

Sveučilište u Zagrebu

Medicinski fakultet

Marko Gavrančić

**OKSIDATIVNI STRES IZAZIVA DVOLANČANE LOMOVE DNA ŽIVČANIH MATIČNIH STANICA
MIŠA I UBRZAVA NJIHOVU DIFERENCIJACIJU**

Zagreb, 2023.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Laboratoriju za matične stanice Hrvatskog instituta za istraživanje mozga, pod vodstvom prof. dr. sc. Dinka Mitrečića, u sklopu znanstvenog projekta „Matične stanice usne šupljine čovjeka za liječenje ishemijske bolesti mozga“ (Hrvatska zaklada za znanost, šifra projekta IP-2016-06-9451; voditelj projekta: prof. dr. sc. Dinko Mitrečić). Rad je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2022./2023.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Razvoj živčanog sustava	1
1.2. Živčane matične stanice i liječenje bolesti živčanog sustava.....	1
1.3. Struktura i oštećenja DNA	2
1.4. Oksidativni stres u živčanom sustavu	3
2. HIPOTEZA	5
3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	5
4. MATERIJALI I METODE	5
4.1. Izolacija, disocijacija i nasađivanje živčanih matičnih stanica miša.....	5
4.2. Djelovanje na stanice vodikovim peroksidom	7
4.3. Označavanje stanica markerom diobe, fiksiranje stanica i permeabilizacija membrane	8
4.4. Imunocitokemijska obrada stanica	8
4.5. Fotografiranje i mikroskopija.....	9
4.6. Analiza mikroskopskih fotografija i statistička analiza	9
5. REZULTATI.....	10
5.1. Izlaganje <i>in vitro</i> uzgajanih živčanih matičnih stanica oksidativnom stresu posredovanom vodikovim peroksidom uzrokuje smrt stanica.....	10
5.2. Izlaganje <i>in vitro</i> uzgajanih živčanih matičnih stanica oksidativnom stresu posredovanom vodikovim peroksidom uzrokuje povećanu učestalost dvolančanih lomova DNA.....	12
5.3. Izlaganje <i>in vitro</i> uzgajanih živčanih matičnih stanica oksidativnom stresu posredovanom vodikovim peroksidom smanjuje sintezu DNA i diobu stanica	13
5.4. Izlaganje <i>in vitro</i> uzgajanih živčanih matičnih stanica oksidativnom stresu posredovanom vodikovim peroksidom ubrzava njihovu diferencijaciju u smjeru neurona	15
5.5. Izlaganje <i>in vitro</i> uzgajanih živčanih matičnih stanica oksidativnom stresu posredovanom vodikovim peroksidom uzrokuje povećanje površine pojedinačnih stanica	17
6. RASPRAVA	19
7. ZAKLJUČCI.....	22
8. ZAHVALA	23
9. POPIS LITERATURE	23
10. SAŽETAK	27
11. SUMMARY	28
12. ŽIVOTOPIS	29

1. UVOD

Živčani sustav sudjeluje u kontroli svih drugih organskih sustava pa ima središnju ulogu u normalnom funkcioniranju ljudskog organizma. Anatomski ga dijelimo na središnji živčani sustav, kojeg čine mozak i kralježnična moždina te periferni živčani sustav, kojeg čine periferna živčana vlakna i gangliji. Funkcionalno ga tvore dva dijela: autonomni živčani sustav, kojem je uloga održavanje stalnih normalnih vrijednosti svih parametara organizma (homeostaza) te somatski živčani sustav, kojem je uloga osiguravanje i usklađivanje svih oblika ponašanja s okolinom. Kao središte koje upravlja ostatkom tijela, živčani sustav je predmet brojnih istraživanja, posebno stoga što bolesti živčanog sustava, uz kardiovaskularne i maligne bolesti, predstavljaju najveće opterećenje zdravstvenih sustava razvijenih zemalja (Feigin i ostali, 2020).

1.1. Razvoj živčanog sustava

Živčani se sustav započinje razvijati u trećem tjednu embrionalnog razvoja kao derivat ektoderma, vanjskog zametnog listića. Ektoderm zadebljava i formira neuralnu ploču čime počinje proces formiranja neuralne cijevi – neurulacija (Sadler, 2008). Lateralni rubovi neuralne ploče odižu se krajem 3. tjedna razvoja te se formira neuralna cijev. Zatvaranjem prednjeg i stražnjeg otvora cijevi prema amniotskoj šupljini neurulacija završava i nastaje osnova budućeg živčanog sustava. Na prednjem kraju neuralne cijevi formiraju se tri primarna moždana mjehurića, a iz prosencefalona, prednjeg mjehurića, razvija se telencefalon, preteča velikog mozga.

1.2. Živčane matične stanice i liječenje bolesti živčanog sustava

Živčane matične stanice (engl. *neural stem cells*, NSC) su stanice podrijetla ektoderma koje svojom diobom stvaraju jednu stanicu, koja ostaje istovjetna početnoj, te drugu, koja se može diferencirati u zrele oblike stanica u živčanom tkivu. Dijeljenjem živčanih matičnih stanica nastaje osnova živčanog sustava, a postepenom diferencijacijom dolazi do sazrijevanja u funkcionalni organski sustav. U odraslih se osoba živčani sustav gotovo u potpunosti sastoji od zrelih oblika stanica. Iznimku predstavljaju ograničena područja neurogeneze prisutne u najvećoj mjeri u *gyrus dentatus* hipokampusa te u subventrikularnoj zoni mozga uz lateralne komore. Neka novija istraživanja sugeriraju kako nezrele živčane stanice migriraju i u olfaktorni bulbus te u *striatum* čovjeka (Bergmann i ostali, 2015).

S obzirom na to da se neuroni ne dijele i nemaju mogućnost zamjene oštećenih stanica, suvremena znanost sve više istražuje mogućnosti liječenja živčanim matičnim stanicama, čijom bi se transplantacijom nadomjestile oštećene stanice u živčanom sustavu. Živčane matične stanice mogu se dobiti izolacijom matičnih stanica iz unutrašnjosti blastociste – preimplantacijskog razvojnog stadija ili iz kore fetalnog mozga (Baker i ostali, 2019). Dobivanje NSC moguće je i iz induciranih pluripotentnih matičnih stanica (engl. *induced pluripotent stem cells*, iPSC). Somatske stanice, npr. fibroblasti ili stanice periferne krvi, prisiljenom su ekspresijom određenih gena reprogramirane u pluripotentne matične stanice, koje se zatim mogu diferencirati u derivate bilo kojeg od tri zametna listića. Takve se stanice zatim diferenciraju u neurone te koriste za istraživanje raznih bolesti, kao što je npr. Alzheimerova bolest

istraživana u našoj grupi (Alić i ostali, 2021). Osim Alzheimerove bolesti, istraživanja temeljena na matičnim stanicama provode se i na modelima drugih degenerativnih bolesti živčanog sustava poput amiotrofične lateralne skleroze (Popescu i ostali, 2013; Nicaise i ostali, 2011; Mitrečić i ostali, 2022). Tako je, primjerice, pokazano da transplantacija NSC u pacijenata koji boluju od ALS dovodi do barem prolaznog usporavanja bolesti (Mazzini i ostali, 2019). Još značajniji pozitivni učinci opisani su u pacijenata s multiplom sklerozom (Harris i ostali, 2018).

Transplantacija živčanih matičnih stanica se kao terapijski pristup razvija velikim koracima, a terapijski učinak se može pripisati višestrukim mehanizmima: a) imunomodulatorni učinak, smanjujući imunološki odgovor na ciljanom mjestu transplantacije (Henriques i ostali, 2019), b) sekrecijom različitih neurotrofnih faktora poput moždanog neurotrofnog čimbenika (engl. *brain derived neurotrophic factor*, *BDNF*) ili živčanog čimbenika rasta (engl. *neurotrophic growth factor*, *NGF*) za koje se zna kako potiču obnovu i smanjuju oštećenje, c) zamjena odumrlih stanica novima što se temelji na sposobnosti matičnih stanica da se diferenciraju u zreli stanični tip. Diferencijacijom u zrele oblike živčanih stanica, matične stanice omogućuju uklapanje novih stanica na mjesto starih, diferenciranje u prikladnu vrstu stanica i samim time i oporavak funkcije oštećenog tkiva. To je npr. pokazano u oporavku strijatalne funkcije u modelu Parkinsonove bolesti na štakorima nakon transplantacije matičnih stanica (Bjorklund i ostali, 2002).

Jedan od osnovnih problema u transplantacijskoj medicini koja koristi matične stanice jest to što se transplantirane stanice suočavaju s nepovoljnim okruženjem upalnog odgovora na mjestu oštećenja tkiva. Zajedničkim djelovanjem upalnih stanica, disfunkcije mitohondrija i manjka antioksidativnih enzima, stvara se toksično okruženje koje ima za cilj odstranjenje patogena i uzroka bolesti, ali kao nuspojavu donosi oštećenje vlastitog tkiva i zdravih stanica. U takvom okruženju, koje je odgovorno za propadanje transplantiranih matičnih stanica (Mitrečić i ostali, 2010), najznačajniju ulogu ima oksidativni stres. Naša je grupa pokazala kako oksidativni stres negativno djeluje na mezenhimalne matične stanice (Mijiritsky i ostali, 2019), a u ovom istraživanju uspostavili smo *in vitro* model oksidativnog stresa te smo istražili učinke takvog okruženja na nezrele neurone.

