slika 20 (b)).



Slika 20. Intenzitet kemiluminiscencije, normalizacija prema ukupnim proteinima membrane (a) te kvantifikacija razlike proteinskog i genskog izražaja biljega FUNDC1 OGD-om tretiranih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu (b). Rezultati pokazani kao srednja vrijednost \pm SD.

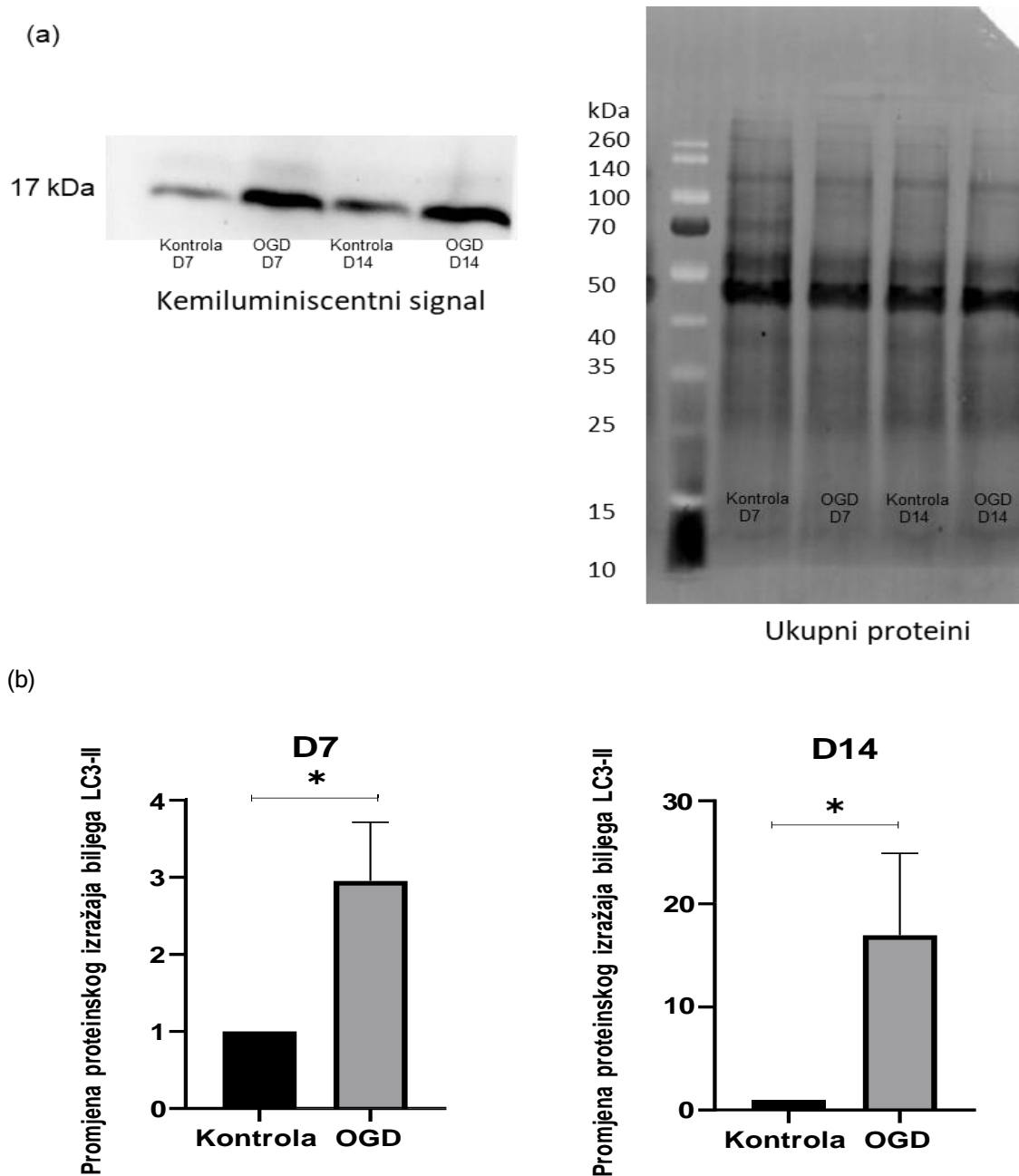
5.6. Akutni manjak kisika i glukoze povećava aktivnost autofagije nezrelih stanica živčanog sustava

Nakon utvrđene povišene aktivnosti mitofagije istraživala se i generalna razina autofagije. U tu svrhu kvantificirani su proteinski izražaji najčešće korištenih biljega autofagije; BECLIN1, LC3-II te p62. Analiza BECLIN1 nije pokazala statistički značajnu razliku između grupa (Slika 21 (b)).

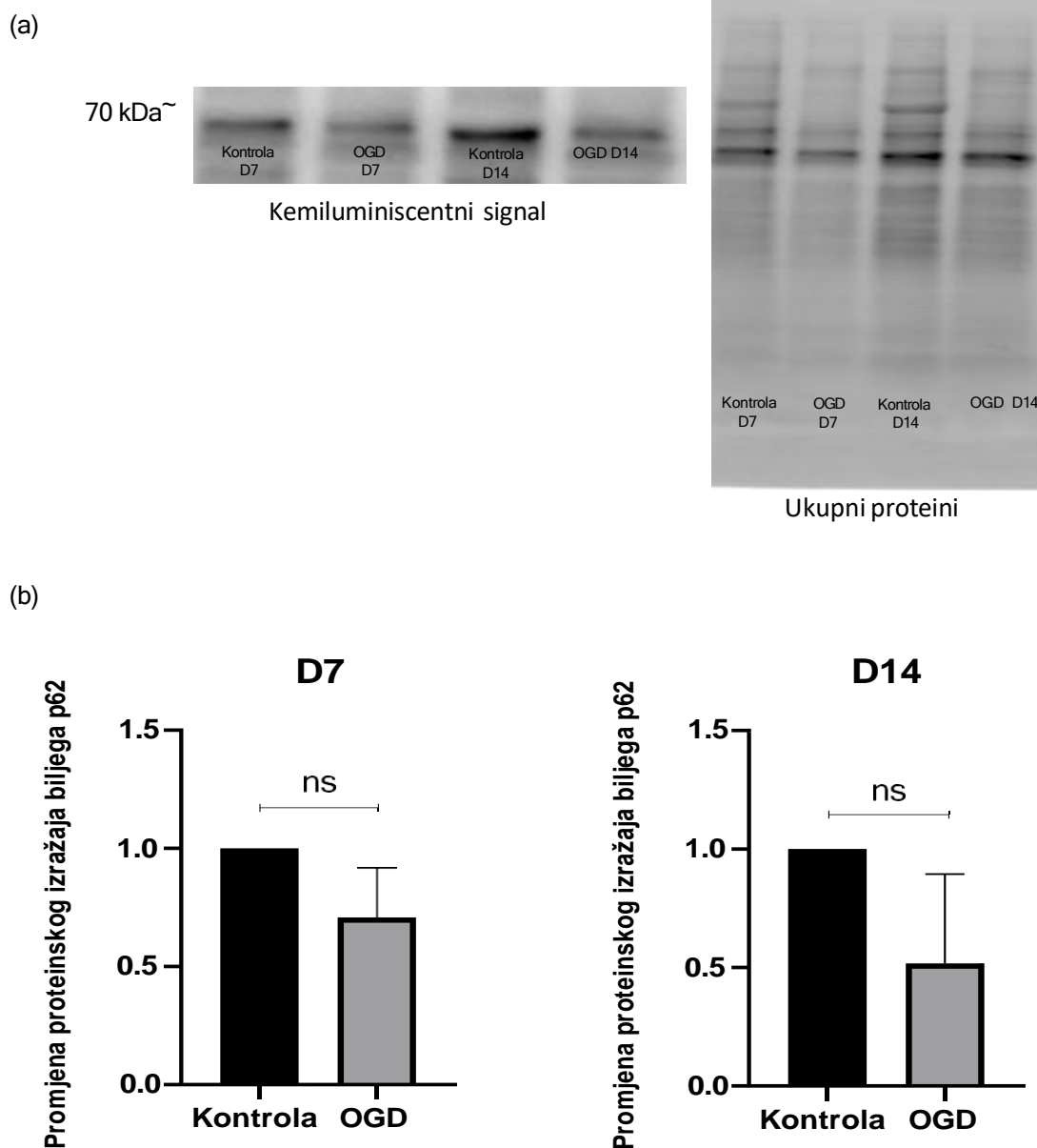


Slika 21. Intenzitet kemiluminiscencije, normalizacija prema ukupnim proteinima membrane (a) te kvantifikacija razlike proteinskog izražaja biljega BECLIN1 OGD-om tretiranih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu (b). Rezultati pokazani kao srednja vrijednost \pm SD.

Rezultati kvantifikacije LC3-II ukazuju na statistički značajan porast u OGD-om tretiranim skupinama oba istraživana dana (u D7 $p = 0.023$, a u D14 $p = 0.014$) (Slika 22 (b)). Suprotno, proteinski izražaj biljega p62 pokazao je statistički beznačajan pad (Slika 23 (b)).



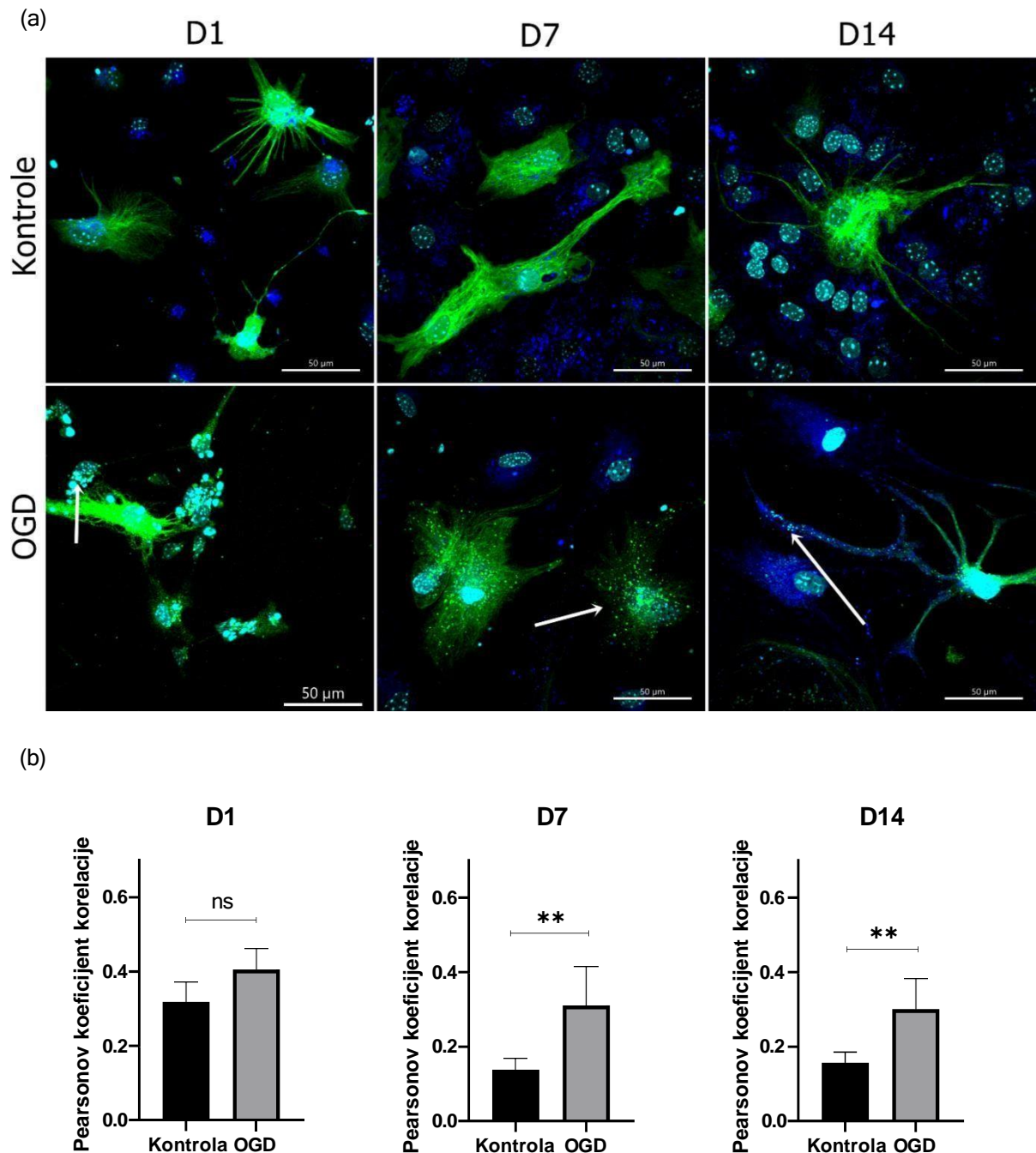
Slika 22. Intenzitet kemiluminiscencije, normalizacija prema ukupnim proteinima membrane (a) te kvantifikacija razlike proteinskih izražaja biljega LC3-II OGD-om tretiranih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu (b). Rezultati pokazani kao srednja vrijednost \pm SD.



Slika 23. Intenzitet kemiluminiscencije, normalizacija prema ukupnim proteinima membrane (a) te kvantifikacija razlike proteinskih izražaja biljega p62 OGD-om tretiranih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu (b). Rezultati pokazani kao srednja vrijednost \pm SD.

Usljed činjenice da porast izražaja biljega LC3-II može ujedno ukazivati na pojačano stvaranje autofagosoma kao i na poremećaj njegove degradacije, za potvrdu aktivnosti autofagije mjerila se kolokalizacija između autofagosoma i lizosoma. U označavanju autofagosoma se koristila tehnologija stabilne transdukcije stanica BacMam virusom čime je omogućena produkcija proteinskog konstrukta LC3B-GFP. Lizosomi su bili označeni korištenjem komercijalno dostupnog kita za praćenje lizosoma- Lysotracker-a. Dobiveni rezultati ukazuju na povišenu