1.3. Struktura i oštećenja DNA

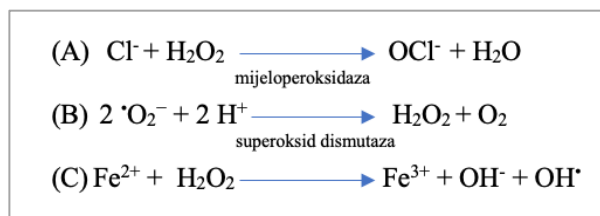
Deoksiribonukleinska kiselina (DNA) spiralna je struktura građena od dva međusobno povezana lanca. Nosi osnovni genetski kod i prisutna je u svim stanicama u organizmu. U svojoj dvolančanoj strukturi, DNA se sastoji od dušičnih baza - adenina (A), timina (T), citozina (C) i gvanina (G). DNA se sintetizira nizanjem dušičnih baza jedne za drugom u lancu, a dva su lanca međusobno povezana parovima dušičnih baza A-T, C-G. Sinteza DNA preduvjet je za udvostručenje stanične jezgre, što je ključan korak u diobi stanica – mitozu.

Spontano i ionizirajućim zračenjem, ali u najvećoj mjeri djelovanjem slobodnih radikala, može doći do lomova u strukturi DNA. Lomovi samo jednog od lanaca DNA jednostavniji su za popravak, s obzirom da se očuvani lanac može iskoristiti kao kalup za popravak te stanica može u oštećeni lanac postaviti dušičnu bazu koja se sparuje s

odgovarajućom bazom očuvanog lanca (A-T, C-G). Popravak takvih oštećenja precizan je i ne uzrokuje trajne posljedice za stanicu. Lomovi koji zahvaćaju oba lanca mnogo se teže popravljaju. To se može postići na dva načina. Prvi način je popravak homolognom rekombinacijom, odnosno postupkom u kojem se lanci DNA molekule istovjetne prelomljenoj DNA razdvajaju te služe kao kalup za popravak oba prelomljena lanca. Na taj način popravak ne uzrokuje pogreške u slijedu baza. Drugi način popravka dvolančanog loma, koji je opasniji po stanicu, uključuje nehomologno spajanje lanaca. U tom se postupku izravno spajaju prelomljeni krajevi lanaca DNA pa takav popravak uzrokuje česte pogreške u slijedu baza u lancu. Nakupljanjem takvih grešaka dolazi do nakupljanja mutacija u genomu i stanične smrti. Unatoč tome što je neprecizan, nehomologni način spajanja lanaca je prva linija popravka dvolančanih lomova DNA jer je brz i time značajno ne remeti stanično funkcioniranje (Colombowala i Samudravijay, 2022). U dvolančanim lomovima DNA dolazi do fosforilacije histona H2AX, najčešće pomoću kinaze ATM (engl. *ataxia teleangiectasia mutated*). Fosforilirani oblik H2AX histona, γ H2AX, služi kao oznaka enzimima za popravak odnosno upućuje ih na mjesto gdje se dogodio dvolančani lom pa je zato važan signal za prvu liniju popravka dvolančanih lomova – nehomologno spajanje. S obzirom na to da γ H2AX sudjeluje u popravku svih dvolančanih DNA lomova koristi se kao izravni marker dvolančanih lomova DNA (Kuo i Yang, 2008).

1.4. Oksidativni stres u živčanom sustavu

Reaktivne vrste kisika (engl. *reactive oxygen species*, ROS) su molekule koje imaju snažan oksidacijski učinak, a nastale su iz dvoatomnog kisika (O_2). Reaktivne vrste kisika sastoje se od slobodnih radikala i neradikalnih oksidacijskih molekula. Slobodni radikali su molekule s nesparenim elektronom u vanjskoj ljusci koji toj molekuli daje svojstvo velike reaktivnosti s okolnim molekulama u cilju popunjavanja svoje elektronske orbitale. Neki od slobodnih radikala su superoksidni anion (O_2^-), hidroksilni radikal (OH^\cdot) i hipokloritni radikal (OCl^\cdot). Reakcijom radikala i okolnih molekula stvaraju se novi radikali te se pokreće lančana reakcija koja dovodi do teških poremećaja stanične funkcije. U neradikalne oksidacijske molekule svrstavaju se hipokloritna kiselina (HOCl) i vodikov peroksid (H_2O_2). **Vodikov peroksid** se ističe po tome što je medijator u brojnim reakcijama obrtaja ROS (Gamulin i ostali, 2011). Nastaje u procesu neutralizacije superoksidnog aniona superoksidnom dismutazom (Slika 1B.), u reakciji kataliziranoj mijeloperoksidazom sudjeluje kao reaktant u nastanku hipokloritnog radikala (Slika 1A.), u reakciji s dvovalentnim željezom tvori hidroksilni radikal (Slika 1C.), a razgrađuje se djelovanjem enzima katalaze.



Slika 1. Reakcije vodikovog peroksida u obrtaju reaktivnih vrsta kisika.

Povećano nakupljanje ROS može nastati u snažnoj aktivaciji imunostanih stanica, mutacijama superoksid-dismutaze, manjku kisika kao primatelja elektrona u mitohondrijima, manjku glutationa u organizmu u te brojnim drugim stanjima u bolestima različitih organskih sustava.

Suvišak ROS koji se nakuplja uzrokuje oštećenja DNA, peroksidaciju lipida i perforaciju stanične membrane, mijenja funkciju pojedinih proteina u stanici i membrani te sveukupno uzrokuje poremećaj stanične funkcije i vodi u smrt stanice (Gamulin i ostali, 2011). Tako je i naša grupa pokazala kako je oksidativni stres u središtu poremećaja diferencijacije i organizacije stanica i tkiva nakon zahvata u usnoj šupljini (Mijiritsky i ostali, 2019).

Oksidativni stres poveznica je između mnogih bolesti živčanog sustava, a ovdje ćemo opisati neke najvažnije. **Amiotrofična lateralna skleroza** je neurodegenerativna bolest motoričkih neurona. Nakon početne faze u kojoj dolazi do blage slabosti mišića udova, progresijom bolesti osobe se ne mogu samostalno kretati, neke pacijente zahvaća slabost mišića lica i glave što se manifestira otežanim gutanjem i govorom, razvija se respiratorna insuficijencija koja uzrokuje smrtni ishod. U patogenezi bolesti kao jedna od važnih točaka ističe se mutacija superoksid-dismutaze, koja dovodi do nakupljanja superoksidnog radikala, oksidativnog stresa i degeneracije motoričkih neurona (Wijesekera i Leigh, 2009). **Multipla skleroza** je autoimuna bolest središnjeg živčanog sustava u kojoj dolazi do razaranja mijelinske ovojnice neurona. Klinički se prezentira poremećajima vida zbog upale vidnog živca i oštećenjima kralježnične moždine s posljedičnim ispadima osjeta i motoričke funkcije (Ghasemi i ostali, 2017). Mehanizmi razaranja mijelina su višestruki, a među njima se ističe pojačano nakupljanje upalnih stanica i otpuštanje ROS kao posljedica autoimune reakcije na vlastiti antigen te disfunkcija mitohondrija čime se remeti prijenos elektrona na kisik i pojačano se stvaraju kisikovi radikali. **Parkinsonova bolest** je neurodegenerativna bolest uzrokovana oštećenjem dopaminergičkih neurona u bazalnim ganglijima. Bolest je karakterizirana tremorom u mirovanju, izrazitom usporenošću pokreta, povećanjem mišićnog tonusa i nestabilnošću u uspravnom položaju. Kao uzrok bolesti ističe se razaranja *supstancije nigre* u bazalnim ganglijima gdje su koncentrirani neuroni koji izlučuju dopamin u *striatum*, a uzrok oštećenja je interakcija genetske predispozicije i okolišnih čimbenika što uzrokuje poremećaj funkcije mitohondrija, pojačano stvaranje ROS i posljedičnu degeneraciju neurona (Brinar i ostali, 2019). **Ishemijski moždani udar** nastaje zbog začepjenja moždane arterije koja dovodi do ishemije dijela moždanog tkiva i nastanka zone mrtvog tkiva – zone infarkta. Zona koja okružuje zonu infarkta naziva se *penumbra* te se privremeno opskrbljuje kolateralnom cirkulacijom, no s vremenom postaje dio zone infarkta, što objašnjava suvremene smjernice za liječenje ishemijskog moždanog udara: unutar 4 sata i 30 minuta pomoću intravenske trombolize, odnosno unutar 6 sati pomoću mehaničke trombektomije. Dugotrajna hipoksija unutar stanice uzrokuje smanjenje aktivnosti superoksid-dismutaze i katalaze te istovremeno pojačanje aktivnosti ksantinske oksidaze, enzima koji metabolizacijom hipoksantina i ksantina kao nusproizvod stvara superoksidni radikal. Otvaranje krvne žile nakon 6 sati uzrokuje nagli dotok kisika te doprema veliku količinu molekularnog kisika aktiviranoj ksantinskoj oksidazi, time pojačava stvaranje ROS i uzrokuje tzv. reperfuzijsku ozljedu. Usprkos adekvatnom i pravovremenom liječenju, istraživanja su pokazala da je viša razina nastalog oksidativnog stresa u moždanom tkivu u pacijenata liječenih trombolitičkom terapijom povezana s lošijom prognozom i višom smrtnosti (Pawluk i ostali, 2022).

Za sve navedene bolesti suvremena znanost na *in vivo* životinjskim modelima ispituje transplantaciju živčanih matičnih stanica kao opciju za liječenje. S obzirom na to da je svim ovim bolestima **oksidativni stres zajednička komponenta patogenetskog procesa**, u ovom smo istraživanju razvili *in vitro* model oksidativnog stresa posredovan vodikovim peroksidom. U kombinaciji s nezrelim stanicama živčanog sustava, odlučili smo istražiti kako oksidativni stres djeluje na transplantirane matične stanice i nezrele stanice živčanog sustava te smo istražili utjecaj oksidativnog stresa na dvolančane lomove DNA i pratili osnovne funkcije matičnih stanica: preživljenje, diobu i diferencijaciju.

2. HIPOTEZA

Izlaganje živčanih matičnih stanica oksidativnom stresu u *in vitro* modelu posredovanom vodikovim peroksidom povećat će broj dvolančanih DNA lomova i smanjiti preživljenje, diferencijaciju i proliferaciju živčanih matičnih stanica.

3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Opći cilj rada bio je istražiti kako će nezrele preteče stanice živčanog sustava reagirati na oksidativni stres izazvan izlaganjem vodikovom peroksidu.

Specifični ciljevi rada:

1. Odrediti vremenski period tretiranja i vrijednosti vodikovog peroksida kojim će biti tretirane pojedine skupine stanica.
2. Istražiti utjecaj vodikovog peroksida na preživljenje živčanih matičnih stanica.
3. Istražiti utjecaj vodikovog peroksida na učestalost dvostrukih lomova DNA.
4. Istražiti utjecaj vodikovog peroksida na sintezu DNA i diobu živčanih matičnih stanica.
5. Istražiti utjecaj vodikovog peroksida na diferencijaciju živčanih matičnih stanica.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Izolacija, disocijacija i nasadivanje živčanih matičnih stanica miša

Živčane matične stanice dobivene su iz zametaka miša. Gravidna mišica 14. je dana trudnoće žrtvovana postupkom cervikalne dislokacije – povlačenjem repa i vrata u suprotnim smjerovima, čime se prekida kontinuitet kralježnične moždine i životinja se trenutno usmrćuje. Tkivo maternice odloženo je u posudicu s fosfatnim puferom (phosphate buffer saline, PBS) koncentracije 0.1M i vrijednosti Ph 7.4. Iz oba roga maternice izolirani su embriji te su odloženi u zasebnu posudicu s PBS-om.

Sagitalnim prerezom otvoren je mozak, izolirani su telencefaloni, prebačeni su u treću posudu s PBS-om u kojoj su izrezani škaričama kako bi se dobila gruba suspenzija stanica. Pomoću pipete od 1000 µl odrezanog vrha suspenzija stanica prebačena je u tubicu volumena 50 ml (proizv. Falcon) te je zatim dodana akutaza (StemPro Accutase, proizv. Gibco), proteolitički enzim koji grubu suspenziju stanica dodatno usitnjava odvajajući međusobno spojene stanice, u volumenu od 0.5ml po izoliranom telencefalonu. Nakon 30 minuta inkubacije u akutazi, sadržaj tubice je aspiriran pipetom i prebačen u novu tubicu pri čemu je tkivo koje nije disociralo ostavljeno na dnu. U volumenu jednakom volumenu dodane akutaze, u tubicu je zatim dodan DMEM/F-12 za neutralizaciju akutaze te je tubica centrifugirana 6 minuta na 340g. Supernatant je odliven, a stanice su resuspendirane u unaprijed pripremljenom mediju za rast u volumenu 2 mL. Medij za rast sastoji se od Penicilin/Streptomocina za zaštitu od mikrobnih agensa, N2, B27 i DMEM/F-12, što su tri mješavine zaštićenog sastava, epidermalnog čimbenika rasta (engl. *epidermal growth factor*, EGF), fibroblastnog čimbenika rasta (engl. *fibroblast growth factor*, FGF) te pufera sulfonske kiseline (engl. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, HEPES). Svi sastojci medija bili su proizvođača Gibco.

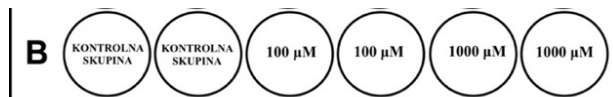
Suspenzija stanica je pomoću pipete prebačena u T75 posudu za uzgoj stanica, volumena 75 cm² (proizv. Falcon). T75 posuda za uzgoj postavljena je u inkubator na 37 °C i 5% CO₂. Nakon 2 dana, praćenjem stanica na svjetlosnom mikroskopu pronađene su neurosfere – kuglaste nakupine stanica veličine 150 - 200 µm te su u tom stadiju disocirane enzimom akutazom kao i pri izolaciji stanica i zatim ponovno s medijem za rast prebačene u T75 posudu za uzgoj. Time je dovršena druga pasaža, a za potrebe ovog istraživanja nasadene su stanice nakon treće pasaže, s jedinom razlikom što se u zadnjoj pasaži umjesto medija za rast koristi medij za nasadivanje, koji je po sastavu različit od medija za rast prema izostanku EGF-a iz sastava, korištenju B27+ umjesto B27 te po postotnom udjelu FGF-a (1% umjesto 0,2%). Stanice su prebrojane u Neubauerovoj komorici pomoću 90 µL otopine tripsanskog modrila u PBS-u (1:2). Dobivena je koncentracija od 50.000 stanica po mililitru medija za nasadivanje.

Za potrebe ovog istraživanja, potrebno je bilo dobiti stanice u što ranijem stadiju diferencijacije, koje se onda mogu tretirati vodikovim peroksidom i zatim nakon 24 sata pripremiti za potrebe izrade imunocitokemijskih preparata. U ovom istraživanju korištene su stanice drugog dana diferencijacije (D2). Kako bi se omogućila što bolja vizualizacija stanica na konfokalnom mikroskopu, za nasadivanje stanica pripremljena su okrugla stakalca promjera 12 milimetara. Preko noći su ostavljena u 65% koncentriranoj dušičnoj kiselini, zatim isprana sterilnom vodom četiri puta po sat vremena i na kraju sterilizirana u peći na 180°C kroz četiri sata. U posudu za nasadivanje stanica s 24 odjeljka (proizv. Falcon) postavljeno je po jedno stakalce u svaki željeni odjeljak (B1-B6). Priprema stakalaca za nasadivanje započela je s inkubacijom 24 sata u poli-d-lizinu (PDL, proizv. Gibco), aminokiselini koja služi kao podloga, otopljenom u sterilnoj vodi u koncentraciji 50 µg/ml, 500 µL po odjeljku. Nakon ispiranja PDL-a sterilnom vodom 3 puta po 10 minuta, 500 µL po odjeljku, stakalca su iduća 2 sata inkubirana u otopini laminina, proteina bazalne membrane u tkivima koji omogućuje adheziju stanica, u koncentraciji 10 µg/ml otopljenog u DPBS-u (Dulbecco's PBS, proizv. Thermo Fisher), 350 µL po odjeljku.

Laminin je ispran zagrijanim (37°C) medijem za nasađivanje kroz 5 minuta, zatim je medij za nasađivanje uklonjen te su stanice nasađene u 1 ml medija za nasađivanje po odjeljku, u koncentraciji 50.000 stanica po mililitru medija za nasađivanje.

4.2. Djelovanje na stanice vodikovim peroksidom

Stanice nasađene u 6 odjeljaka podijeljene su u tri skupine od dva tehnička replikata – dva identična odvojena odjeljka posude. Za potrebe usporedbe učinaka vodikovog peroksida na stanice, dvije skupine stanica tretirane su različitim koncentracijama vodikovog peroksida. Jedna skupina bila je kontrolna - nije joj dodan vodikov peroksid, već *aqua pro injectione* (API) sterilizirana voda bez pirogena. Druga skupina stanica tretirana je vodikovim peroksidom u koncentraciji 100 µM. Treća skupina je tretirana koncentracijom vodikovog peroksida od 1000 µM. S obzirom na to da su u brojnim istraživanjima koncentracije vodikovog peroksida od 50 µM do 500 µM vidljivo uzrokovale različite oblike stanične smrti (Sanghai i Tranmer, 2021) te da je koncentracija 100 µM vodikovog peroksida u jednom istraživanju uzrokovala smrt u dijelu lokalne populacije stanica (Konyalioglu i ostali, 2013), za nižu koncentraciju vodikovog peroksida odabrano je 100 µM. Za višu koncentraciju vodikovog peroksida odabrana je koncentracija od 1000 µM koja će, kao deseterostruko uvećanje prethodne koncentracije, dati adekvatnu mogućnost promatranja učinka porasta koncentracije vodikovog peroksida na stanice. Za trajanje inkubacije stanica u vodikovom peroksidu odabrano je 24 sata kako bi stanice imale dovoljno vremena za diferenciranje iz drugog u treći dan (D3) i kako bi se omogućio dovoljno dug vremenski period za nastanak promjena koje se mogu detektirati imunofluorescencijom.



Slika 2. Shematski prikaz skupina nasađenih stanica tretiranih vodikovim peroksidom.

Vodikov peroksid koji je korišten bio je tvornički otopljen u vodi s masenim udjelom 30% i koncentracijom 9,791M (proizv. Sigma – Aldrich). Ciljne koncentracije u staničnim odjeljcima bile su 100 µM i 1000 µM, no s obzirom na to da bi to zahtijevalo pipetiranje iznimno malih volumena peroksida koji nisu precizno mjerljivi, prvo je stvorena međuotopina vodikovog peroksida otapanjem 1 µL tvorničke otopine vodikovog peroksida u 99 µL API te je dobiveno 100 µL međuotopine koncentracije 0,09791M. Prije dodavanja vodikovog peroksida i API, iz svih je odjeljaka uklonjeno 10,213 µL medija za nasađivanje s ciljem da se, nakon dodavanja odgovarajućih volumena vodikovog peroksida u skupinama B3-B4 i B5-B6 (Slika 2.), u svim odjeljcima pojavi podjednako razrjeđenje medija za nasađivanje. Kako bi se postigla ciljane koncentracije vodikovog peroksida od 1000 µM, u odjeljke B5 i B6 dodano je 10,213 µL međuotopine. Za postizanje koncentracije 100 µM vodikovog peroksida, u odjeljke B3 i B4 dodano je 1,0213 µL međuotopine i 9,1917 µL API. U kontrolnu skupinu dodano je 10,213 µL API. Stanice su vraćene u inkubator na 37 °C i 5% CO₂ te su tamo ostavljene 24 sata do završne imunocitokemijske obrade.