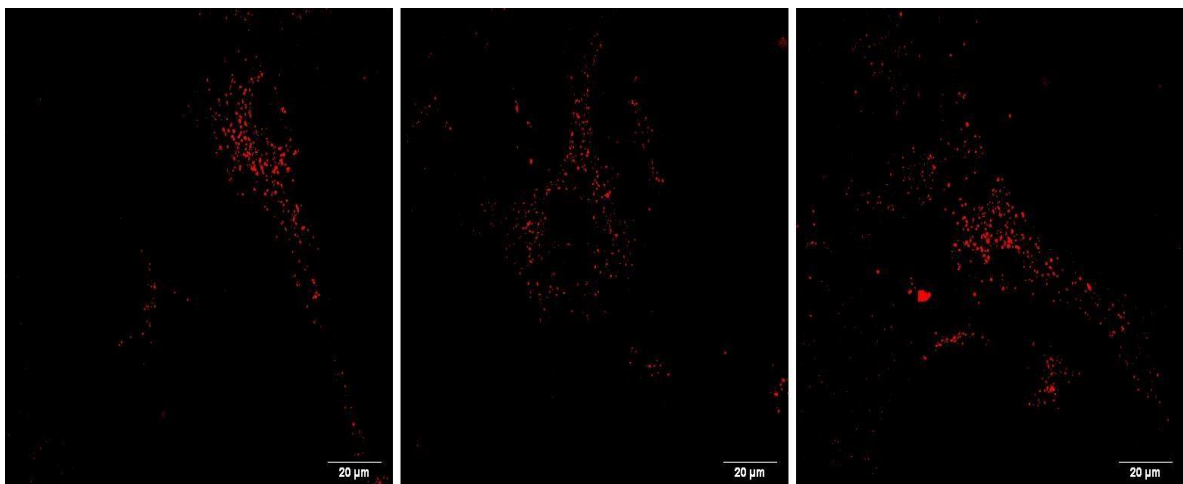
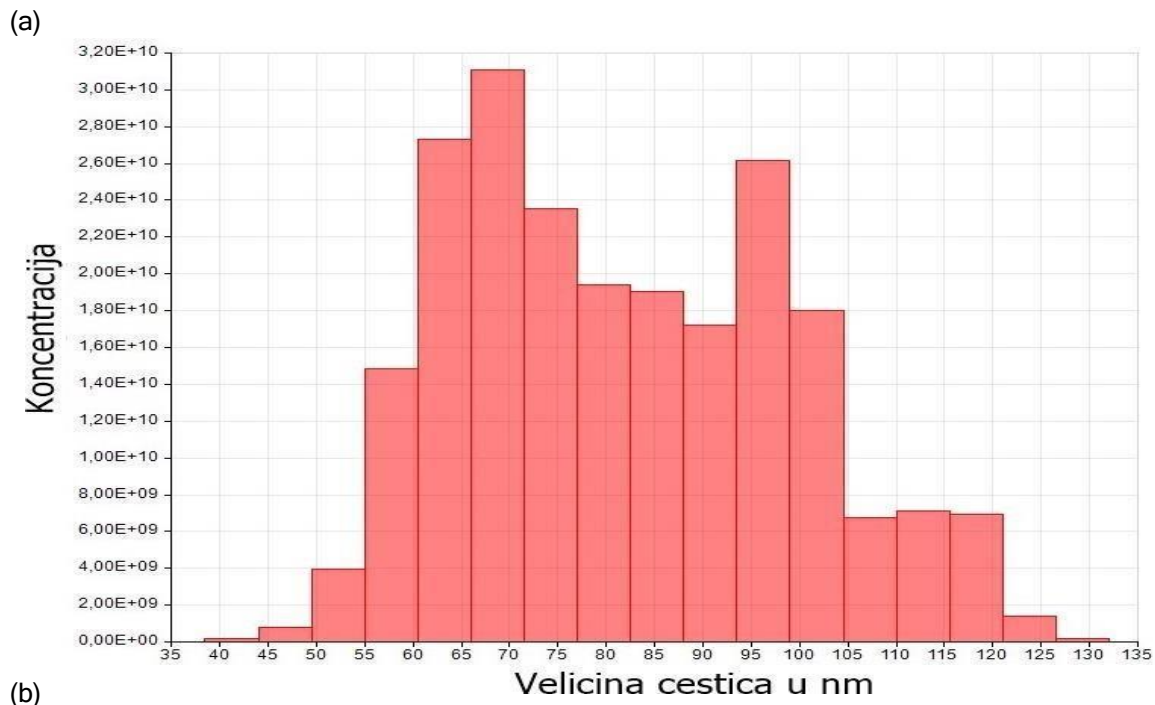
kolokalizaciju autofagosoma sa lizosomima OGD-om tretiranih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu s statističkom značajnošću vidljivom u D7 i D14 (Slika 24 (b)). Kombiniran porast razine LC3-II te pad p62 ukazuje na pojačanu aktivnost autofagije u OGD-om tretiranim skupinama sa statističkom značajnošću prisutnom u D7 ($p = 0.008$) i D14 ($p = 0.002$)



Slika 24. Kolokalizacija autofagosoma (zeleno) i lizosoma (tamno plavo) detektirana u živim stanicama (jezgre stanica obojane svijetloplavo) korištenjem konfokalnog mikroskopa na 60x povećanju (a). Mjerna skala iznosi 50 μ m. Rezultati kolokalizacije su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD Pearsonova koeficijenta korelacije između kontrolnih skupina i OGD-om tretiranih skupine.

5.7. Kvantifikacija i vizualizacija izoliranih egzosoma

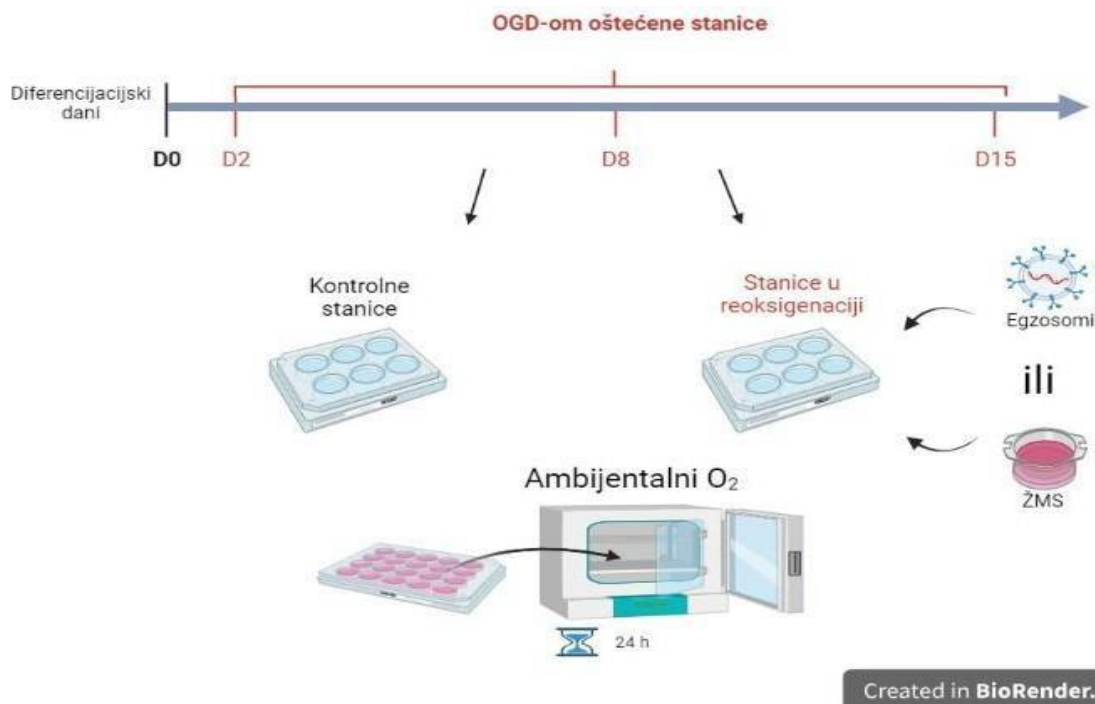
Izolirane egzosome smo sukladno protokolu opisanom u poglavlju 4.4. kvantificirali korištenjem uređaja qNANO. Analizom rezultata otkriveno je kako je većina izoliranih čestica veličine između 60 i 100 nm što odgovara njihovoj prosječnoj veličini (Slika 25 (a)) (85). Kako bi se potvrdila njihova prisutnost u stanicama, bojali su se korištenjem komercijalno dostupne boje PKH26 sukladno protokolu opisanom u poglavlju 4.4.1. (Slika 25 (b)).



Slika 25. Kvantifikacija (a) i detekcija (b) egzosoma izoliranih iz staničnog medija ŽMS-a. Mjerna skala iznosi 20μm.

5.8. Utjecaj živčanih matičnih stanica i egzosoma na ishemijsko reperfuzijsku ozljedu stanica živčanog sustava u diferencijaciji

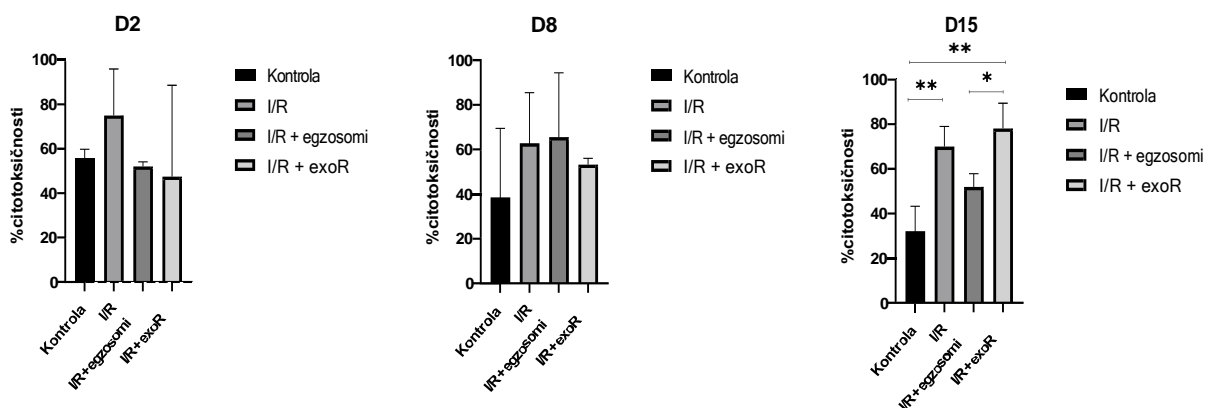
S ciljem analize utjecaja reoksigenacije, kao i mogućeg blagotvornog učinka tretmana ŽMS-ima i egzosomima, po završetku ishemijske ozljede, kontrolnim i OGD-om oštećenim stanicama dodan je svježe pripremljeni medij za diferencijaciju, nakon čega su one izložene utjecaju ambijentalnog kisika. Dodatno, OGD-om oštećene skupine su u danima D2, D8 i D15 bile izložene tretmanu ŽMS-ima i egzosomima te raspoređene u skupine kako je opisano u poglavlju 4.2.5. Skupine pod nazivom I/R + ŽMS te I/R + egzosomi predstavljaju skupine u kojima su OGD-om oštećene stanice bile tretirane dodanim matičnim stanicama pohranjenim u mediju za proliferaciju ili izoliranim egzosomima otopljenim u otopini ExoR. Skupine označene kao I/R + medij i I/R + ExoR su skupine u kojima su se oštećene stanice tretirale samo staničnim medijem za proliferaciju i otopinom za izolaciju egzosoma te su korištene kao kontrolne skupine. Za razliku od egzosoma koji su dodani direktno u medij za diferencijaciju stanica, tretman ŽMS-ima temeljio se na njihovom nasađivanju u stanične inserte te ko-kulturi s oštećenim stanicama ispod njih (Slika 26).



Slika 26. Shematski prikaz izazivanja reoksigenacijske ozljede i tretman ŽMS-ima i njihovim egzosomima. Stanicama se nakon OGD-om inducirane ozljede u trajanju od 24 h promijenio medij te su vraćene u uvjete ambijentalnog kisika gdje se u trajanju od novih 24 h istraživao utjecaj reoksigenacije te tretmana ŽMS-ima ili njihovim izoliranim egzosomima. Slika izrađena u programu BioRender.com

5.8.1. Tretman egzozomima smanjuje citotoksičnost stanica izloženih ishemijsko reperfuzijskoj ozljedi petnaestog dana diferencijacije

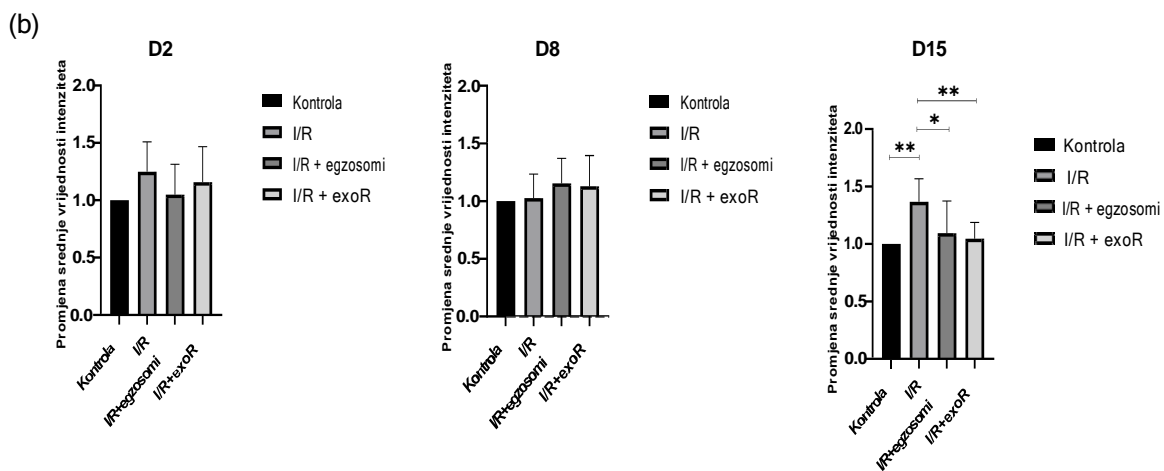
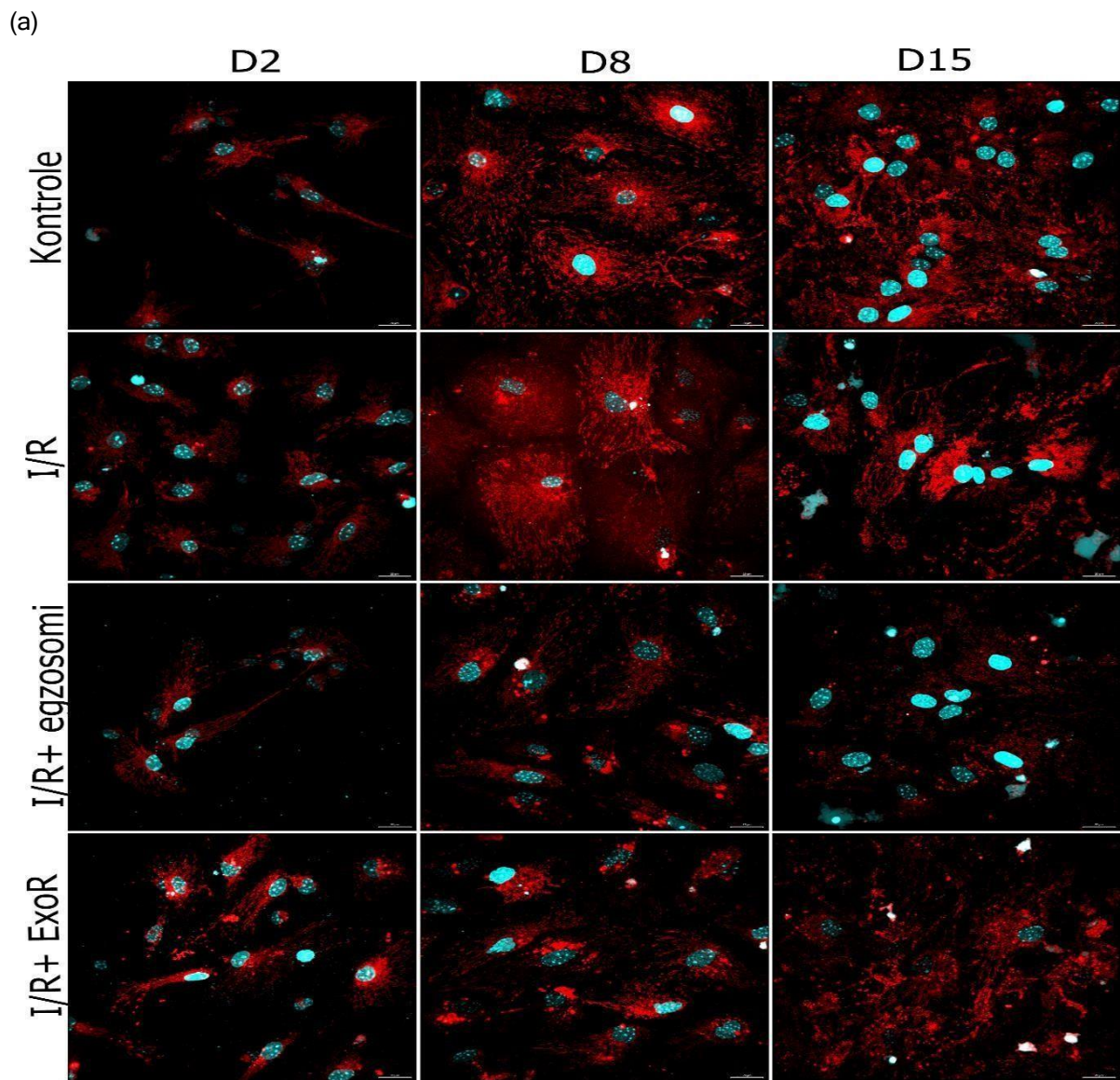
Nakon dokazane citotoksičnosti OGD modela, sljedeći cilj bio je ispitati utjecaj reoksigenacije (I/R) u trajanju od 24 h te mogući blagotvorni učinak egzozoma izoliranih iz ŽMS-a. Uslijed činjenice da se citotoksičnost mjerila otpuštanjem LDH iz stanica nasadenih u pločice s 96 bunarića, procjena direktnog učinka ŽMS-a nije bila moguća. Dobiveni rezultati pokazuju kako usporedno s kontrolnom skupinom, reoksigenacija dodatno povećava staničnu citotoksičnost koja ovisno o diferencijacijskom danu varira između 20 i 40%. Statistička značajnost detektirana je samo u D15 (između kontrolne skupine i skupine tretirane I/R-om $p = 0.004$, između kontrolne i skupine I/R + exoR $p = 0.0004$ te između skupine I/R + egzozomi i skupine I/R + exoR $p = 0.020$). U skupinama tretiranim s egzozomima vidljivo je smanjenje citotoksičnosti od 20% u odnosu na I/R-om tretiranu skupinu u D2 i D15 bez statističke značajnosti. Iako je u D2 vidljivo smanjenje postotka stanične citotoksičnosti od 20% u I/R + egzozomi tretiranoj skupini, još veće smanjenje uočeno je u skupini tretiranoj s otopinom ExoR čime se isključuje učinak egzozoma. Suprotno, u D15 postoji statistička značajna razlika u postotku citotoksičnosti između skupina tretiranih egzozomima i ExoR otopinom što dovodi do zaključka kako egzozomi direktno utječu na smanjenje stanične citotoksičnosti spomenutog dana diferencijacije (Slika 27).