4.3. Označavanje stanica markerom diobe, fiksiranje stanica i permeabilizacija membrane

Za označavanje stanica koje se dijele korišten je Click-iT® Plus EdU Imaging Kit, iz kojeg su prema uputama proizvođača stvorene odgovarajuće otopine. Glavna tvar prve otopine je 5-etinil-2'-deoksiuridin (EdU) - nukleozidni analog timidina, sastavne komponente u ustroju DNA koja u svojoj strukturi sadrži dušičnu bazu timin. S obzirom na sličnost s timidinom, EdU se ugrađuje u DNA pri njenoj sintezi. Dimetilsulfoksid (DMSO) organsko je otapalo koje čini ostatak prve otopine koja služi ugrađivanju EdU u stanice koje se dijele. Nakon prethodnog uklanjanja polovice medija za nasadivanje iz svakog odjeljka (500 µL), dodan je jednaki volumen prve otopine koncentracije EdU 2 µM pa je konačna koncentracija EdU, po odjeljku posude sa stanicama, bila 1 µM. Stanice su u toj otopini inkubirane 15 minuta, a zatim isprane PBS-om. U drugoj, aktivacijskoj otopini ključna tvar bila je Alexa Fluor® pikolil azid, specifična fluorescentna proba, koja omogućuje detekciju signala na fluorescentnom mikroskopu pri određenoj valnoj duljini. Bakar služi kao katalizator reakcije u kojoj se kovalentno vežu alkin u strukturi EdU i pikolil azid fluorescentne probe. U sastav aktivacijske otopine ulazi i Click-iT® EdU aditivni pufer nespecificiranog sastava koji se dobiva dodatkom deionizirane vode u tvorničku tubicu. Zadnja komponenta aktivacijske otopine je Click-iT® EdU reakcijski pufer nespecificiranog sastava. Aktivacijska otopina dodana je nakon fiksiranja i permeabilizacije stanica.

Za pohranu stanica u zatečenom stanju nakon 24 sata izloženosti vodikovom peroksidu korištena je metoda fiksacije pomoću 4% otopine paraformaldehida (PFA). Medij iz odjeljaka posude je uklonjen te je dodano 500 µL 4% PFA po odjeljku na 10 minuta, koji je zatim ispran 3 puta po 10 minuta s 500 µL PBS-a po odjeljku. Kako bi se za imunocitokemiju omogućio pristup molekulama unutar stanice, korištena je metoda permeabilizacije membrane pomoću 0,2% otopine Triton X-100 u PBS-u. Otopina je dodana u volumenu 500 µL po odjeljku te ostavljena 10 minuta, a zatim dvaput isprana s po 500 µL PBS-a, svaki put po 5 minuta. Nakon dovršene permeabilizacije, iz svih odjeljaka je uklonjen PBS, a dodana je aktivacijska otopina za EdU u volumenu od 300 µL po odjeljku te su stanice tako inkubirane kroz 30 minuta pri čemu je posuda bila omotana aluminijskom folijom kako bi se fluorescentna proba zaštitila od vanjskog svjetla. Bakrom katalizirana reakcija dovela je do stvaranja kovalentne veze između alkina u EdU i pikolil azida fluorescentne probe te nam je time omogućena detekcija fluorescencije na konfokalnom mikroskopu u odgovarajućoj valnoj duljini. Detekcija fluorescentnog signala EdU ukazuje na ugradnju EdU u DNA za vrijeme sinteze što je ključan korak stanične diobe. Aktivacijska otopina je nakon 30 minuta uklonjena te je odmah započeta imunocitokemijska obrada stanica.

4.4. Imunocitokemijska obrada stanica

Za potrebe označavanja protutijelima za imunocitokemiju, prvi korak je bio blokiranje serumom životinje iz koje su dobivena sekundarna protutijela otopljenog 3% u PBS-u. Stanice su inkubirane 3% otopinom seruma magarca u PBS-u, 500 µL po odjeljku, kroz 2 sata. Nakon ispiranja PBS-om, uslijedilo je dodavanje primarnih protutijela u odjeljke sa stanicama. Korištena su dva primarna protutijela.

Prvo protutijelo bilo je anti-DCX (Abcam, 1:100) koje veže doublecortin (DCX), protein staničnih mikrotubula specifičan za prijelaz živčanih matičnih stanica u rane neurone (Francis i ostali, 1999).

Drugo protutijelo bilo je anti- γ H2AX (Cell Signaling Technology, 1:1000) protutijelo koje veže fosforiliranu inačicu H2AX histona, proteina koji služi namatanju DNA u jezgri te se koristi kao marker dvolančanog DNA loma pri kojemu se fosforilira. Stanice su inkubirane 3% otopinom primarnih protutijela u serumu, u odgovarajućim razrjeđenjima, preko noći na 4°C. Nakon ispiranja primarnih protutijela PBS-om, stanice su inkubirane s dvama sekundarnim IgG protutijelima, jedno koje se veže na anti-DCX protutijelo, podrijetla magarca (Alexa Fluor™ 488, 1:1000) te drugo koje se veže na anti- γ H2AX protutijelo, podrijetla magarca (Alexa Fluor™ 647, 1:1000). Oba sekundarna protutijela su otopljena 3% u magarećem serumu te su stanice tako inkubirane kroz 2 sata i zatim isprane 3 puta po 5 minuta s 500 μ L PBS-a po odjeljku. Za označavanje jezgre korišten je 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) koji se veže u dvolančanu DNA interkalacijom u područja bogata adeninom i timinom (Chazotte, 2011). Nakon ispiranja sekundarnih protutijela PBS-om, stanice svih triju skupina inkubirane su s DAPI (1:20000) otopljenim u vodi kroz 10 minuta, zatim ponovno ispirane PBS-om 3 puta po 5 minuta, 500 μ L po odjeljku. Stakalca sa stanicama montirana su na predmetna stakalca, po dva tehnička replikata na isto predmetno stakalce te su preparati stavljeni na sušenje u hladnjak na 4°C.

4.5. Fotografiranje i mikroskopija

Stanice u posudi za nasadivanje s odjeljcima fotografirane su u posudi za nasadivanje, pomoću Motic Cam kamere postavljene na invertni svjetlosni mikroskop. Točno 24 sata nakon tretiranja vodikovim peroksidom, a prije daljnje obrade stanica, nasumičnim odabirom vidnog polja fotografirana je jedna fotografija po odjeljku sa stanicama. Mikroskopiranje pripremljenih imunocitokemijskih preparata rađeno je Olympus FV3000 fluorescentnim konfokalnim mikroskopom u 4 kanala različitih valnih duljina: 405 nm (za vizualizaciju DAPI), 488 nm (za vizualizaciju DCX), 561 nm (za vizualizaciju EdU) i 640 nm (za vizualizaciju γ H2AX). Nasumičnim odabirom vidnog polja, na uvećanju 20x uslikane su po 3 fotografije za svaku skupinu stanica pri čemu barem jedna iz svakog tehničkog replikata, a ukupno 9 fotografija. Na uvećanju 60x uslikane 4 fotografije – dvije iz kontrolne skupine stanica i dvije iz skupine tretirane višom koncentracijom vodikovog peroksida.

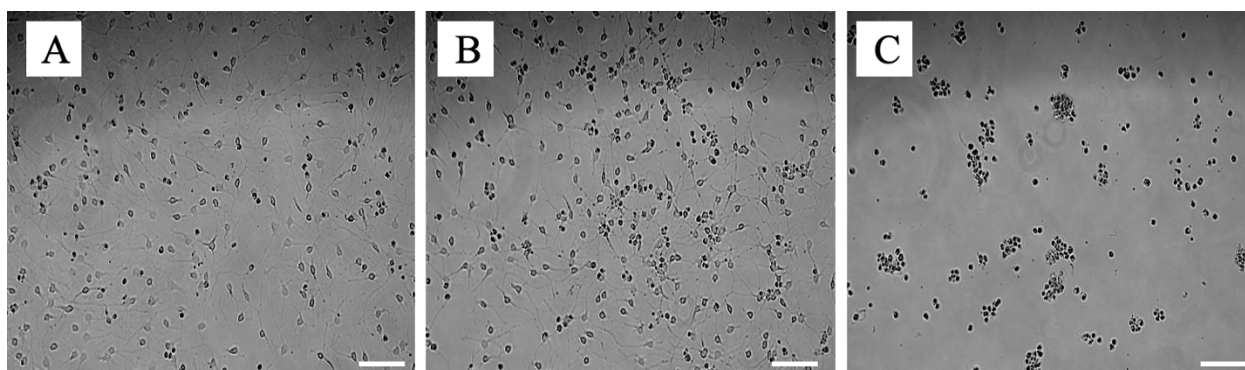
4.6. Analiza mikroskopskih fotografija i statistička analiza

Fotografije poslikane invertnim svjetlosnim mikroskopom točno 24 sata nakon tretiranja vodikovim peroksidom su pregledane te su napravljene međusobne usporedbe fotografija između skupina za opažanje vidljivih promjena u morfologiji stanica i jezgara. Za obradu slika s konfokalnog mikroskopa korišten je program za obradu slika ImageJ – Fiji. Analiza slika je odrađena za svaki kanal posebno. Ulazni podaci za svaki kanal bile su slike s konfokalnog mikroskopa, uvećanja 20x, spremljene u zajedničku mapu, a kao izlazna datoteka dobivena je tablica s podacima za odgovarajući kanal iz svake slike. Tablice podataka koje su dobivene su statistički obrađene metodom jednosmjerne analize varijance (ANOVA) te su za sve kanale (DAPI, γ H2AX, EdU, DCX) dobivene vrijednosti $p < 0.05$. Statistička značajnost unutar pojedinog kanala provjerena je Tukeyjevim post-hoc testom, u kojem je usporedba skupina stanica bila statistički značajna ukoliko je razlika srednjih vrijednosti između dviju skupina bila veća od vrijednosti HSD ('*honest statistical difference*') izračunate po formuli.