Slika 27. Učinak reoksigenacije i tretmana egzozomima na postotak stanične citotoksičnosti. Rezultati prikazani kao srednja vrijednost % citotoksičnosti \pm SD.

5.8.2 Egzosomi uzrokuju smanjenje razine superoksidnih aniona u I/R-om oštećenih stanica drugog dana diferencijacije

Nakon potvrde povećane stanične citotoksičnosti u reoksigenaciji, kao i djelomičnog blagotvornog učinka egzosoma istraživalo se dolazi li do metaboličkih promjena u mitohondrijima I/R-om tretiranih skupina te mogu li egzosomi smanjiti razinu njihova oksidativnog stresa. Ponovno, zbog korištenja posebnih Petrijevih zdjelica sa staklenim dnom, kao i činjenice da se provodila analiza živih stanica, direktan tretman ŽMS-ma nije bio moguć. Dobiveni rezultati ukazuju na dodatno povećanje količine superoksidnih aniona u I/R-om tretiranih skupina svih ispitanih dana diferencijacije sa statističkom značajnošću prisutnom u D15 ($p = 0.003$). Skupine tretirane egzosomima usporedno s I/R-om tretiranih skupina ukazuju na povećanje razine superoksidnih aniona u D8 te njihovo smanjenje u D2 i D15, s uočenom statističkom značajnošću D15 ($p = 0.013$). S obzirom na to da je u D15 još veće smanjenje razine superoksidnih aniona vidljivo u skupini tretiranoj otopinom ExoR isključuje se direktan blagotvoran učinak egzosoma u toj ispitanoj točki ($p = 0.005$) (**Slika 28 (b)**).

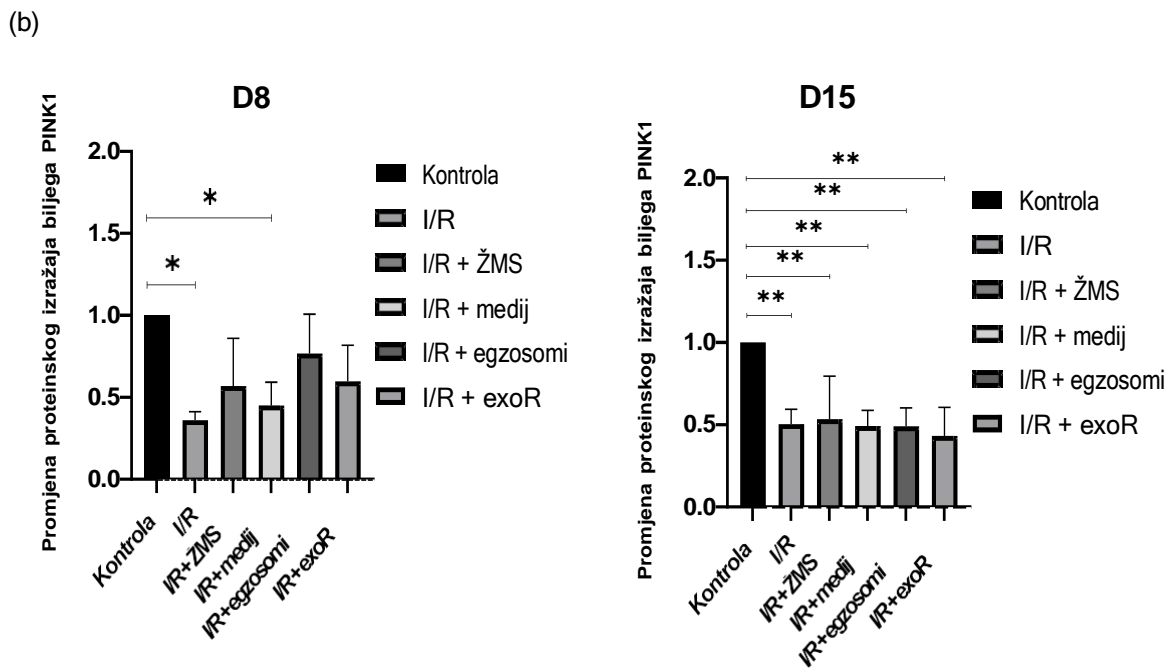
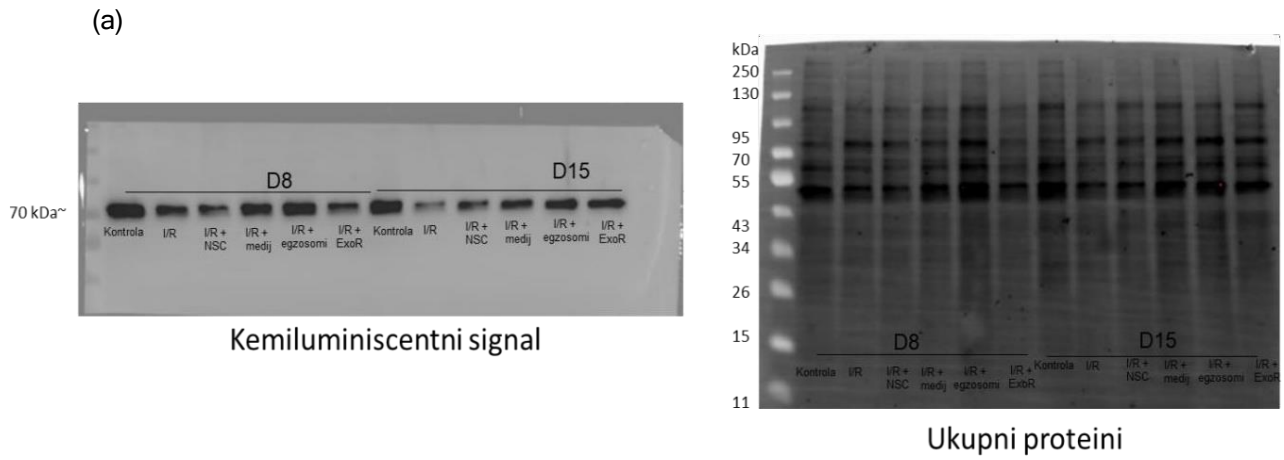


Slika 28. Detekcija mitohondrijskih superoksidnih aniona (crveno) mjenjenih MitoSOX komercijalnim kitom (a). Slike živih stanica (jezgre stanica obojane svijetloplavo) dobivene su korištenjem 60x povećanja na konfokalnom mikroskopu. Mjerna skala iznosi 20 μ m. Kvantifikacija srednjih vrijednosti fluorescencijom dobivenih signala tretiranih skupina normaliziranih prema kontrolnim uvjetima (b).

5.9. Analiza mitofagije

5.9.1. Analiza od ubikvitina ovisne mitofagije na stanice oštećene ishemijsko reperfuzijskom ozljedom nakon tretmana živčanim matičnim stanicama i egzosomima

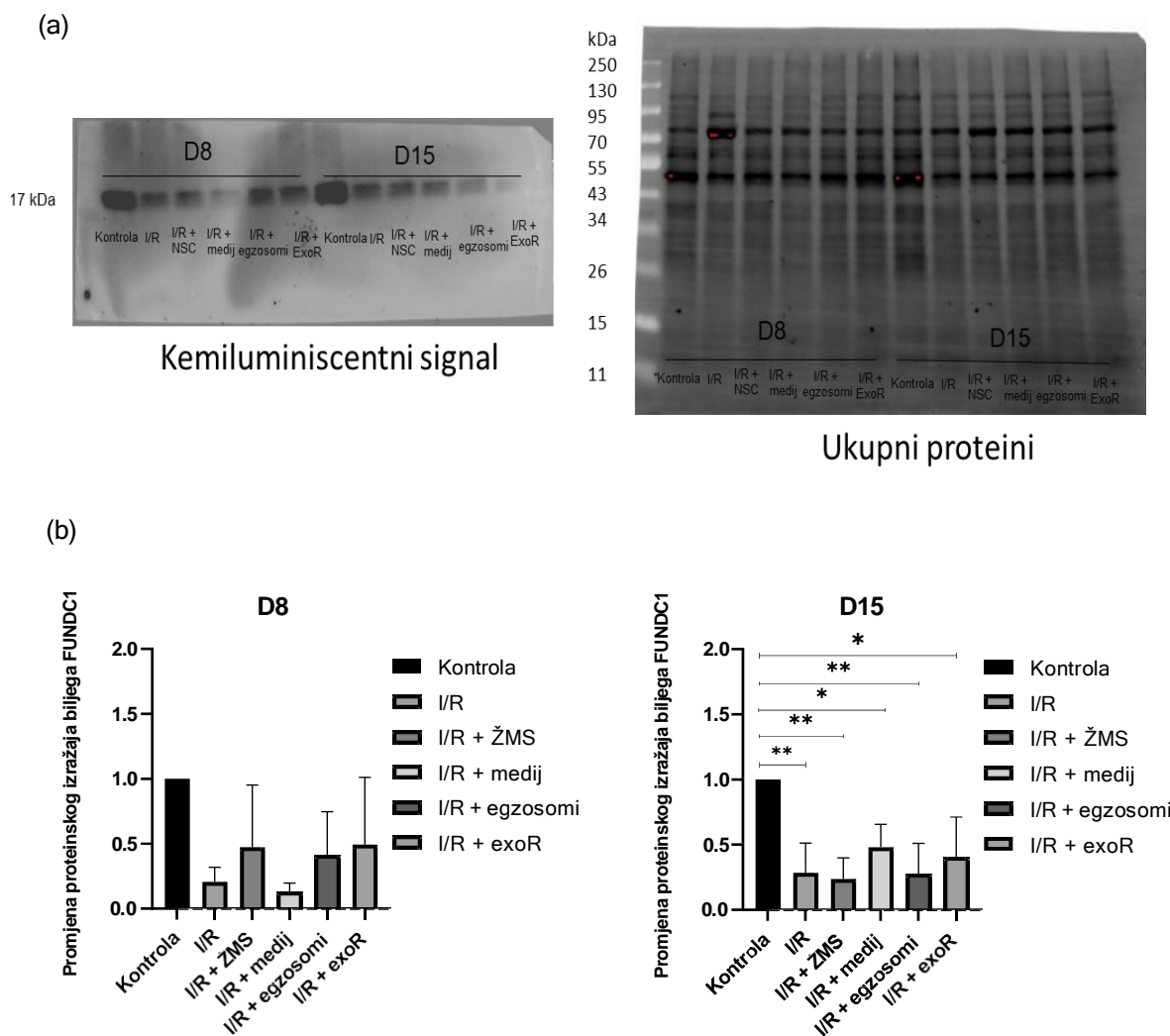
Procjena od ubikvitina ovisne mitofagije temeljila se na kvantifikaciji proteinskog izražaja biljega PINK1. Dobiveni rezultati u D8 pokazuju statistički značajno smanjen izražaj proteina PINK1 u I/R-om tretiranoj skupini ($p = 0.020$) i skupini tretiranoj s I/R + medij ($p = 0.029$) usporedno s kontrolnom skupinom. U odnosu na I/R-om tretiranu skupinu vidljiv je dvostruko veći porast proteinskog izražaja biljega PINK1 u skupinama tretiranim s ŽMS-ma i egzosomima ali bez statistički značajne razlike. Usporedno s kontrolnom skupinom, D15 karakterizira statistički značajan pad izražaja proteina PINK1 u svim ostalim tretiranim skupinama bez značajne razlike među njima (**Slika 29 (b)**). Ovime možemo zaključiti kako ishemijsko reperfuzijska ozljeda smanjuje aktivnost od ubikvitina ovisne mitofagije u oba ispitana dana usporedno s kontrolnim uvjetima. Usporedno s I/R-om tretirane skupine, u D8 je vidljivo kako tretmani ŽMS-ma i izoliranim egzosomima potiču aktivnost od ubikvitina ovisne mitofagije.



Slika 29. Intenzitet kemiluminiscencije, normalizacija prema ukupnim proteinima membrane (a) te kvantifikacija razlike proteinskih izražaja biljega PINK1 različitih uvjeta u odnosu na kontrolnu skupinu (b). Rezultati su pokazani kao srednja vrijednost \pm SD.

5.9.2. Tretman živčanim matičnim stanicama povećava receptorima posredovanu mitofagiju u stanicama oštećenim ishemijsko reperfuzijskom ozljedom osmog dana diferencijacije

Aktivnost receptorima posredovane mitofagije analizirala se korištenjem biljega FUNDC1. U oba ispitana dana je usporedno s kontrolnom skupinom uočen pad proteinskog izražaja biljega FUNDC1 u svim ispitanim skupinama sa statističkom značajnošću prisutnom u D15. Zanimljivo, u D8, u skupinama tretiranim ŽMS-ma i egzosomima, usporedno s I/R-om tretirane skupine, detektiran je 2.5 puta veći izražaj spomenutog biljega. Usporedno s skupinom tretiranom ŽMS-ma, u skupini I/R + medij zabilježen je suprotan učinak što potvrđuje kako matične stanice direktno utječu na porast razine biljega FUNDC1. Sličan učinak nije primijećen između skupina tretiranih egzosomima i otopinom ExoR. Između I/R-om tretirane skupine i skupine tretirane s I/R + ŽMS u D15 uočeno je blago smanjenje proteinskog izražaja dok se u skupini I/R + egzosomi učinak bitnije ne razlikuje (**Slika 30 (b)**). Ovime možemo zaključiti kako ishemijsko reperfuzijska ozljeda usporedno s kontrolnom skupinom stimulira receptorima posredovanu mitofagiju u oba promatrana dana. U D8, usporedno s I/R-om tretirane skupine, tretman ŽMS-ma vjerojatno dodatno potiče fragmentaciju mitohondrija koji se zatim ponovno degradiraju procesom mitofagije.

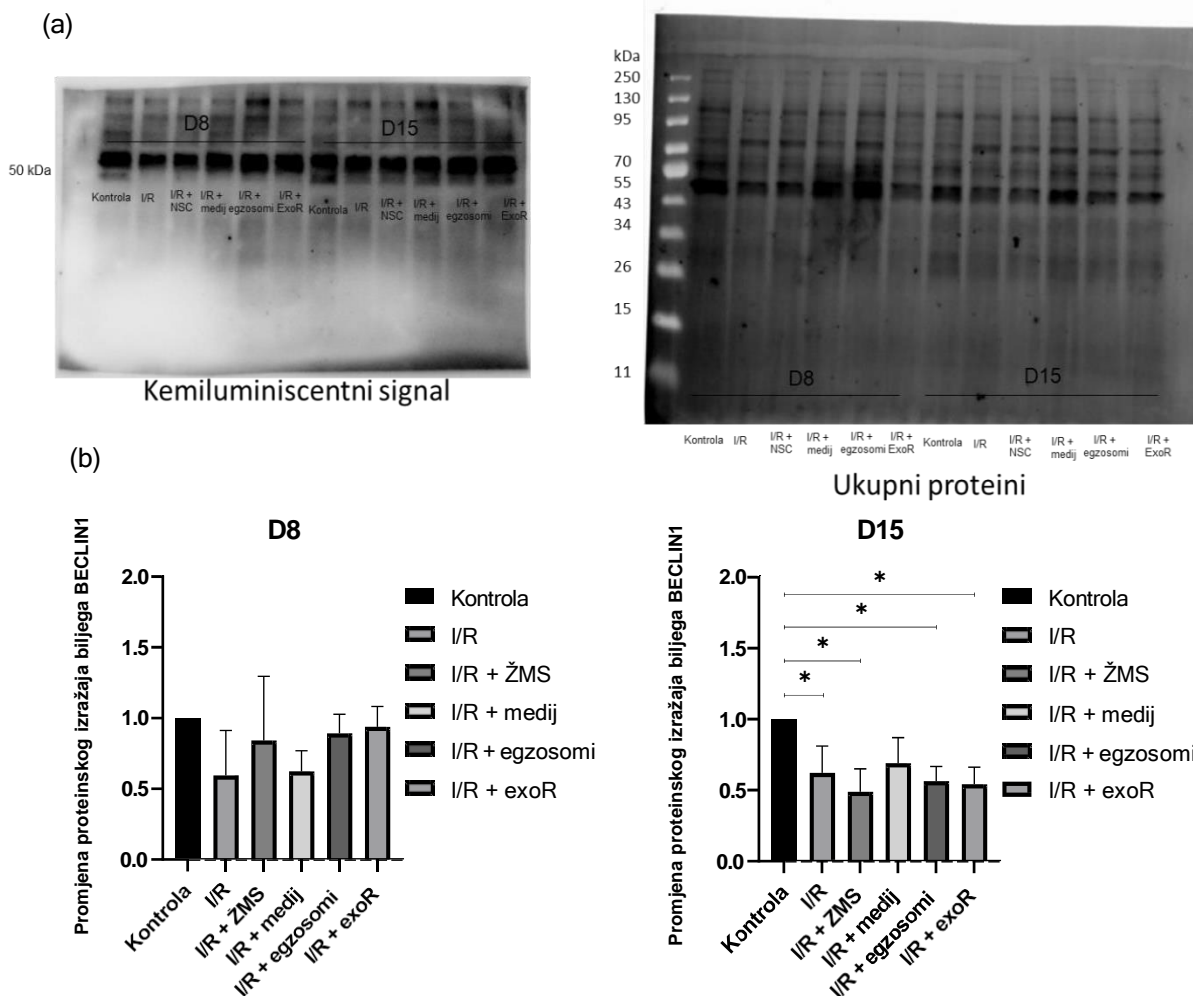


Slika 30. Intenzitet kemiluminiscencije, normalizacija prema ukupnim proteinima membrane (a) te kvantifikacija razlike proteinskih izražaja biljega FUNDC1 različitih uvjeta u odnosu na kontrolnu skupinu (b). Rezultati su pokazani kao srednja vrijednost \pm SD.

5.10. Tretman živčanim matičnim stanicama i egzosomima djelomično utječe na aktivnost autofagije u stanicama oštećenima ishemijsko reperfuzijskom ozljedom

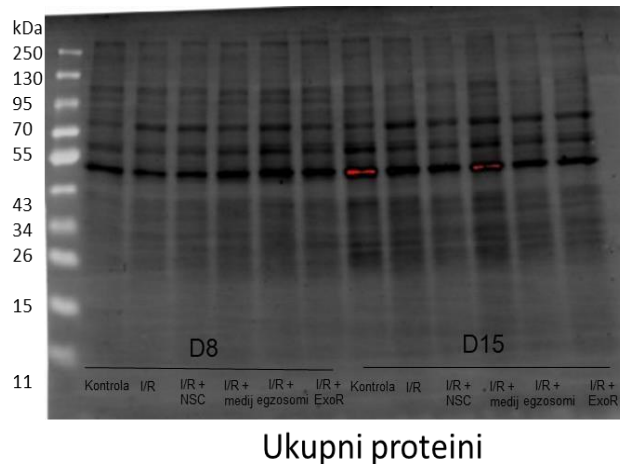
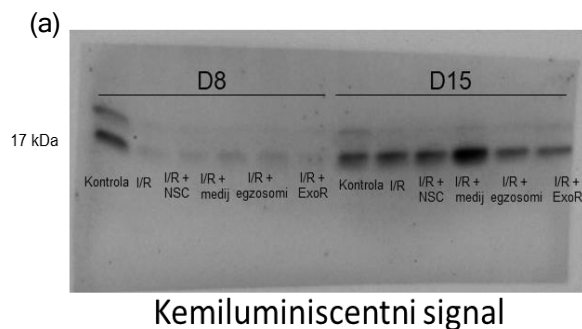
Nakon dokazane povišene aktivnosti autofagije u OGD-om tretiranim skupinama, koristeći iste proteinske biljege istraživali smo utječu li reoksigenacija te tretmani ŽMS-ma i egzosomima na njenu aktivnost. Razina proteinskog izražaja BECLIN1 bilježi pad u svim ispitanim skupinama u D8 i D15 u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistička značajnost vidljiva je u D15 kod svih ispitanih skupina izuzev skupine tretirane I/R + medij. Kada se uspoređuju rezultati skupina tretiranih I/R-om s tretmanima ŽMS-ma može se uočiti porast proteinskog izražaja BECLIN1 u D8 te njegov pad u D15. Učinak ŽMS-a oba ispitana dana neovisan je o učinku medija. Također, usprkos činjenici da tretman egzosomima povećava izražaj istraživanog

biljega u D8, gotovo jednake vrijednosti prisutne su i u skupini tretiranoj otopinom ExoR. Utjecaj egzosoma nije vidljiv u D15 (Slika 31 (b)).

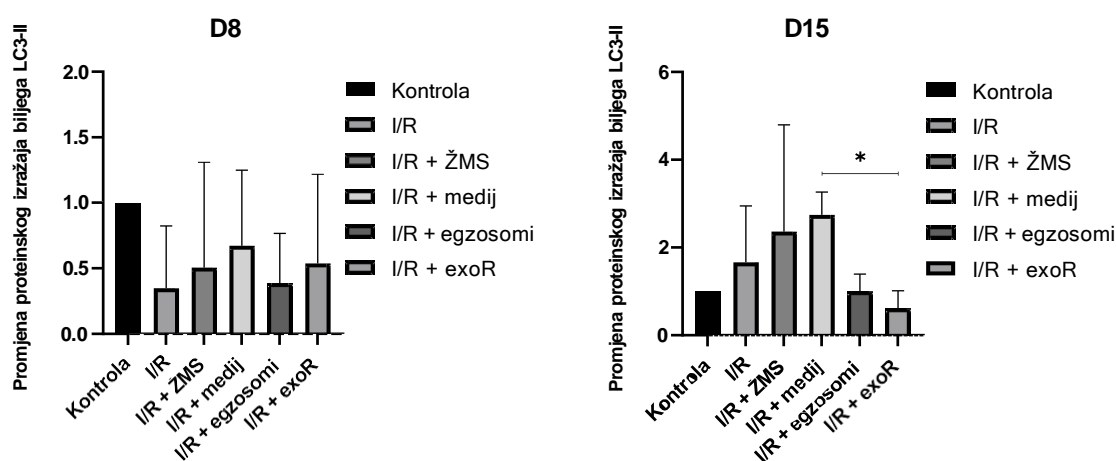


Slika 31. Intenzitet kemiluminiscencije, normalizacija prema ukupnim proteinima membrane (a) te kvantifikacija razlike proteinskih izražaja biljega BECLIN1 različitih uvjeta u odnosu na kontrolnu skupinu (b). Rezultati su pokazani kao srednja vrijednost \pm SD.

Analizirajući proteinski izražaj biljega LC3-II vidljivo je kako je kvantificiran njegov pad u svim tretiranim skupinama u D8 u odnosu na kontrolnu. Također, u odnosu na I/R-om tretiranu skupinu, tretman ŽMS-ma povećava izražaj spomenutog biljega, dok tretman egzosomima nije rezultirao promjenom izražaja. Pošto je još veći porast detektiran u I/R + medij tretiranoj skupini isključuje se izravan učinak ŽMS-a. Suprotno, u D15 kvantificiran je porast izražaja LC3-II u I/R-om i ŽMS-ma tretiranim skupinama usporedno s kontrolnom. Tretman egzosomima nije rezultirao vidljivim promjenama. Usporedno s I/R-om tretirane skupine, tretman ŽMS-ma uzrokuje porast izražaja LC3-II koji je ponovno praćen gotovo jednakim porastom u I/R + medij tretiranoj skupini. Tretman egzosomima rezultira padom izražaja spomenutog biljega (Slika 32 (b)).



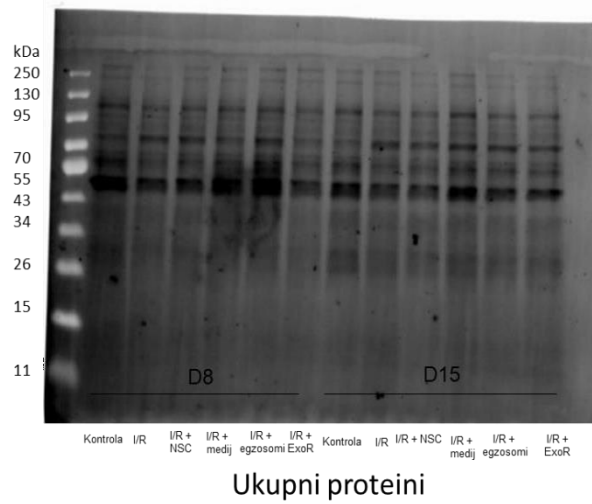
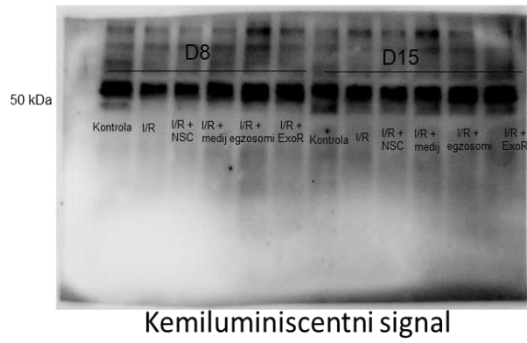
(b)



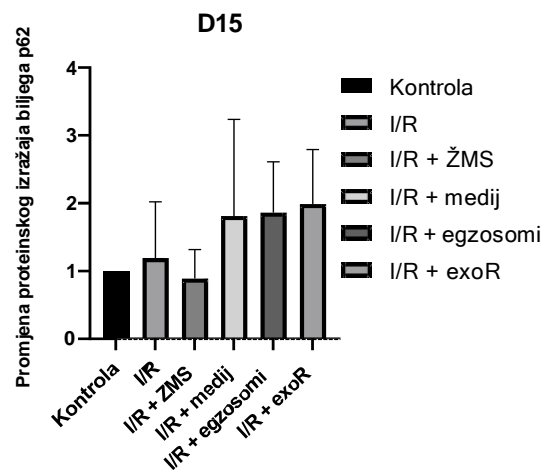
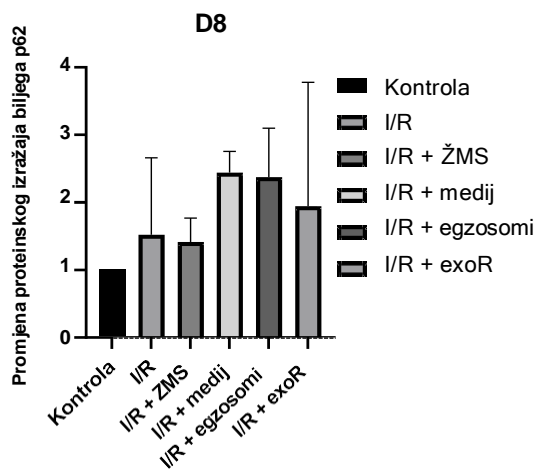
Slika 32. Intenzitet kemiluminiscencije, normalizacija prema ukupnim proteinima membrane (a), te kvantifikacija razlike proteinskih izražaja biljega LC3-II različitih uvjeta u odnosu na kontrolnu skupinu (b). Rezultati su pokazani kao srednja vrijednost \pm SD.

Završno, mjerio se proteinski izražaj biljega p62 gdje je u D8 vidljiv statistički beznačajan porast spomenutog proteina u svim ispitanim skupinama u odnosu na kontrolnu, uz najveću razliku vidljivu u skupini tretiranoj egzozomima. Usporedno s I/R-om tretirane grupe, tretman ŽMS-ma blago smanjuje izražaj p62. Suprotno, tretmani kontrolnim medijem i egzozomima rezultiraju porastom izražaja ispitanog proteina. Analizirajući D15 vidljiv je porast biljega p62 u svim ispitanim skupinama izuzev tretmana ŽMS-ma u odnosu na kontrolnu skupinu. Također, jedino za skupinu tretiranu ŽMS-ma karakterističan je statistički beznačajan pad proteinskog izražaja ispitanog biljega usporedno s I/R-om tretirane skupine (**Slika 33 (b)**). Analizom sva 3 biljega, može se zaključiti kako u D8, tretman ŽMS-ma usporedno s I/R-om tretirane skupine inducira autofagiju.

(a)



(b)



Slika 33. Intenzitet kemiluminiscencije, normalizacija prema ukupnim proteinima membrane (a) te kvantifikacija razlike proteinskih izražaja biljega p62 različitih uvjeta u odnosu na kontrolnu skupinu (b). Rezultati su pokazani kao srednja vrijednost \pm SD.

6. Rasprava

6.1. Primjena *in vitro* modela postupne diferencijacije živčanih matičnih u istraživanju zbijanja tijekom razvoja živčanog sustava

U ovom istraživanju koristio se model multipotentnih ŽMS-a koje se postepeno diferenciraju prema zrelim oblicima stanica živčanog sustava. Proces diferencijacije karakteriziraju strukturne i metaboličke promjene stanica koje nastaju kao rezultat aktivacije i interakcije različitih transkripcijskih faktora, signalnih puteva i molekula (51, 99, 100). Uspostavom i optimizacijom *in vitro* modela staničnih kultura ŽMS-a omogućeno je istraživanje embrionalnog razvoja, neuro/gliogeneze, njihova diferencijacijskog potencijala te utjecaja raznih patoloških stanja kao i razvoj potencijalnih terapijskih pristupa u liječenju neurodegenerativnih bolesti. Iako postoje razlike u ponašanju stanica prisutnih unutar organizma (*in vivo*) i nasađenih u pločicu s medijem (*in vitro*), *in vitro* metodama omogućena je jednostavnija analiza i manipulacija signalnim putevima. To pak omogućuje bržu, jednostavniju, a time i efikasniju prvu fazu razvoja potencijalnih terapijskih molekula.