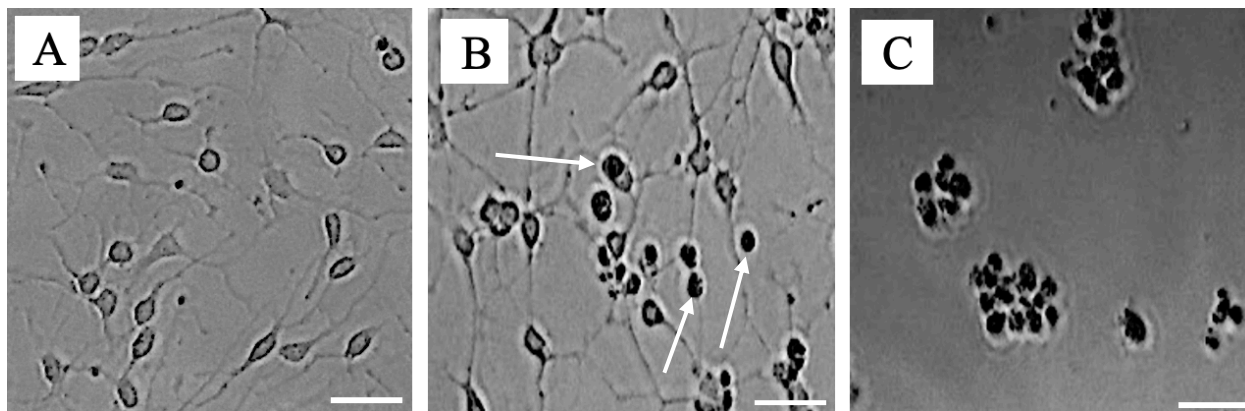
5. REZULTATI

5.1. Izlaganje *in vitro* uzgajanih živčanih matičnih stanica oksidativnom stresu posredovanom vodikovim peroksidom uzrokuje smrt stanica

Fotografije stanica uslikane svjetlosnim mikroskopom (Slika 3.) 24 sata nakon tretiranja vodikovim peroksidom, u skupini tretiranoj nižom koncentracijom vodikovog peroksida prikazale su uvećan broj skvrčenih, odnosno piknotičnih jezgara i nastanak prostora bez pričvršćenih stanica ili staničnih nastavaka (Slika 3B). U skupini tretiranoj višom koncentracijom vodikovog peroksida, gotovo nijedna stanica više nije bila pričvršćena za podlogu (Slika 3C), a dominirale su piknotične jezgre (Slika 4C).

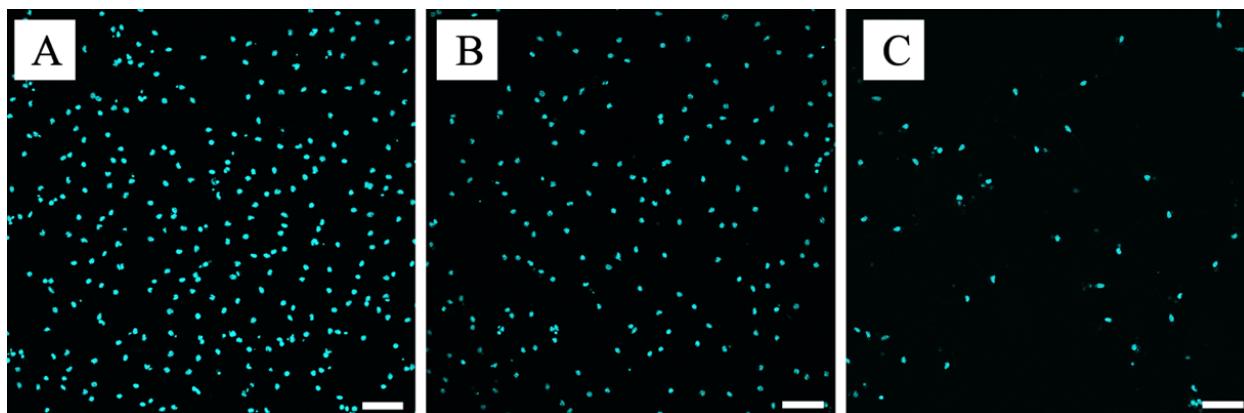


Slika 3. Stanice 24 sata nakon tretiranja vodikovim peroksidom. Kod niže koncentracije vodikovog peroksida (B) se uočava heterogenost u obliku stanica, dok se kod više koncentracije (C) jasno vidi smanjen broj stanica te njihovo grupiranje u male nakupine. A – kontrolna skupina, B - 100 µM vodikov peroksid, C - 1000 µM vodikov peroksid. Crta mjerila – 50 µm.



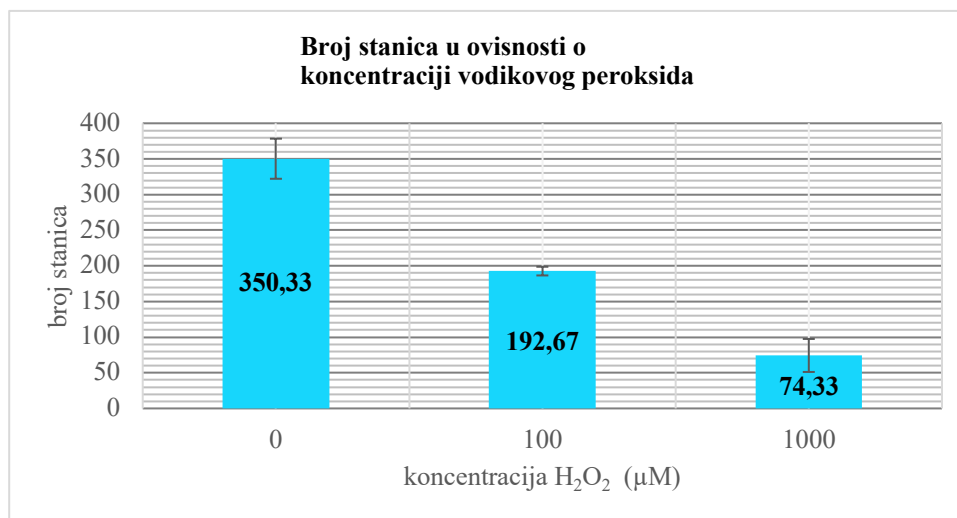
Slika 4. Prikaz staničnih jezgara, 24 sata nakon tretiranja vodikovim peroksidom. Kod niže koncentracije vodikovog peroksida (B) vidimo pokloju piknotičnu jezgru (strelice), dok je kod više koncentracije (C) većina jezgara piknotična. A – kontrolna skupina, B - 100 µM vodikov peroksid, C - 1000 µM vodikov peroksid. Crta mjerila – 20 µm.

Kako bismo kvantificirali broj stanica, koristili smo bojanje jezgara pomoću DAPI te smo signal detektirali pomoću fluorescencije i konfokalne mikroskopije.



Slika 5. Bojanje stanica bojom DAPI. Jasno je vidljiv pad broja obojenih jezgara s porastom koncentracije vodikovog peroksida. A – kontrolna skupina, B – 100 μM H_2O_2 , C – 1000 μM H_2O_2 . Crta mjerila – 50 μm .

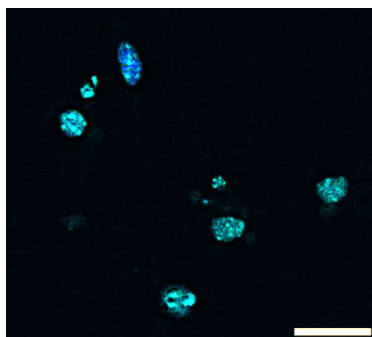
S povećanjem koncentracije vodikovog peroksida, opažen je pad broja živih stanica. U skupini tretiranoj nižom koncentracijom peroksida, broj stanica bio je 45,00%, tj. 1,82 puta niži u odnosu na kontrolnu skupinu, a u skupini tretiranoj višom koncentracijom peroksida, broj stanica bio je 4,71 puta niži, odnosno za 78,78% niži u odnosu na kontrolu. Pad broja stanica s porastom koncentracije vodikovog peroksida između svih triju skupina je bio statistički značajan. Na ovaj način smo pokazali da vodikov peroksid uzrokuje smrt stanica (Slika 6.).



Slika 6. Grafički prikaz promjene prosječnog broja stanica s porastom koncentracije vodikovog peroksida. Prikazuje kako naš *in vitro* model oksidativnog stresa, posredovan vodikovim peroksidom, uzrokuje smrt stanica.

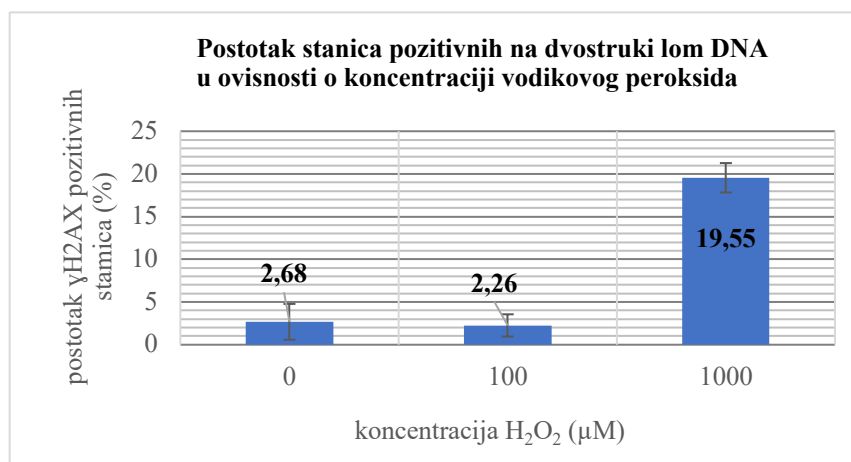
5.2. Izlaganje *in vitro* uzgajanih živčanih matičnih stanica oksidativnom stresu posredovanom vodikovim peroksidom uzrokuje povećanu učestalost dvolančanih lomova DNA

Za kvantifikaciju učestalosti dvolančanih DNA lomova broj γ H2AX pozitivnih jezgara je normaliziran prema broju DAPI pozitivnih jezgara te je time dobiven postotak živih stanica kod kojih je nađen dvolančani lom DNA.