U početku su stanice nasađene u mediju za diferencijaciju, gdje je korištenjem biljega neuroepitelne stanice SOX2 i Nestina potvrđena prisutnost nezrelih stanica. SOX2 (engl. *Sex determining region Y-box 2*) naziv je za transkripcijski faktor koji je s faktorima OCT4 (engl. *Octamer-binding transcription factor 4*) i NANOG (engl. *Homeobox Transcription Factor Nanog*) ključan u održavanju matičnosti stanica (99). Transkripcijski faktori iz skupine SOXB1 koja uključuje *SOX1-3* surađuju u održavanju proliferativnih svojstava ŽMS-a, a svoju ulogu temelje na vezanju za specifične sekvence DNA prisutne uz promotore čija je uloga pojačano prepisivanja određenih gena (99, 101). Istraživanja pokazuju kako mutacije gena *SOX2* dovode do nastanka poremećaja SŽS-a (101). Također, određeni proneuronalni faktori mogu smanjiti izražaj SOX2 čime stimuliraju neuronalnu diferencijaciju (99). Zanimljivo je napomenuti kako, iako ključan u održavanju proliferativnih svojstava stanica, SOX2 je i dalje prisutan tijekom diferencijacije gdje u post-migracijskim neuronima sudjeluje u uspostavi talamokortikalnih projekcija (101). Biljeg Nestin specifičan je biljeg citoskeletnih intermedijarnih filamenata tipa VI prisutnih u neuroepitelnim i prekursorskim stanicama (102). Usprkos činjenici da mehanizam s pomoću kojeg Nestin sudjeluje u održavanju matičnosti nije u potpunosti jasan, poznato je kako regulirajući molekulu Cdk5 (engl. *Cyclin-dependent kinase 5*) izaziva antiapoptotska svojstva (102–104). Iako se izražaj Nestina tijekom diferencijacije smanjuje, i dalje je prisutan u velikom broju stanica što se djelomično može objasniti rezultatima

istraživanja dobivenih od Bott i sur. koje sugerira kako Nestin ima važnu ulogu u neuronima, gdje se vežući na p35 aktivira kinazu Cdk5 koja fosforilira biljeg Doublecortin, (protein koji je izražen u ranim neuronima) te ga navodi prema mjestima izrastanja aksona (105). Suprotno situaciji u D1, gdje su gotovo isključivo prisutne matične stanice, u D7 i D14 očigledan je porast broja astrocita i neurona. Kako diferencijacija napreduje vidljiva je dominacija astrocitne populacije što se može pripisati utjecaju FBS-a. Nepoznat sastav FBS-a kao i razlike između proizvodnih serija smanjuju pouzdanost protokola u kojima bi se optimizirala njegova koncentracija.

6.2. Utjecaj akutnog oštećenja izazvanog manjkom kisika i glukoze na diferencijaciju stanica

Mnoge bolesti poput ishemijskog moždanog udara i perinatalne ozljede mozga nastaju kao posljedica otežane ili u potpunosti zaustavljene cirkulacije, što u konačnici rezultira smanjenom dostavom kisika i hranjivih tvari u stanice i tkiva. Iako se u perinatalnu ozljedu mozga ubraja nekoliko patoloških stanja poput hipoksijsko-ishemijske encefalopatije, periventrikularne leukomalacije, perinatalnog ishemijskog moždanog udara te intraventrikularnog krvarenja, u osnovi svih stanja je nedostatak glukoze i kisika (106). Navedeni poremećaji izazivaju teške posljedice za organizam koje ovisno o intenzitetu i trajanju uzrokuju napadaje, motorna i kognitivna oštećenja, cerebralnu paralizu te smrt (75, 76, 106, 107). Incidencijom od 1.5 do 3 na 1000 rođene djece u razvijenim te 10-20 na 1000 rođene djece u nerazvijenim zemljama, HIE predstavlja veliki globalni problem s teškim posljedicama za pojedinca i društvo (74). U staničnoj osnovi oštećenja nastalog kao posljedica djelovanja HIE utvrđen je primarni i sekundarni energetske deficit nastao kao posljedica oštećenja mitohondrija, porasta razine slobodnih radikala, kao i ekscitacijskih i proupalnih molekula. To sve u konačnici dovodi do apoptotičke i nekrotičke smrti stanice (75–77).

OGD model predstavlja zlatni standard u istraživanju ishemijske ozlijede *in vitro*. Intenzitet kao i trajanje ozlijede varira ovisno o tipu stanica te za neurone i astrocite uglavnom iznosi manje od 1 h do 8 h u anoksičnim (0% O₂) te od 6 h do 24 h u hipoksičnim uvjetima (1% O₂) (108–113). S obzirom na to da se u ovom istraživanom modelu, ovisno o ispitanom danu koristila mješovita populacija matičnih stanica, neurona i astrocita, korišten je model OGD-a u hipoksičnim uvjetima i trajanju od 24 h. Prvi cilj istraživanja bio je analizirati postotak citotoksičnosti kao i izražaj specifičnih biljega stanične diferencijacije nakon OGD-om inducirane ozlijede. Razina citotoksičnosti kontrolnih uvjeta je u odnosu na D1, gdje je kvantificiran postotak citotoksičnosti od 35% bilježila pad u preostala dva ispitivana dana te je

iznosila 30% i 25%. U OGD-om oštećenim stanicama bilježila je konstantnih 75%. Nešto viši postotak citotoksičnosti u kontrolnim uvjetima D1 vjerojatno je prisutan kao rezultat enzimatskog djelovanja akutaze kao i staničnog stresa nastalog uslijed nasađivanja. Iako smanjenja u D7 i D14 u odnosu na D1, u miješanim staničnim kulturama, citotoksičnost je u određenoj mjeri uvijek prisutna u kontrolnim uvjetima (114–116). Statistički značajan porast postotaka citotoksičnosti u OGD-om tretiranim skupinama D7 i D14 koristila se kao potvrda korištenog modela izazivanja ishemijske ozlijede. Kada se promatrao utjecaj OGD-a na pojedine stanične biljege, izuzev razine astrocitnog biljega GFAP u D1 gdje je detektiran porast, pronađen je pad izražaja biljega Nestina, GFAP i MAP2 u svim točkama diferencijacije. Rezultati su pokazali kako su neuroni najosjetljiviji stanični tip, što, uzevši u obzir činjenicu kako energiju osiguravaju procesom oksidativne fosforilacije te da su metabolički iznimno aktivni, ne iznenađuje (45).

6.3. Utjecaj stanične diferencijacije i akutnog nedostatka kisika i glukoze na strukturne promjene mitohondrija

Uzevši u obzir činjenicu kako su mitohondriji glavni proizvođači stanične energije te da imaju važnu ulogu u molekularnoj signalizaciji, proliferaciji, diferencijaciji te opstanku stanica, odlučili smo analizirati i razumjeti promjene u strukturi mitohondrija tijekom diferencijacije zdravih stanica te posebice nakon OGD-om izazvanog oštećenja (117). Razvoj mitohondrijske citoarhitekture vrlo je dinamičan proces ovisan o fuzijsko/fisijskim ciklusima temeljenim na aktivnosti fuzijskih proteina OPA1 te MFN1 i 2 i fisijskih proteina među kojima je najvažniji DRP1 (118). U nediferenciranim ŽMS-ma održava se niska metabolička aktivnost praćena niskom potrošnjom kisika, fragmentacije i glikolize (118, 119). Spomenuta hipoteza potvrđena je i u našim stanicama gdje su u kontrolnim uvjetima D1 prisutne isključivo nezrele, SOX2 i Nestin pozitivne stanice sa slabo razvijenim mitohondrijskim TOMM20 signalom. Usporedno s D1, analizirajući određene parametre mitohondrijske mreže tijekom diferencijacije, zabilježen je porast vrijednosti površine, duljine te razgranatosti u oba preostala ispitana dana (D7 i D14) kontrolnih uvjeta. Porast svih ispitanih parametra ukazuje na postupan razvoj stanica praćen povećanim metaboličkim zahtjevima te izraženijim fuzijsko/fisijskim procesima (63). Normalizacijom prema kontrolnim uvjetima, nakon tretmana OGD-om uočen je pad proučavanih parametara mitohondrija u svim diferencijacijskim točkama od interesa. Rezultati ukazuju na jasno mjerljiv i kvantificiran stanični i mitohondrijski stres. Nakon izlaganja OGD-u, mitohondriji astrocita prolaze kroz promjene u fuzijsko-fisijskoj dinamici s uočenom povećanom aktivnošću fisije čime dolazi do mitohondrijske redistribucije, povećanja u broju

fragmentiranih mitohondrija, smanjenja njihove dužine i prisutnosti mitohondrija u astrocitnim nastavcima (120, 121).

Za potrebe klasifikacije specifičnih oblika mitohondrija, naš tim je razvio poseban ImageJ/Fiji makro za poluautomatsku kvantifikaciju temeljenu na strojnom učenju. Tako je omogućena veća objektivnost analize te smanjen utjecaj ljudske pogreške. Mitohondriji su se s obzirom na njihovu cirkularnost podijelili u 3 kategorije filamenata prema kojoj su fragmentirani imali najviši stupanj cirkularnosti, intermedijarni srednju, a tubularni filamenti najmanju razinu cirkularnosti. Tubularni filamenti predstavljaju zdrave mitohondrije povezane u gustu mrežu, dok su fragmentirani filamenti okarakterizirani kao oštećeni fragmenti nastali procesom fisije. Sličan princip klasifikacije primijenjen je u radovima od Nair i sur. te Ahmad i sur. gdje se analiza temeljila na razlici u veličini, pri kojoj su mitohondriji manji od 1 μm kategorizirani kao fragmentirani, 1-3 μm kao tubularni te veći od 3 μm kao izduženi (6, 122). Također su prema intenzitetu fluorescencije bili podijeljeni na izdužene, nalik krafni (engl. *donut shape*) te grudaste (122). Promatrajući postotke pojedine klase mitohondrija vidljivo je kako u kontrolnim uvjetima udio tubularnih filamenata bilježi rast, a fragmentiranih filamenata pad tijekom diferencijacije. Dobiveni rezultati potvrđuju veću aktivnost fuzijskih procesa, populaciju mitohondrija s primjerenijim fiziološkim izgledom što se podudaralo s porastom površine, duljine i razgranatosti mitohondrijske mreže. Nakon tretmana OGD-om uočen je porast udjela fragmentiranih te pad tubularnih filamenata čime je potvrđena povećana aktivnost fisije. Dobiveni rezultati su u suglasnosti s rezultatima objavljenim od Demarest i sur. koji također potvrđuju povećanu fragmentiranost i aktivnost mitofagije nastalom kao posljedica ishemijske ozlijede (123). Uz povećanu fragmentaciju, 3D analizom slika živih stanica utvrđen je i porast sfericiteta mitohondrija što vjerojatno korelira s njihovim otečenim i sferičnim oblikom prikazanim korištenjem elektronske mikroskopije (124). Takav porast postotka fragmentiranih mitohondrija objašnjava se mehanizmom kojim stanica, uklanjajući oštećene mitohondrije, povećava mogućnost preživljenja (125).

Utjecaj OGD-a na metabolizam mitohondrija dodatno smo potvrdili analizom razine superoksidnih aniona te membranskog potencijala. Disbalans u oksidativnom statusu nastaje kada razina proizvedenih slobodnih radikala premašuje antioksidativna svojstva stanica što rezultira strukturnim promjenama proteina, peroksidacijom lipida, staničnom citotoksičnošću, genomskom nestabilnošću i otvaranjem mPTP-ova (engl. *Mitochondrial permeability transition pores*) (126, 127). Mitohondriji kao ključni stanični organeli u proizvodnji ATP-a glavni su izvor slobodnih kisikovih radikala koji najčešće nastaju tijekom procesa oksidativne

fosforilacije kada elektroni prolazeći elektronskim transportnim sustavom spontano izlaze izvan njega te reagiraju s atomima kisika. Superoksidni anioni predstavljaju najzastupljeniju populaciju mitohondrijskih ROS-ova (126, 128). Opisane strukturne promjene mitohondrija praćene su i njihovim metaboličkim stresom gdje je dokazana povišena razina superoksidnih aniona svih dana diferencijacije. Nedostatak statističke značajnosti u D7 objašnjava se činjenicom kako je upravo u toj točki kontrolnih uvjeta prisutan najveći broj neurona koji suprotno astrocitima energiju proizvode procesom oksidativne fosforilacije, a koji nakon izlaganja tretmanu OGD-a umiru (45). Iako je poznato kako ishemijska ozljeda uzrokuje depolarizaciju mitohondrijske membrane astrocita i neurona, kvantificirani rezultati TMRE signala ukazuju na hiperpolarizaciju njihove membrane u svim ispitanim danima diferencijacije (129, 130). Dobiveni rezultati mogu se objasniti tako da se nakon tretmana OGD-om stanice strukturno zbiju što posljedično dovodi i do akumulacije mitohondrija i njihova intenziteta. Sličan zaključak vidljiv je u istraživanju od Agarwal i sur. koje sugerira kako određeni stanični stresori poput ishemijske ozlijede, povišene temperature te povećane proizvodnje slobodnih kisikovih radikala rezultiraju aktivacijom staničnog odgovora na toplinski šok (engl. *Heat shock*). To pak uzrokuje njihovo nakupljanje u području oko jezgre te porast intenziteta fluorescencije oštećenih mitohondrija (131). Također, dokazanim porastom razine slobodnih kisikovih radikala, dobivena hiperpolarizacija može se objasniti i RIRR fenomenom (engl. *ROS induced ROS released*): to je zbivanje u kojem dolazi do otvaranja pora na mitohondrijskoj unutarnjoj membrani (mPTP) što je u vrlo kratkom periodu praćeno hiperpolarizacijom (126). Istraživanje od Ward i sur. sugerira kako je odgođena smrt neurona apoptozom početno karakterizirana razdobljem depolarizacije praćeno hiperpolarizacijom mitohondrijske membrane (132). Završno, Korenić i sur. su također utvrdili kako se tijekom produžene ishemijske ozlijede astrocita može kvantificirati hiperpolarizacija mitohondrijske membrane (133).