Slika 7. Imunohistokemijsko bojanje stanica biljegom γ H2AX te bojom DAPI. U gornjem dijelu slike vidljiva je plavo obojena jezgra, što je bio način na koji smo prepoznavali prisutnost dvolančanih lomova DNA. Cyan - DAPI, plavo - γ H2AX. Crta mjerila – 20 μ m.

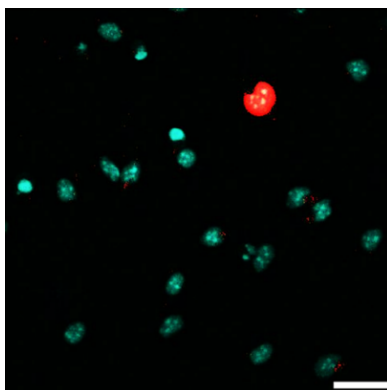
U skupini tretiranoj 100 μ M vodikovim peroksidom, postotak γ H2AX pozitivnih stanica se smanjio u odnosu na kontrolu za 0,42%, a u skupini tretiranoj 1000 μ M vodikovim peroksidom opažen je porast udjela γ H2AX pozitivnih stanica na 19,55%, tj. njihov broj je bio 8,65 puta veći u odnosu na 100 μ M skupinu te 7,29 puta veći u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 8.). Porast broja γ H2AX pozitivnih stanica u skupini tretiranoj 1000 μ M vodikovim peroksidom u odnosu na obje druge skupine je bio statistički značajan. Na ovaj način smo pokazali kako je naš model *in vitro* oksidativnog stresa posredovan vodikovim peroksidom u većoj koncentraciji doveo do povećane učestalosti nastanka dvolančanih lomova DNA (Slika 8.).



Slika 8. Grafički prikaz postotka γ H2AX pozitivnih stanica kao mjere dvostrukih lomova DNA s porastom koncentracije vodikovog peroksida.

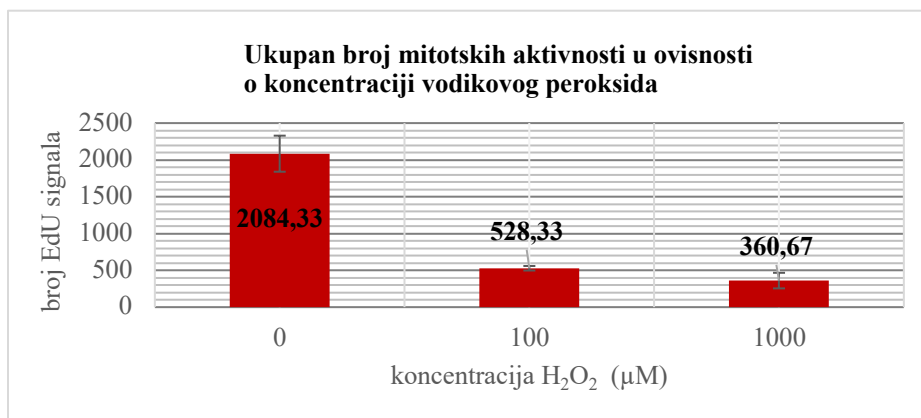
5.3. Izlaganje *in vitro* uzgajanih živčanih matičnih stanica oksidativnom stresu posredovanom vodikovim peroksidom smanjuje sintezu DNA i diobu stanica

Za kvantifikaciju sinteze DNA, odnosno diobe stanice, mjereno je broj EdU signala na pojedinoj slici koji svojom fluorescencijom signalizira ugradnju u novosintetiziranu DNA.



Slika 9. Bojanje stanica na EdU i DAPI. U gornjem dijelu vidljiva je jedna iznimno mitotski aktivna jezgra, a u nekoliko okolnih jezgara također se vidi mitotska aktivnost. Cyan - DAPI, crveno - EdU. Crta mjerila – 20 μm .

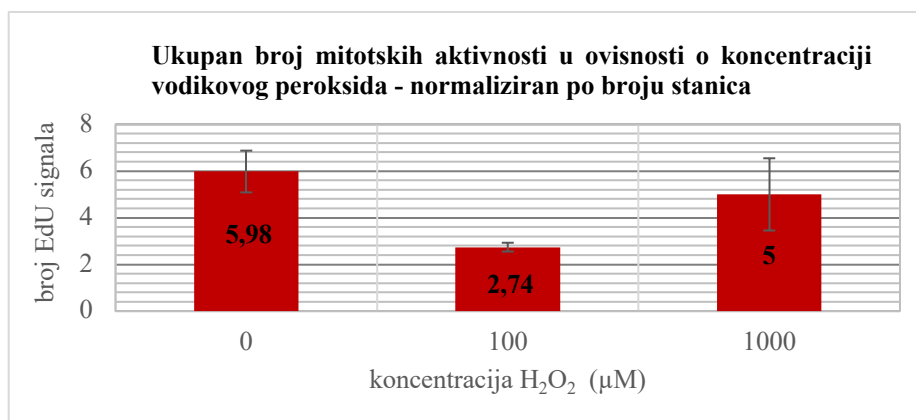
U usporedbi s kontrolnom skupinom, u skupini izloženoj 100 μM vodikovom peroksidu broj EdU signala je pao za 74,65%, a u skupini izloženoj 1000 μM vodikovom peroksidu za 82,70% (Slika 10.). Smanjenje ukupne mitotske aktivnosti bilo je očekivano, s obzirom na pad ukupnog broja stanica s povećanjem koncentracije vodikovog peroksida. Pad ukupne mitotske aktivnosti bio je statistički značajan u usporedbi kontrolne skupine sa skupinama izloženim vodikovim peroksidom.



Slika 10. Grafički prikaz promjene broja mitotskih aktivnosti mjereno pomoću broja EdU signala s porastom koncentracije vodikovog peroksida. Prikazuje očekivano smanjenje ukupne sinteze DNA s povećanjem koncentracije vodikovog peroksida.

Budući da je došlo do značajnog pada broja stanica (Slika 6.), pretpostavili smo kako rezultati ukupne mitotske aktivnosti ovise o broju preostalih stanica. Kada smo navedene rezultate normalizirali prema broju stanica odnosno broju DAPI obojenih jezgara, u usporedbi s kontrolnom skupinom, stanice skupine izložene 100 μM vodikovom

peroksidu pokazale su pad broja EdU signala po stanici pad za 54,18%, no u skupini izloženoj 1000 μM vodikovom peroksidu pad broja EdU signala po stanici je bio manji, samo 16,39% u odnosu na kontrolnu skupinu. Time je dobivena neobična promjena mitotske aktivnosti stanica, koja se pri manjoj koncentraciji vodikovog peroksida značajno smanjuje u odnosu na kontrolu skupinu - 2,18 puta, ali se pri višestruko većoj koncentraciji vodikovog peroksida iznenađujuće povećava (Slika 11.) 1,82 puta u odnosu na manju koncentraciju vodikovog peroksida. Usporedba broja EdU signala kontrolne skupine sa skupinom tretiranom nižom koncentracijom vodikovog peroksida te međusobna usporedba dviju skupina tretiranih vodikovim peroksidom bile su statistički značajne.



Slika 11. Prikaz mitotskih aktivnosti u ovisnosti o koncentraciji vodikovog peroksida normaliziran po broju stanica.

Tablica 1. Srednje vrijednosti broja DAPI i postotka γH2AX s promjenom koncentracije H_2O_2 .

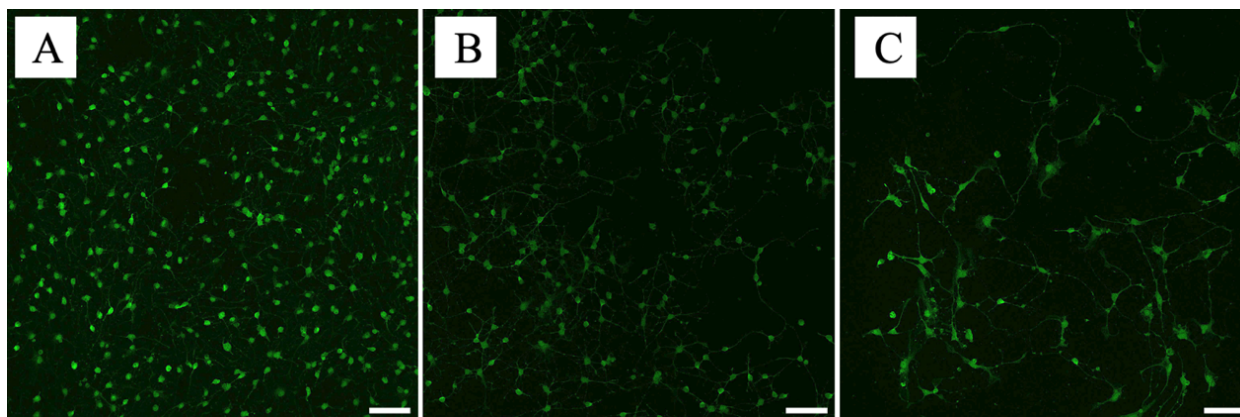
Skupina stanica	Prosječan broj DAPI	Udio broja DAPI prema kontroli	Prosječni postotak γH2AX pozitivnih stanica
kontrola	350,33	100,00%	2,68%
100 μM	192,67	55,00%	2,26%
1000 μM	74,33	21,22%	19,55%

Tablica 2. Srednje vrijednosti ukupnog broja EdU i broj EdU po stanici s promjenom koncentracije H_2O_2 .

Skupina stanica	Prosječan broj EdU signala	Postotak broja EdU signala prema kontroli	Prosječan broj EdU po stanici	Postotak broja EdU po stanici prema kontroli
kontrola	2084,33	100%	5,98	100%
100 μM	528,33	25,35%	2,74	45,82%
1000 μM	360,67	17,30%	5,00	83,61%

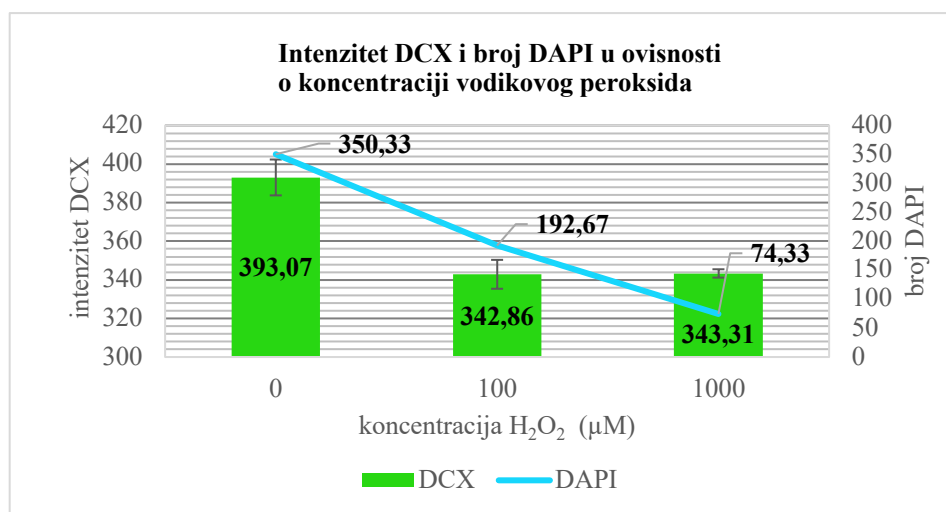
5.4. Izlaganje *in vitro* uzgajanih živčanih matičnih stanica oksidativnom stresu posredovanom vodikovim peroksidom ubrzava njihovu diferencijaciju u smjeru neurona

Kako bismo kvantificirali diferencijaciju živčanih matičnih stanica u smjeru neurona, korišten je biljeg DCX koji označava prijelaz iz nediferenciranog stadija prema ranim neuronima. Stanice su označene imunocitokemijski te je mjerena srednja vrijednost intenziteta signala DCX.



Slika 12. Imunohistokemijsko bojanje stanica biljegom DCX. S porastom koncentracije vodikovog peroksida, vidljive su promjene u intenzitetu te povećanje pojedinačnih stanica izduljivanjem i većim razgranjenjem ogranka. Zeleno – DCX. A – kontrolna skupina, B – 100 μM H_2O_2 , C – 1000 μM H_2O_2 . Crta mjerila – 50 μm .

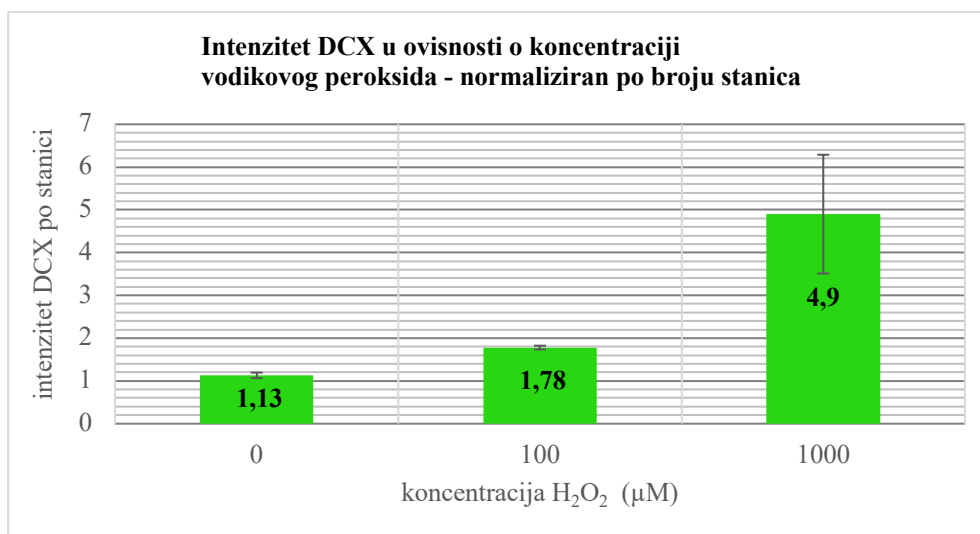
Stanice izložene 100 μM vodikovom peroksidu, u odnosu na kontrolnu skupinu, pokazale su pad ukupnog intenziteta DCX na fotografiji za 12,77%. Povećanjem koncentracije vodikovog peroksida na 1000 μM signal DCX se nije značajnije mijenjao u odnosu na 100 μM (Slika 13.). Ipak, ovakav rezultat teško je interpretirati s obzirom na pad broja živih stanica. Pad intenziteta signala DCX u skupinama tretiranim vodikovim peroksidom u odnosu na kontrolnu skupinu je bio statistički značajan.



Slika 13. Grafički prikaz promjene ukupnog intenziteta DCX signala i broja stanica s porastom koncentracije H_2O_2 .

S obzirom na to da smo na primjeru mitotske aktivnosti vidjeli kako rezultati ovise o normalizaciji prema ukupnom broju analiziranih stanica, isti smo postupak, normalizaciju prema broju DAPI jezgara, napravili i za intenzitet DCX signala.

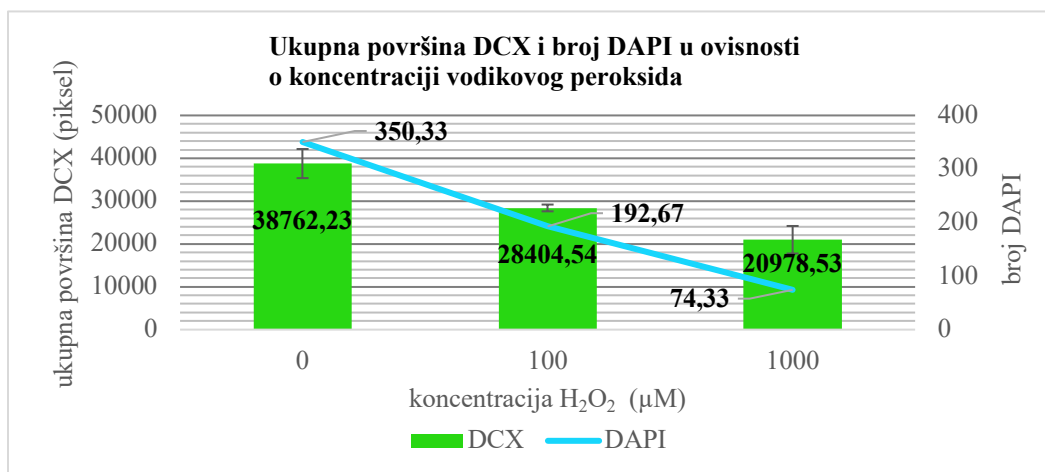
U usporedbi s kontrolnom skupinom, u skupini izloženoj 100 μM vodikovom peroksidu utvrđen je porast intenziteta po stanici za 57,52%. Usporedbom kontrole i skupine u višoj koncentraciji dobiven je porast intenziteta DCX po stanici od 333,63%, odnosno preko 4 puta veći intenzitet po stanici (Slika 14.). Usporedbe skupine tretirane višom koncentracijom s druge dvije skupine bile su statistički značajne.



Slika 14. Grafički prikaz promjene intenziteta DCX po stanici s porastom koncentracije vodikovog peroksida. Ovaj nalaz ukazuje na ubrzanje diferencijacije pod utjecajem vodikovog peroksida.

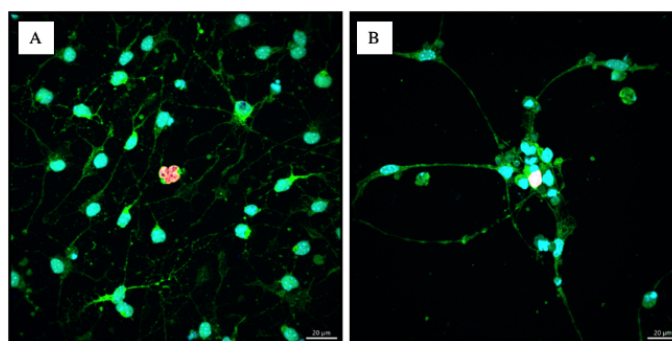
5.5. Izlaganje *in vitro* uzgajanih živčanih matičnih stanica oksidativnom stresu posredovanom vodikovim peroksidom uzrokuje povećanje površine pojedinačnih stanica

S obzirom na to da je DCX protein koji je rasprostranjen po čitavoj živčanoj matičnoj stanici, mjerenje površine tog signala nam je omogućilo kvantifikaciju površine stanice na imunocitokemijskim preparatima. Usporedba kontrolnih stanica s onim tretiranim manjom i većom koncentracijom vodikovog peroksida je pokazala kako s porastom koncentracije vodikovog peroksida dolazi do pada ukupne površine stanica za 26,72%, odnosno 45,88 % (Slika 15.). Međusobne usporedbe svih triju skupina bile su statistički značajne. Naime, pad ukupne površine stanica nije neočekivan, budući da je i ukupan broj stanica značajno pao (Slika 15.).