6.4. Ispitivanje utjecaja akutnog manjka kisika i glukoze na autofagiju i mitofagiju nezrelih stanica živčanog sustava

Autofagija je proces degradacije oštećenih staničnih proteina i organela te određenih patogena što doprinosi održavanju staničnog integriteta i homeostaze. Iako prisutna i u fiziološkim uvjetima, njena aktivnost izraženija je u raznim patološkim stanjima gdje posjeduje obrambene mehanizme protiv patogena te osigurava nutrijente nužne za opstanak stanica (134). Disfunkcija autofagije je povezana s razvojem raznih patoloških stanja poput neurodegeneracije, tumora i ubrzanog starenja (13). Aktivnost ponajviše ovisi o djelovanju

proteinskih kinaza mTOR (engl. *Mammalian target of rapamycin*) te AMPK (engl. *Adenosine monophosphate-activated protein kinase*) (135). U stanju nutritivnog obilja, kada je dostupnost energije i aminokiselina visoka, mTOR fosforilira ULK i ATG13 te inhibira autofagiju. Suprotno, nedostatak nutrijenata, djelovanje rapamicina ili pojačana aktivnost AMPK inhibira mTOR te stimulira proces autofagije. AMPK stimulira autofagiju direktnom fosforilacijom ULK1, regulacijom PI3K kompleksa te inhibiranjem mTOR-a (134, 135). Kvantificirano povećanje proteinskog izražaja LC3-II, njegova povećana kolokalizacija s lizosomima te pad proteinskog izražaja p62 ukazuju na povećanu aktivnost autofagije ili poremećaj autofagijskog fluksa u skupinama izloženim OGD tretmanu (136). Generalni učinak autofagije na OGD-om oštećene stanice SŽS-a je kompleksan, dvojak te ovisi o intenzitetu i trajanju oštećenja. Rezultati vrlo važnog istraživanja u kojem je stanična linija hipokampalnih neurona bila izložena ishemijsko reperfuzijskoj ozljedi sugeriraju kako povišena aktivnost autofagije (stimulirana rapamicinom) i signalnog puta AMPK smanjuje stanično oštećenje (109). Istraživanje od Papadakis i sur. u kojem je stanična kultura hipokampalnih neurona bila izložena trosatnoj ishemijskoj ozljedi u anoksičnim uvjetima praćenoj 24 h reoksigenacijom identificirala je neuroprotektivan učinak proteina hamartina (137). Naime, prekomjerni izražaj hamartina inhibira mTOR signalni put te povećava aktivnost autofagijskog fluksa što je u konačnici rezultiralo kvantificiranim smanjenjem stanične smrti (137). Suprotno, istraživanje od Wang i sur. ukazuje kako povišena aktivnost autofagije u ishemijsko reperfuzijskoj ozljedi u trajanju od 6 h pri razini kisika od 1% uzrokuje povećanu smrt PC12 stanične linije neurona (138). Stanični tretman šizandrinom, spojem izoliranim iz kineske šizandre (*Schisandra chinensis*) koji je prethodio ozljedi, rezultirao je povećanim staničnim preživljenjem te smanjenim proteinskim izražajem biljega BECLIN1 i LC3-II. Šizandrin dokazano reducira formiranje autofagosoma, blokira AMPK te stimulira mTOR signalni put i smanjuje štetno djelovanje autofagije na stanice oštećene ishemijsko reperfuzijskom ozlijedom (138). Slični rezultati prikazani su u istraživanju od Zhang i sur. u kojem su stanične linije neuroblastoma, glioma te mikrovaskularnih endotelnih stanica štakora izložili različitoj dužini trajanja OGD oštećenja pri čemu su utvrdili kako kod kratkotrajnog (30 minuta) OGD oštećenja, rapamicinom aktivirana autofagija djeluje blagotvorno na stanice neurona (139). Suprotno, dugotrajno izlaganje stanica OGD modelu djeluje štetno na stanice astrocita i neurona gdje je vidljiva povišena autofagijska aktivnost koja dodatno stimulira apoptozu i staničnu smrt. Zanimljivo, tretman autofagijskim inhibitorom 3-MA (engl. *3-Methyladenine*) smanjuje aktivnost apoptoze (139).

Specifičan oblik autofagije usmjeren na uklanjanje dotrajalih ili oštećenih mitohondrija naziva se mitofagija (2, 7, 140). S obzirom na mehanizam djelovanja razlikujemo od ubikvitina ovisnu mitofagiju te receptorima posredovanu mitofagiju (25, 140). Analiza od ubikvitina ovisne mitofagije temelji se na aktivnosti proteina PINK1 i Parkina. PINK1 naziv je za mitohondrijsku serin/treonin protein kinazu koja je između ostaloga važan dio sustava za njegovu kontrolu kvalitete. U fiziološkim se uvjetima premješta u membranski prostor mitohondrija gdje se djelovanjem MPP-a (engl. *Matrix processing peptidase*) i PARL (engl. *Presenilin-associated rhomboid like*) degradira (4, 28). Uslijed mitohondrijskog oštećenja akumulira se na vanjskoj membrani mitohondrija gdje specifično fosforilira ubikvitin i E3 ubikvitin ligazu Parkin. Fosforilirani Parkin se zatim veže na mitohondrijski ubikvitin gdje potiče formiranje poliubikvitinskih lanaca na proteinima vanjske membrane mitohondrija koji su predodređeni za degradaciju (4, 28, 140, 141). Specifičnost mitofagije osigurana je djelovanjem adaptorskih proteina p62, NDP52, optineurina (OPTN) te NIX-a koji svojim domenama prepoznaju ubikvitinirane proteine vanjske membrane s jedne strane te LC3 (ATG8) autofagosoma s druge (4, 28, 141). Iako s obzirom na nespecifično vezanje anti-Parkin protutijela potpuna analiza od ubikvitina ovisne mitofagije nije bila moguća, dobiveno povećanje biljega PINK1 u suglasnosti je s radom objavljenim od Ding i sur. u kojem su korištenjem CCCP-a (*Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone*) kao kemijskog induktora hipoksije potvrdili nužnost akumulacije PINK1 proteina za povećanu aktivnost mitofagije posredovane djelovanjem Parkina (142).

Analiza receptorima posredovane mitofagije temeljila se na kvantifikaciji genskog i proteinskog izražaja membranskog biljega FUNDC1 koji svojom LIR domenom posjeduje mogućnost efikasnog vezanja autofagosoma (25, 140). Smanjen genski i proteinski izražaj biljega FUNDC1 vidljiv u D7 odgovara rezultatima objavljenim od Liu i sur. koji navode kako hipoksijsko oštećenje inducira mitofagiju praćenu njegovim smanjenim izražajem (143). Suprotno, također kao rezultat hipoksijskog oštećenja, dolazi do povećanog nakupljanja proteina FUNDC1 na mjestima interakcije mitohondrija i endoplazmatskog retikuluma (MAM– *Mitochondria-associated membranes*) gdje u početnim fazama veže kalneksin. Kako hipoksija napreduje i povećava se aktivnost mitofagije, FUNDC1 se odvaja od kalneksina te veže DRP1 koji stimulira fragmentaciju mitohondrija koja je preduvjet uspješne mitofagije (144).

S obzirom na to da je u ovom istraživanju dokazana povećana stanična citotoksičnost praćena mitohondrijskim oštećenjem u svim ispitanim danima diferencijacije te na činjenicu kako se kvantitativnom i kvalitativnom analizom genskog i proteinskog izražaja potvrdilo umiranje

astrocita i neurona, zaključuje se kako povišena aktivnost autofagije vjerojatno doprinosi povećanoj smrti stanica apoptozom.

6.5. Učinak živčanih matičnih stanica i egzosoma na ishemijsko reperfuzijsku ozljedu stanica središnjeg živčanog sustava

Tktivni aktivator plazminogena (tPA) predstavlja zlatni standard te je trenutno jedini terapijski pristup odobren od strane FDA u liječenju ishemijsko reperfuzijske ozlijede mozga (145). Uslijed vrlo ograničenog perioda za djelovanje (unutar 4.5 h) kao i zbog mogućih nuspojava, veliki naponi se ulažu ka razvoju dodatnih pristupa liječenju. Novi terapijski pristupi usmjereni su prema održavanju integriteta krvno-moždane barijere, smanjenju zahvaćenog područja, razine slobodnih kisikovih radikala i djelovanja matriks metaloproteinaza (MMP9) te poticanju neovaskularizacije (145). Liječenje HIE, oblika moždanog oštećenja također nastalog kao posljedica ishemijske ozlijede, najčešće se temelji na korištenju terapije hipotermijom. Ostali terapijski pristupi uključuju korištenje eritropoetina, ksenona, antiepileptika, DHA te kanaboidnih agonista čime se pokušava smanjiti štetni učinka oksidativnog stresa i glutamata (75). U liječenju oba spomenuta stanja, sve veći broj znanstvenih istraživanja usmjeren je u ispitivanje mogućeg direktnog ili indirektnog terapijskog potencijala matičnih stanica. U nizu radova je zaista pokazano kako primjene ŽMS-a i MMS-a stanica stimuliraju neuroprotektivna, protuupalna i antiapoptotska svojstva (94, 96, 97, 146–148).

Kako bi istražili direktan i indirektan učinak ŽMS-a na ishemijsko reperfuzijsku ozljedu stanica SŽS-a u diferencijaciji, pratio se utjecaj egzosoma izoliranih iz ŽMS-a na postotak stanične citotoksičnosti. U ovom slučaju je vidljiv njihov blagotvoran učinak samo na astrocitu populaciju u D15. Slični rezultati vidljivi su i u istraživanju od Sun i sur. u kojem su OGD-om oštećene primarne kulture astrocita i neurona tretirali s egzosomima izoliranim iz mišjih ŽMS-a i ljudskih induciranih kardiomiocita što je dovelo do statistički značajnog smanjenja astrocitne i neuronalne stanične smrti. Također, u *in vivo* modelu ishemijske ozlijede mozga potvrdili su blagotvorni učinak egzosoma izoliranih iz mišjih ŽMS-a čime se otvara mogućnost njihova korištenja u terapijske svrhe (149). Iako mehanizam kojim egzosomi potiču blagotvoran učinak nije u potpunosti jasan, istraživanje od Xin i sur. ukazuje na važnost njihove miRNA (engl. *microRNA*) u posredovanju smanjenja staničnog oštećenja. Intra-arterijski unos populacije miR-133b obogaćenih egzosoma izoliranih iz mezenhimskih matičnih stanica stimulira neuroplastičnost i oporavak štakora izloženih ishemijskoj ozlijedi mozga. Zanimljivo, izolirani egzosomi iniciraju oporavak djelovanjem na oštećene astrocitate gdje izazivaju sekundarno otpuštanje egzosoma (150).

S obzirom na prethodno dobivene rezultate koji potvrđuju kako tretman OGD-om uzrokuje oštećenje mitohondrija i oksidativni stres stanica u svim ispitanim točkama diferencijacije, tretmanom egzozomima pokušala su se utvrditi njihova antioksidativna svojstva. Zanimljivo, u ovom istraživanju pokazalo se kako izolirani egzozomi blago smanjuju razinu superoksidnih aniona samo u D2. Mehanizam kojim se smanjuje razina superoksidnih aniona vjerojatno se može pripisati utjecaju mitohondrijskog prijenosa. Naime, rad od Peruzzotti-Jametti i sur. otkriva kako egzozomi izolirani iz ŽMS-a posjeduju mogućnost međustaničnog prijenosa mitohondrija čime utječu na metabolizam stanice domaćina (151). U radu su istraživali utjecaj egzozoma izoliranih iz ŽMS-a na proupalne makrofage gdje su otkrili kako mitohondriji iz egzozoma imaju mogućnost integracije u postojeću mitohondrijsku mrežu domaćina i smanjenja proupalnog odgovora (151).

Pošto su u provedenom istraživanju u D1 prisutne gotovo isključivo nezrele stanice sa slabo razvijenom mitohondrijskom mrežom, moguće je da transfer zdravih mitohondrija uspijeva djelomično smanjiti razinu superoksidnih aniona.

Analiza utjecaja ŽMS-a i egzozoma na aktivnost mitofagije u I/R-om oštećenih stanica ukazuje na porast izražaja proteinskih biljega PINK1 i FUNDC1 u D8, što vjerojatno ukazuje na povećan proces fisije i fragmentacije oštećenih mitohondrija, nakon čega se oni uklanjaju mitofagijom (144, 152). S obzirom na to kako je vidljivo još veće povećanje izražaja FUNDC1 u skupini tretiranoj otopinom ExoR može se zaključiti kako egzozomi nemaju utjecaj na aktivnost mitofagije. Suprotno, u D15, nije pronađena veća razlika proteinskog izražaja oba spomenuta biljega između tretiranih skupina u odnosu na I/R-om oštećenu skupinu, čime se isključuje njihov učinak na stanice spomenutog dana diferencijacije.

Završno, kvantificiranjem izražaja proteinskih biljega BECLIN1, LC3-II i p62 utvrdio se utjecaj tretmana ŽMS-om i egzozomima na razinu autofagije u I/R-om oštećenoj skupini. U D8 je vidljivo kako tretman ŽMS-om uzrokuje porast proteinskih izražaja biljega BECLIN1 i LC3-II te pad biljega p62 čime je potvrđena povećana aktivnost autofagije. Iako je porast LC3-II vidljiv i u skupini tretiranoj medijem za proliferaciju, porast BECLIN1 te pad p62 ide u prilog induciranoj autofagiji. Tretman egzozomima uzrokovao je porast svih istraživanih biljega no s obzirom na činjenicu da je porast također uočeno u skupini tretiranoj otopinom ExoR isključuje se njihov direktan učinak. Aktivirana autofagija u D8 sa rezultatima povećane stanične citotoksičnosti i razine superoksidnih aniona u skupini tretiranoj egzozomima ukazuje kako ona doprinosi staničnom oštećenju. Analizirajući D15 uočeno je blago smanjenje izražaja

BECLIN1 i p62 te porast LC3-II u skupini tretiranoj ŽMS-ma usporedno s I/R-om oštećene skupine. Utvrđena kontradiktornost u izražajima biljega autofagije u ovom se slučaju zbog korištenja staničnih inserata nije mogla provjeriti metodom snimanja živih stanica zbog čega je izrazito nezahvalno procijeniti njenu aktivnost. U skupini tretiranoj egzomima vidljivo je smanjenje izražaja BECLIN1 i LC3-II te porast izražaja p62 što ukazuje na smanjenu aktivnost autofagije. Dodatno, skupina tretirana ExoR otopinom također izaziva smanjenu aktivnost autofagije što isključuje ulogu egzosoma na spomenuti proces. Učinak egzosoma i otopine ExoR ovisno o diferencijacijskom danu smanjuje postotak stanične citotoksičnosti, razinu superoksidnih aniona te aktivnosti autofagije čime vjerojatno djeluju blagotvorno na oštećene stanice.

7. Zaključci

1. Živčane matične stanice, analizirane nakon jednog, sedam i četrnaest dana diferencijacije postižu različit stupanj zrelosti, što predstavlja pogodan model u *in vitro* istraživanju ishemijske ozlijede.
2. Morfološke i metaboličke promjene stanica tijekom diferencijacije praćene su povećanjem površine, duljine i razgranatosti mitohondrijske mreže iz čega zaključujemo kako stanice postupno poprimaju zreli oblik s izraženijim metaboličkim potrebama.
3. Akutni manjak kisika i glukoze u trajanju od 24 h uzrokuje povećanu staničnu smrt, narušava fuzijsko/fisijske cikluse mitohondrija, štetno djeluje na parametre mitohondrijske mreže i metabolizam mitohondrija te inducira mitofagiju.
4. Izlaganje stanica akutnom manjku kisika i glukoze dovodi do povećanog nakupljanja autofagosoma i njihove kolokalizacije s lizosomima, što ukazuje na povećanu aktivnost autofagije, ali i na njenu poremećenu dinamiku.
5. Egzosomi izolirani iz ŽMS-a iskazuju djelomično blagotvoran učinak na stanice oštećene ishemijsko reperfuzijskom ozljedom tako što smanjuju razinu superoksidnih aniona drugog dana diferencijacije te staničnu smrt petnaestog dana diferencijacije.
6. Učinak egzogeno dodanih ŽMS-a i njenih egzosoma na stanice oštećene ishemijsko reperfuzijskom ozljedom rezultira povećanom aktivnošću autofagije i mitofagije osmog dana diferencijacije, također praćenu povećanom razinom superoksidnih aniona i staničnom smrću iz čega zaključujemo kako tretmani djeluju štetno na oštećene stanice spomenute točke diferencijacije.
7. Egzosomi i otopina ExoR izazivaju blagotvoran učinak smanjenjem aktivnosti autofagije u stanicama oštećenim ishemijsko reperfuzijskom ozljedom petnaestog dana diferencijacije.

8. Sažetak

Jedan od najčešćih uzroka invalidnosti u ljudskoj populaciji je nagli manjak kisika i glukoze koji je posebice štetan tijekom perinatalnog perioda, a naziva se hipoksijsko ishemijska encefalopatija. U središtu tog patofiziološkog zbivanja su mitohondriji čiji nagli poremećaj rada dovodi do niza negativnih posljedica na stanicu, a često i do stanične smrti. Stoga se ovo istraživanje fokusiralo na utjecaj hipoksijsko-ishemijske ozljede na strukturu i metabolizam mitohondrija te na aktivnost autofagije i mitofagije u nezrelim stanicama živčanog sustava. Nakon uspostave *in vitro* modela HIE, što je uključilo i analizu akutne citotoksičnosti, pokazali smo kako nagli manjak kisika i glukoze negativno djeluje na površinu, duljinu i razgranatost mitohondrija. Također, korištenje vlastitog razvijenog algoritma omogućilo nam je kvantifikaciju fragmentacije mitohondrija, za koju je pokazano kako ovisi o stupnju diferencijacije stanica živčanog sustava. Istovremeno smo uočili povećane razine superoksidnih aniona, hiperpolarizaciju membrane mitohondrija te povećanu mitofagiju. S ciljem pronalaženja novih terapijskih pristupa, nezrele stanice živčanog sustava oštećene akutnim manjkom kisika i glukoze su bile tretirane živčanim matičnim stanicama ili njihovim egzozomima gdje je uočeno smanjene razine superoksidnih aniona drugog dana diferencijacije, kao i stanične smrti i autofagije petnaestog dana diferencijacije. Iz rada se zaključuje kako ŽMS i njeni egzozomi djeluje protektivno na zrelije stanice SŽS-a.

9. Summary

Role of neural stem cells on mitophagy regulation after ischemic damage of cells of the neural tissue

Denis Jagečić, mag.biol.exp., 2024.

One of the most common causes of disability is a sudden lack of oxygen and glucose that causes hypoxic ischemic encephalopathy which is particularly harmful for the organism during perinatal development. Mitochondria are in the center of this event, whose malfunction leads to a series of negative consequences and cell death. This research focused on the influence of hypoxic-ischemic injury (HIE) on the structure and metabolism of mitochondria, and on autophagy and mitophagy in immature cells of CNS. After the establishment of an *in vitro* model of HIE, which included the analysis of acute cytotoxicity, we found that lack of oxygen and glucose has a negative effect on the surface, length and branching of mitochondria. Our own developed algorithm enabled us to quantify mitochondrial fragmentation, which is depended on the degree of cell differentiation. We also observed an increased level of superoxide anions, hyperpolarization of the mitochondrial membrane, and increased mitophagy. With the aim of finding new therapeutic approaches, immature cells of CNS damaged by HIE were treated with NSCs or their exosomes after which reduced level of superoxide anions on the second and cell death and autophagy on the fifteenth day of differentiation was detected. This research indicates that NSCs and its exosomes acts protective on more matured cells of CNS.

10. Literatura

1. McEwen BS. Central role of the brain in stress and adaptation: allostasis, biological embedding, and cumulative change. U: Fink G, ur. *Stress: concepts, cognition, emotion, and behavior*. San Diego: Academic Press; 2016. Str. 39–55.
2. Marinković M, Šprung M, Novak I. Dimerization of mitophagy receptor BNIP3L/NIX is essential for recruitment of autophagic machinery. *Autophagy*. 2020;0(0):1.
3. Nabavi SF, Sureda A, Sanches-Silva A, Pandima Devi K, Ahmed T, Shahid M, i sur. Novel therapeutic strategies for stroke: the role of autophagy. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2019;56(3):182–99.
4. Thornton C, Jones A, Nair S, Aabdien A, Mallard C, Hagberg H. Mitochondrial dynamics, mitophagy and biogenesis in neonatal hypoxic-ischaemic brain injury. *FEBS Letters*. 2018;(592):812–30.
5. Shen L, Gan Q, Yang Y, Reis C, Zhang Z, Xu S i sur. Mitophagy in cerebral ischemia and ischemia/reperfusion injury. *Front Aging Neurosci*. 2021;13:1–17.
6. Nair S, Leverin AL, Rocha-Ferreira E, Sobotka KS, Thornton C, Mallard C i sur. Induction of mitochondrial fragmentation and mitophagy after neonatal hypoxia–ischemia. *Cells*. 2022;11(7):1–17.
7. Wolf MS, Bayır H, Kochanek PM, Clark RSB. The role of autophagy in acute brain injury: A state of flux? *Neurobiol Dis*. 2019;122:9–15.
8. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*. 2010;221(1):3–12.
9. Kaushik S, Cuervo AM. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(6):365–81.
10. Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang YY, Kim J i sur. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol*. 2013;15(7):741–50.
11. Melia TJ, Lystad AH, Simonsen A. Autophagosome biogenesis: From membrane growth to closure. *J Cell Biol*. 2020;219(6):1–18.
12. Chang NC. Autophagy and stem cells: self-eating for self-renewal. *Front Cell Dev*

- Biol. 2020;8:1–11.
13. Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(6):349–64.
 14. Mohan J, Wollert T. Human ubiquitin-like proteins as central coordinators in autophagy. *Interface Focus.* 2018;8(5).
 15. Lee YK, Lee JA. Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. *BMB Rep.* 2016;49(8):424–30.
 16. Descloux C, Ginet V, Clarke PGH, Puyal J, Truttmann AC. Neuronal death after perinatal cerebral hypoxia-ischemia: Focus on autophagy-mediated cell death. *Int J Dev Neurosci.* 2015;45:75–85.
 17. Li X, Zhang D, Bai Y, Xiao J, Jiao H, He R. Ginaton improves neurological function in ischemic stroke rats via inducing autophagy and maintaining mitochondrial homeostasis. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2019;15:1813–22.
 18. Shi Q, Zhang Q, Peng Y, Zhang X, Wang Y, Shi L. A natural diarylheptanoid protects cortical neurons against oxygen–glucose deprivation-induced autophagy and apoptosis. *J Pharm Pharmacol.* 2019;71(7):1110–8.
 19. Osellame LD, Blacker TS, Duchen MR. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2012;26(6):711–23.
 20. Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature.* 2014;505(7483):335–43.
 21. Protasoni M, Zeviani M. Mitochondrial structure and bioenergetics in normal and disease conditions. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2):1–55.
 22. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell.* 4.izd. New York SE: Garland Science New York; 2002.
 23. Sakamuru S, Zhao J, Attene-Ramos MS, Xia M. Mitochondrial membrane potential assay. *Methods Mol Biol.* 2022;2474:11–9.
 24. Huang J, Chen L, Yao ZM, Sun XR, Tong XH, Dong SY. The role of mitochondrial dynamics in cerebral ischemia-reperfusion injury. *Biomed Pharmacother.*

- 2023;162:114671.
25. Zimmermann M, Reichert AS. How to get rid of mitochondria: crosstalk and regulation of multiple mitophagy path. *Biol Chem.* 2017;399(1):29–45.
 26. Vargas JNS, Hamasaki M, Kawabata T, Youle RJ, Yoshimori T. The mechanisms and roles of selective autophagy in mammals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2023;24(3):167–85.
 27. De Gaetano A, Gibellini L, Zanini G, Nasi M, Cossarizza A, Pinti M. Mitophagy and oxidative stress: the role of aging. *Antioxidants.* 2021;10(5):794.
 28. Palikaras K, Princz A, Tavernarakis N. Mitophagy modulators. U: Rattan SIS, ur. *Encyclopedia of Biomedical Gerontology.* Academic press; 2020. Str.433-446.
 29. Krüger M, Richter P. To die or not to die: cell death in biology and disease. *Int J Mol Sci.* 2022;23(12):6734.
 30. 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.
 31. Tang D, Kang R, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res.* 2019;29(5):347–64.
 32. Denton D, Kumar S. Autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ.* 2019;26(4):605–16.
 33. Linder B, Kögel D. Autophagy in cancer cell death. *Biology.* 2019;8(4):1–13.
 34. Zhai J, Xiao Z, Wang Y, Wang H. Human embryonic development: from peri-implantation to gastrulation. *Trends Cell Biol.* 2022;32(1):18–29.
 35. el Azhar Y, Sonnen KF. Development in a dish—in vitro models of mammalian embryonic development. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:1–8.
 36. Sasmour I. Stem cells: classification, characterization, and sources. U: Reis RL, ur. *Encyclopedia of tissue engineering and regenerative medicine.* Oxford: Academic Press; 2019. Str. 7–13.
 37. Watt FM, Driskell RR. The therapeutic potential of stem cells. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2010;365(1537):155–63.

38. Worku MG. Pluripotent and multipotent stem cells and current therapeutic applications: review. *Stem Cells Cloning*. 2021;14:3–7.
39. Leibovitz Z, Lerman-Sagie T, Haddad L. Fetal brain development: regulating processes and related malformations. *Life*. 2022;12(6).
40. Shiota K. Prenatal development of the human central nervous system, normal and abnormal. *Donald Sch J Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015;9(1):61–6.
41. Kelava I, Lancaster MA. Stem cell models of human brain development. *Cell Stem Cell*. 2016;18(6):736–48.
42. Yingling J, Youn YH, Darling D, Toyooka K, Pramparo T, Hirotsune S i sur. Neuroepithelial stem cell proliferation requires LIS1 for precise spindle orientation and symmetric division. *Cell*. 2008;132(3):474–86.
43. Boese AC, Le QSE, Pham D, Hamblin MH, Lee JP. Neural stem cell therapy for subacute and chronic ischemic stroke. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):1–17.
44. Alessandrini M, Preynat-Seauve O, De Bruin K, Pepper MS. Stem cell therapy for neurological disorders. *South African Med J*. 2019;109(8 b): 71–8.
45. Turner DA, Adamson DC. Neuronal-astrocyte metabolic interactions: understanding the transition into abnormal astrocytoma metabolism. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2011;70(3):167–76.
46. Judaš M, Kostović I. *Temelji neuroznanosti*. Zagreb: MD; 1997.
47. Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(8):626–40.
48. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119(1):7–35.
49. Bradl M, Lassmann H. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119(1):37–53.
50. Bystron I, Blakemore C, Rakic P. Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nature Reviews Neuroscience*. 2008;9(2):110–22.
51. Yamaguchi M, Seki T, Imayoshi I, Tamamaki N, Hayashi Y, Tatebayashi Y i sur. Neural stem cells and neuro/gliogenesis in the central nervous system: understanding

- the structural and functional plasticity of the developing, mature, and diseased brain. *J Physiol Sci.* 2016;66(3):197–206.
52. Denoth-Lippuner A, Jessberger S. Formation and integration of new neurons in the adult hippocampus. *Nat Rev Neurosci.* 2021;22(4):223–36.
 53. Lasser M, Tiber J, Lowery LA. The role of the microtubule cytoskeleton in neurodevelopmental disorders. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:165.
 54. Zheng X, Boyer L, Jin M, Mertens J, Kim Y, Ma L i sur. Metabolic reprogramming during neuronal differentiation from aerobic glycolysis to neuronal oxidative phosphorylation. *Elife.* 2016;5:1–25.
 55. Angelopoulos I, Gakis G, Birmpas K, Kyrousi C, Habeos EE, Kaplani K i sur. Metabolic regulation of the neural stem cell fate: Unraveling new connections, establishing new concepts. *Front Neurosci.* 2022;16:1–14.
 56. Chang MY, Son H, Lee YS, Lee SH. Neurons and astrocytes secrete factors that cause stem cells to differentiate into neurons and astrocytes, respectively. *Mol Cell Neurosci.* 2003;23(3):414–26.
 57. Shami GJ, Cheng D, Verhaegh P, Koek G, Wisse E, Braet F. Three-dimensional ultrastructure of giant mitochondria in human non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep.* 2021;11(1):1–14.
 58. Yan W, Diao S, Fan Z. The role and mechanism of mitochondrial functions and energy metabolism in the function regulation of the mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1):1–17.
 59. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell.* 2003;112(4):481-90.
 60. Viscomi C, Zeviani M. Mitochondria in health and disease. U: Chinnery PF, Keogh MJ, ur. *Clinical Mitochondrial Medicine.* Cambridge University Press; 2018. Str. 1–9.
 61. Mandal S, Lindgren AG, Srivastava AS, Clark AT, Banerjee U. Mitochondrial function controls proliferation and early differentiation potential of embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2011;29(3):486–95.
 62. Youle RJ, Van Der Blik AM. Good for discussion: mitochondrial fission, fusion, and

- stress. *Science*. 2012;337(6098):1062–5.
63. Seo BJ, Yoon SH, Do JT. Mitochondrial dynamics in stem cells and differentiation. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12).
 64. Hu C, Fan L, Cen P, Chen E, Jiang Z, Li L. Energy metabolism plays a critical role in stem cell maintenance and differentiation. *Int J Mol Sci*. 2016;17(2).
 65. Vardjan N, Chowdhury HH, Horvat A, Velebit J, Malnar M, Muhič M i sur. Enhancement of astroglial aerobic glycolysis by extracellular lactate-mediated increase in cAMP. *Front Mol Neurosci*. 2018;11:148.
 66. Shyh-Chang N, Ng HH. The metabolic programming of stem cells. *Genes Dev*. 2017;31(4):336–46.
 67. Iwata R, Casimir P, Vanderhaeghen P. Mitochondrial dynamics in postmitotic cells regulate neurogenesis. *Science*. 2020;369(6505):858–62.
 68. Murali Mahadevan H, Hashemiaghdam A, Ashrafi G, Harbauer AB. Mitochondria in neuronal health: from energy metabolism to Parkinson’s disease. *Adv Biol*. 2021;5(9).
 69. Takahashi S. Neuroprotective function of high glycolytic activity in astrocytes: common roles in stroke and neurodegenerative diseases. *Int J Mol Sci*. 2021;22(12):6568.
 70. Rose J, Brian C, Pappa A, Panayiotidis MI, Franco R. Mitochondrial metabolism in astrocytes regulates brain bioenergetics, neurotransmission and redox balance. *Front Neurosci*. 2020;14:1–20.
 71. Dembitskaya Y, Piette C, Perez S, Berry H, Magistretti PJ, Venance L. Lactate supply overtakes glucose when neural computational and cognitive loads scale up. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022;119(47).
 72. Biswas K, Alexander K, Francis MM. Reactive oxygen species: angels and demons in the Life of a Neuron. *NeuroSci*. 2022;3(1):130–45.
 73. Auten RL, Davis JM. Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details. *Pediatr Res*. 2009;66(2):121–7.
 74. Herz J, Bendix I, Felderhoff-Müser U. Peripheral immune cells and perinatal brain injury: a double-edged sword? *Pediatr Res*. 2022;91(2):392–403.

75. Allen KA, Brandon DH. Hypoxic ischemic encephalopathy: pathophysiology and experimental treatments. *Newborn Infant Nurs Rev.* 2011;11(3):125–33.
76. Lai MC, Yang SN. Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011.
77. Qin X, Cheng J, Zhong Y, Mahgoub OK, Akter F, Fan Y i sur. Mechanism and treatment related to oxidative stress in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Front Mol Neurosci.* 2019;12:88.
78. Han SB, Kim JK, Lee G, Kim DH. Mechanical properties of materials for stem cell differentiation. *Adv Biosyst.* 2020;4(11):1–17.
79. Khanlarkhani N, Baazm M, Mohammadzadeh F, Najafi A, Mehdinejadi S, Sobhani A. Multipotent stem cell and reproduction. *J Stem Cells.* 2016;11(4):219–29.
80. Nawaz M, Fatima F, Vallabhaneni KC, Penfornis P, Valadi H, Ekström K i sur. Extracellular vesicles: evolving factors in stem cell biology. *Stem Cells Int.* 2016;2016:1073140.
81. Alexander PG, Hofer HR, Clark KL, Tuan RS. Mesenchymal stem cells in musculoskeletal tissue engineering. U: Lanza R, Langer R, Vacanti J, ur. *Principles of tissue engineering.* Academic press; 2014. Str. 1171–1199.
82. Ruijtenberg S, van den Heuvel S. Coordinating cell proliferation and differentiation: antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression. *Cell Cycle.* 2016;15(2):196–212.
83. Baraniak PR, McDevitt TC. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regen Med.* 2010;5(1):121–43.
84. Berumen Sánchez G, Bunn KE, Pua HH, Rafat M. Extracellular vesicles: mediators of intercellular communication in tissue injury and disease. *Cell Commun Signal.* 2021;19(1):104.
85. Vogel A, Upadhy R, Shetty AK. Neural stem cell derived extracellular vesicles: Attributes and prospects for treating neurodegenerative disorders. *EBioMedicine.* 2018;38:273–82.
86. Lo B, Parham L. Ethical issues in stem cell research. *Endocr Rev.* 2009;30(3):204–13.

87. Zheng W, Li Q, Zhao C, Da Y, Zhang H-L, Chen Z. Differentiation of glial cells from hiPSCs: Potential applications in neurological diseases and cell replacement therapy. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:239.
88. 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.
89. 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.
90. Baker EW, Platt SR, Lau VW, Grace HE, Holmes SP, Wang L i sur. Induced pluripotent stem cell-derived neural stem cell therapy enhances recovery in an ischemic stroke pig model. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–15.
91. Ryu S, Lee SH, Kim SU, Yoon BW. Human neural stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and enhance angiogenesis in ischemic rat brain. *Neural Regen Res.* 2016;11(2):298–304.
92. Zhang R, Mao W, Niu L, Bao W, Wang Y, Yang Z i sur. NSC-derived exosomes enhance therapeutic effects of NSC transplantation on cerebral ischemia in mice. *Elife.* 2023;12:1–23.
93. 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.
94. Van Velthoven CTJ, Kavelaars A, Van Bel F, Heijnen CJ. Repeated mesenchymal stem cell treatment after neonatal hypoxia-ischemia has distinct effects on formation and maturation of new neurons and oligodendrocytes leading to restoration of damage, corticospinal motor tract activity, and sensorimotor function. *J Neurosci.* 2010;30(28):9603–11.
95. Xu J, Feng Z, Wang X, Xiong Y, Wang L, Ye L i sur. hUC-MSCs exert a neuroprotective effect via anti-apoptotic mechanisms in a neonatal HIE rat model. *Cell Transplant.* 2019;28(12):1552–9.
96. McDonald CA, Djuliannisaa Z, Petraki M, Paton MCB, Penny TR, Sutherland AE i sur. Intranasal delivery of mesenchymal stromal cells protects against neonatal

- hypoxic–ischemic brain injury. *Int J Mol Sci.* 2019;20(10):2449.
97. Ji G, Liu M, Zhao XF, Liu XY, Guo QL, Guan ZF i sur. NF- κ B signaling is involved in the effects of intranasally engrafted human neural stem cells on neurofunctional improvements in neonatal rat hypoxic-ischemic encephalopathy. *CNS Neurosci Ther.* 2015;21(12):926–35.
 98. Kaiser D, Otto NM, McCallion O, Hoffmann H, Zarrinrad G, Stein M i sur. Freezing medium containing 5% DMSO enhances the cell viability and recovery rate after cryopreservation of regulatory T cell products ex vivo and in vivo. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:1–12.
 99. Ahmed S, Gan HT, Chen SL, Poonepalli A, Ramasamy S, Tay Y i sur. Transcription factors and neural stem cell self-renewal, growth and differentiation. *Cell Adhes Migr.* 2009;3(4):412–24.
 100. Nie L, Yao D, Chen S, Wang J, Pan C, Wu D i sur. Directional induction of neural stem cells, a new therapy for neurodegenerative diseases and ischemic stroke. *Cell Death Discov.* 2023;9(1):215.
 101. Mercurio S, Serra L, Nicolis SK. More than just stem cells: functional roles of the transcription factor Sox2 in differentiated glia and neurons. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18).
 102. Park D, Xiang AP, Mao FF, Zhang L, Di CG, Liu XM i sur. Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem Cells.* 2010;28(12):2162–71.
 103. Sahlgren CM, Pallari HM, He T, Chou YH, Goldman RD, Eriksson JE. A nestin scaffold links Cdk5/p35 signaling to oxidant-induced cell death. *EMBO J.* 2006;25(20):4808–19.
 104. Bernal A, Arranz L. Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(12):2177–95.
 105. Bott CJ, McMahon LP, Keil JM, Choo Yap C, Kwan KY, Winckler B. Nestin selectively facilitates the phosphorylation of the lissencephaly-linked protein doublecortin (DCX) by cdk5/p35 to regulate growth cone morphology and Sema3a sensitivity in developing neurons. *J Neurosci.* 2020;40(19):3720–40.
 106. Strizek B. Perinatal brain damage - what the obstetrician needs to know. *J Perinat Med.* 2023;51(6):1–5.

107. Molloy EJ, Bearer C. Neonatal encephalopathy versus hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatr Res.* 2018;84(5):574.
108. Zhang L, Xu J, Han YF, Zhang HL, Li Y, Chen FL i sur. Detection of autophagic flux in primary cerebral cortical neurons after oxygen glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) using various methods. *J Chem Neuroanat.* 2021;117.
109. Zhang Y, Liu L, Hou X, Zhang Z, Zhou X, Gao W. Role of autophagy mediated by AMPK/DDiT4/mTOR axis in HT22 cells under oxygen and glucose deprivation/reoxygenation. *ACS Omega.* 2023;8(10):9221-29.
110. Wang R, Zhang X, Zhang J, Fan Y, Shen Y, Hu W i sur. Oxygen-glucose deprivation induced glial scar-like change in astrocytes. *PLoS One.* 2012;7(5).
111. Yin H, Qin H, Wang T, Zhuang Q, Yang Q. The protective effects of apremilast against oxygen–glucose deprivation/reperfusion (OGD/R)-induced inflammation and apoptosis in astroglia mediated by CREB/BDNF. *Neurotox Res.* 2021;39(3):754–63.
112. 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.
113. Choi NY, Kim JY, Hwang M, Lee EH, Choi H, Lee KY i sur. Atorvastatin rejuvenates neural stem cells injured by oxygen–glucose deprivation and induces neuronal differentiation through activating the PI3K/Akt and ERK pathways. *Mol Neurobiol.* 2019;56(4):2964–77.
114. Singh A, Chen R. The duration of oxygen and glucose deprivation (OGD) determines the effects of subsequent reperfusion on rat pheochromocytoma (PC12) cells and primary cortical neurons. *Int J Mol Sci.* 2023;24(8):7106.
115. Li YJ, Zhan Y, Li C, Sun J, Yang C. CPI-1189 protects neuronal cells from oxygen glucose deprivation/re-oxygenation-induced oxidative injury and cell death. *Aging (Albany NY).* 2021;13(5):6712–23.
116. Sall JW, Stratmann G, Leong J, Woodward E, Bickler PE. Propofol at clinically relevant concentrations increases neuronal differentiation but is not toxic to hippocampal neural precursor cells in vitro. *Anesthesiology.* 2012;117(5):1080–90.
117. San-Millán I. The key role of mitochondrial function in health and disease.

- Antioxidants. 2023;12(4):782.
118. Laaper M, Jahani-Asl A. Regulation of neural stem cell fate decisions by mitochondrial dynamics. *Neural Regen Res.* 2018;13(9):1548–49.
 119. Dubal D, Moghe P, Verma RK, Uttekar B, Rikhy R. Mitochondrial fusion regulates proliferation and differentiation in the type II neuroblast lineage in *Drosophila*. *PLoS Genet.* 2022;18(2).
 120. Quintana DD, Garcia JA, Sarkar SN, Jun S, Engler-Chiurazzi EB, Russell AE i sur. Hypoxia-reoxygenation of primary astrocytes results in a redistribution of mitochondrial size and mitophagy. *Mitochondrion.* 2019;47:244–55.
 121. O'Donnell JC, Jackson JG, Robinson MB. Transient oxygen/glucose deprivation causes a delayed loss of mitochondria and increases spontaneous calcium signaling in astrocytic processes. *J Neurosci.* 2016;36(27):7109–27.
 122. Ahmad T, Aggarwal K, Pattnaik B, Mukherjee S, Sethi T, Tiwari BK i sur. Computational classification of mitochondrial shapes reflects stress and redox state. *Cell Death Dis.* 2013;4(1):e461.
 123. Demarest TG, Waite EL, Kristian T, Puche AC, Waddell J, McKenna MC i sur. Sex-dependent mitophagy and neuronal death following rat neonatal hypoxia-ischemia. *Neuroscience.* 2016;335:103–13.
 124. Wappler EA, Institoris A, Dutta S, Katakam PVG, Busija DW. Mitochondrial dynamics associated with oxygen-glucose deprivation in rat primary neuronal cultures. *PLoS One.* 2013;8(5).
 125. Mironova GD, Pavlik LL, Kirova YI, Belosludtseva NV, Mosentsov AA, Khmil NV i sur. Effect of hypoxia on mitochondrial enzymes and ultrastructure in the brain cortex of rats with different tolerance to oxygen shortage. *J Bioenerg Biomembr.* 2019;51(5):329–40.
 126. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev.* 2014;94(3):909–50.
 127. Guo CY, Sun L, Chen XP, Zhang DS. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res.* 2013;8(21):2003–14.

128. Tirichen H, Yaigoub H, Xu W, Wu C, Li R, Li Y. Mitochondrial reactive oxygen species and their contribution in chronic kidney disease progression through oxidative stress. *Front Physiol.* 2021;12:1–12.
129. Reichert SA, Kim-Han JS, Dugan LL. The mitochondrial permeability transition pore and nitric oxide synthase mediate early mitochondrial depolarization in astrocytes during oxygen-glucose deprivation. *J Neurosci.* 2001;21(17):6608–16.
130. Liu F, Lu J, Manaenko A, Tang J, Hu Q. Mitochondria in ischemic stroke: new insight and implications. *Aging Dis.* 2018;9(5):924–37.
131. Agarwal S, Ganesh S. Perinuclear mitochondrial clustering, increased ROS levels, and HIF1 are required for the activation of HSF1 by heat stress. *J Cell Sci.* 2020;133(13).
132. Ward MW, Huber HJ, Weisová P, Düsselmann H, Nicholls DG, Prehn JHM. Mitochondrial and plasma membrane potential of cultured cerebellar neurons during glutamate-induced necrosis, apoptosis, and tolerance. *J Neurosci.* 2007;27(31):8238–49.
133. Korenic A, Boltze J, Deten A, Peters M, Andjus P, Radenovic L. Astrocytic mitochondrial membrane hyperpolarization following extended oxygen and glucose deprivation. *PLoS One.* 2014;9(2).
134. Wang S, Li H, Yuan M, Fan H, Cai Z. Role of AMPK in autophagy. *Front Physiol.* 2022;13.
135. He J, Liu J, Huang Y, Tang X, Xiao H, Hu Z. Oxidative stress, inflammation, and autophagy: potential targets of mesenchymal stem cells-based therapies in ischemic stroke. *Front Neurosci.* 2021;15:1–15.
136. Yoshii SR, Mizushima N. Monitoring and measuring autophagy. *Int J Mol Sci.* 2017;18(9):1–13.
137. Papadakis M, Hadley G, Xilouri M, Hoyte LC, Nagel S, Mcmenamin MM i sur. Tsc1 (hamartin) confers neuroprotection against ischemia by inducing autophagy. *Nat Med.* 2013;19(3):351–7.
138. Wang G, Wang T, Zhang Y, Li F, Yu B, Kou J. Schizandrin protects against OGD/R-induced neuronal injury by suppressing autophagy: involvement of the AMPK/mTOR pathway. *Molecules.* 2019;24(19):1–17.

139. Zhang X, Fu C, Chen B, Xu Z, Zeng Z, He L i sur. Autophagy induced by oxygen-glucose deprivation mediates the injury to the neurovascular unit. *Med Sci Monit.* 2019;25:1373–82.
140. Fritsch LE, Moore ME, Sarraf SA, Pickrell AM. Ubiquitin and receptor-dependent mitophagy pathways and their implication in neurodegeneration. *J Mol Biol.* 2020;432(8):2510–24.
141. Heo JM, Ordureau A, Paulo JA, Rinehart J, Harper JW. The PINK1-PARKIN mitochondrial ubiquitylation pathway drives a program of OPTN/NDP52 recruitment and TBK1 activation to promote mitophagy. *Mol Cell.* 2015;60(1):7–20.
142. Ding WX, Ni HM, Li M, Liao Y, Chen X, Stolz DB i sur. Nix is critical to two distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species-mediated autophagy induction and Parkin-ubiquitin-p62-mediated mitochondrial priming. *J Biol Chem.* 2010;285(36):27879–90.
143. Liu L, Feng D, Chen G, Chen M, Zheng Q, Song P i sur. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat Cell Biol.* 2012;14(2):177–85.
144. Wu W, Li W, Chen H, Jiang L, Zhu R, Feng D. FUNDC1 is a novel mitochondrial-associated-membrane (MAM) protein required for hypoxia-induced mitochondrial fission and mitophagy. *Autophagy.* 2016;12(9):1675–6.
145. Knecht T, Story J, Liu J, Davis W, Borlongan CV, Dela Peña IC. Adjunctive therapy approaches for ischemic stroke: innovations to expand time window of treatment. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12).
146. Huang L, Wong S, Snyder EY, Hamblin MH, Lee JP. Human neural stem cells rapidly ameliorate symptomatic inflammation in early-stage ischemic-reperfusion cerebral injury. *Stem Cell Res Ther.* 2014;5(6):129.
147. Nakazaki M, Sasaki M, Kataoka-Sasaki Y, Oka S, Namioka T, Namioka A i sur. Intravenous infusion of mesenchymal stem cells inhibits intracranial hemorrhage after recombinant tissue plasminogen activator therapy for transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosurg.* 2017;127(4):917–26.
148. He Z, Ning N, Zhou Q, Khoshnam SE, Farzaneh M. Mitochondria as a therapeutic

- target for ischemic stroke. *Free Radic Biol Med.* 2020;146:45–58.
149. Sun X, Jung JH, Arvola O, Santoso MR, Giffard RG, Yang PC i sur. Stem cell-derived exosomes protect astrocyte cultures from in vitro ischemia and decrease injury as post-stroke intravenous therapy. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:394.
 150. Xin H, Wang F, Li Y, Lu QE, Cheung WL, Zhang Y i sur. Secondary release of exosomes from astrocytes contributes to the increase in neural plasticity and improvement of functional recovery after stroke in rats treated with exosomes harvested from microRNA 133b-overexpressing multipotent mesenchymal stromal cells. *Cell Transplant.* 2017;26(2):243–57.
 151. Peruzzotti-Jametti L, Bernstock JD, Willis CM, Manferrari G, Rogall R, Fernandez-Vizarra E i sur. Neural stem cells traffic functional mitochondria via extracellular vesicles. *PLoS Biol.* 2021;19(4).
 152. Pryde KR, Smith HL, Chau KY, Schapira AHV. PINK1 disables the anti-fission machinery to segregate damaged mitochondria for mitophagy. *J Cell Biol.* 2016;213(2):163–71.

11. Životopis

Denis Jagečić rođen je 24.8.1993. u Zagrebu. Osnovnu školu i gimnaziju završio je u Oroslavju. 2017. godine diplomirao je *cum laude* na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu gdje je stekao titulu mag.exp.bio.

Od 2019. zaposlen je kao doktorand na projektu Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ): „Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“, pod mentorstvom prof. dr. sc. Dinka Mitrečića. Iste godine upisao je poslijediplomski studij Neuroznanosti na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Sudjelovao je u izvođenju nastave na hrvatskom i engleskom jeziku na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Dobitnik je stipendije Cost programa u sklopu koje se znanstveno usavršavao u Italiji. Sudjelovao je u izvođenju radionica u sklopu međunarodne ljetne škole CED-IADR Summer School 2019. Dobivene rezultate istraživanja prezentirao je na brojnim domaćim i međunarodnim kongresima.

Autor je pet radova indeksiranih u bazi Current Contents, od čega je prvi autor na jednom radu.