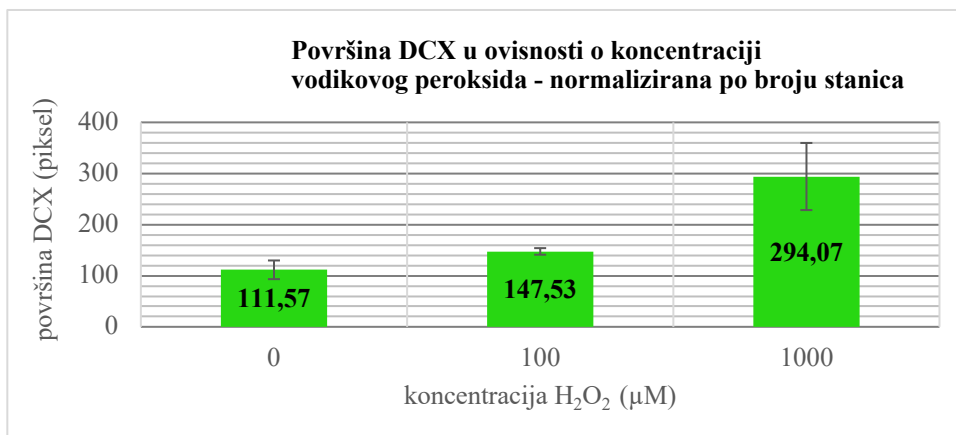
Slika 15. Grafički prikaz promjene broja DAPI i ukupne površine DCX s porastom koncentracije vodikovog peroksida. Prikazuje usporedni pad ukupne površine stanica s padom broja stanica prilikom povećanja koncentracije vodikovog peroksida.

Normalizacijom ovog signala prema ukupnom broju živih stanica dobiven je prosjek površine DCX po DAPI u pikselima, odnosno prosječna površina stanice na odgovarajućoj fotografiji.



Slika 16. Imunohistokemijsko bojanje stanica biljezima γ H2AX i DCX te bojanje na DAPI i EdU. Pri visokoj koncentraciji vodikovog peroksida, vidljivo je povećanje površine pojedinačnih stanica u odnosu na kontrolnu skupinu u smislu povećanja tijela stanice i produljenja ogranaka. Cyan – DAPI, zeleno – DCX, crveno – EdU, plavo - γ H2AX. A – kontrolna skupina, B - 1000 μM H₂O₂. Crta mjerila – 20 μm.

Na naše iznenađenje, u usporedbi s kontrolnom skupinom, u skupini izloženoj 100 μM vodikovom peroksidu utvrđen je porast površine stanice za 32,23%, a u skupini izloženoj 1000 μM vodikovom peroksidu taj porast je bio za čak 163,57% (Slika 17.). Zaista, porast površine pojedinih stanica je jasno vidljiv (Slika 16.) te se stanice povećavaju kako u smislu opće površine, tako i u smislu razgranjenja i produljenja ogranaka. Promjena površine DCX po stanici bila je statistički značajna u usporedbi skupine tretirane 1000 μM vodikovim peroksidom i drugih dviju skupina stanica.



Slika 17. Grafički prikaz promjene površine DCX po stanici s porastom koncentracije vodikovog peroksida. Prikazuje iznenađujući porast površine pojedinačne stanice pod utjecajem vodikovog peroksida.

Tablica 3. Srednje vrijednosti ukupnog DCX intenziteta i DCX intenziteta po stanici s promjenom koncentracije H₂O₂.

Skupina stanica	Ukupni intenzitet DCX signala	% ukupnog intenziteta DCX prema kontroli	Intenzitet DCX po stanici	% intenziteta DCX po stanici prema kontroli
kontrola	393,07	100%	1,13	100%
100 μM	342,86	87,23%	1,78	157,52%
1000 μM	343,31	87,34%	4,90	433,63%

Tablica 4. Srednje vrijednosti ukupne DCX površine i DCX površine po stanici s promjenom koncentracije H₂O₂.

Skupina stanica	Prosječna ukupna površina DCX signala	% površine DCX prema kontroli	Prosječna površina DCX signala po stanici	% površine DCX po stanici prema kontroli
kontrola	38762,23 pix	100%	111,57 pix	100%
100 μM	28404,54 pix	73,28%	147,53 pix	132,23%
1000 μM	20978,53 pix	54,12%	294,07 pix	263,57%

6. RASPRAVA

Slobodni radikali kisika fiziološki su prisutni u stanici, a vodikov peroksid u unutarstaničnim koncentracijama 1-10 nM sudjeluje u fiziološkoj reverzibilnoj oksidaciji cisteina i metionina te u međustaničnoj redoks signalizaciji važnoj u staničnoj proliferaciji i migraciji (Sies, 2017). Ipak, kada koncentracije radikala izađu izvan fizioloških granica, dolazi do oksidativnog stresa. Oksidativni stres jedan je od središnjih elemenata u patofiziologiji brojnih patoloških stanja. Porast slobodnih radikala unutar stanice uzrokuje oštećenja proteina, DNA i lipida, što je osobito važno u živčanom sustavu s obzirom na to da je mozak sastavljen od velikog udjela lipida. Djelovanjem radikala na lipide u staničnoj membrani dolazi do tzv. peroksidacije lipida koja uzrokuje perforaciju stanične membrane, što pak dovodi do bubrenja i smrti stanice. Zanimljivo je kako je djelovanje na proteine također posredovano peroksidacijom lipida jer dolazi do promjene mikrookoliša u kojem se nalaze proteini, što dovodi do smanjenja enzimske funkcije i disfunkcije transmembranskih kanala (Gamulin i ostali, 2011). Izravnim djelovanjem slobodnih radikala na molekulu DNA, dolazi do oštećenja strukture, jednolančanih i dvolančanih lomova, a nakupljanje mutacija koje nastaje zbog učestalih dvolančanih lomova može dovesti do kromosomske nestabilnosti, karcinogeneze i smrti stanice.

Oksidativni stres prepoznat je kao važan čimbenik u mnogim bolestima živčanog sustava. Nakupljanje slobodnih kisikovih radikala u živčanom sustavu može nastati disfunkcijom antioksidativnih enzima poput superoksid-dismutaze, kao što je to slučaj u motoričkim neuronima u amiotrofičnoj lateralnoj sklerozi. Disfunkcija mitohondrija zbog raznih vanjskih i unutarnjih čimbenika također uzrokuje nakupljanje slobodnih radikala i posljedičnu degeneraciju neurona. Takav proces se događa u bazalnim ganglijima u patogenezi Parkinsonove bolesti, a uz stvaranje ROS iz imunoloških stanica, važan je uzrok oštećenja mijelinske ovojnice neurona kralježnične moždine i vidnog živca u multiploj sklerozi. Produljena hipoksija tkiva uzrokuje disfunkciju enzimskih sustava i smanjenje antioksidativne aktivnosti, što dovodi do nakupljanja slobodnih radikala kisika. Nagli ponovni dotok kisika na neravnotežu oksidativne i antioksidativne aktivnosti dovodi do pojačanog stvaranja radikala i pojačanja patološkog procesa. Takav mehanizam nalazimo u ishemijskom moždanom udaru i reperfuzijskoj ozljedi. Nakupljanje A β plakova omogućuje vezanje bakra koji djeluje kao medijator u nastanku visokoreaktivnog hidroksilnog radikala, kao što je to slučaj pri akumulaciji takvih plakova u mediotemporalnom dijelu moždane kore u Alzheimerovoj bolesti (Huang i ostali, 2016).

Moderna medicina sve se više okreće transplantaciji živčanih matičnih stanica kao terapijskom pristupu. S obzirom na to da je transplantacija matičnih stanica jedno od najintenzivnije istraživanih područja u modernoj medicini te imamo prikupljene rezultate velikog broja kliničkih studija o učinkovitosti takvog terapijskog pristupa, postaje jasno kako je jedan od najvećih izazova za daljnji napredak metode razumijevanje reakcije transplantiranih matičnih stanica na toksično okruženje u patološkom procesu u koji dolaze. Brojne su dosadašnje studije pokazale kako broj transplantiranih matičnih stanica pada nedugo nakon transplantacije te se time smanjuje njihov ukupni terapijski učinak.

Prvi cilj ovog istraživanja je stoga bio uspostaviti *in vitro* model oksidativnog stresa na nezrelim stanicama živčanog sustava. Istraživanje je provedeno na modelu živčanih matičnih stanica miša, sukladno brojnim publikacijama koje ukazuju na veliku sličnost između matičnih stanica ljudi i miševa (Mascetti i Pedersen, 2016; Ogura i ostali, 2021). Oksidativni stres smo postigli korištenjem vodikovog peroksida, koji se među reaktivnim oblicima kisika ističe po tome što sudjeluje u velikom broju reakcija njihovog obrtaja, a također je i lako dostupna tvar što ovom istraživanju daje na reproducibilnosti. Učinkovitost našeg *in vitro* modela provjerili smo svjetlosnim mikroskopom, čime je utvrđeno da se izlaganjem stanica vodikovom peroksidu događaju promjene tipične za citotoksičnost. Pri manjoj koncentraciji vodikovog peroksida, u odnosu na kontrolu uočena je heterogenost u obliku stanice, manji broj stanica pričvršćenih za podlogu te pojava prostora među stanicama koji nisu sadržavali stanice niti stanične nastavke. Sve opaženo je sugeriralo da su se stanice s tog područja odlijepile, što je vjerojatno uzrokovano staničnom smrću. Promatranjem skupine tretirane višom koncentracijom vodikovog peroksida uočeno je obilje praznog prostora te gotovo nijedna stanica nije bila adherirana za podlogu, već su bile uniformno smanjene i grupirane u nakupine. Promatranjem staničnih jezgara, s porastom koncentracije vodikovog peroksida vidjeli smo povećanje broja piknoze u jezgrama, što označava kondenzaciju kromatina i ireverzibilno skvrčenje jezgre u smrti stanice (Damjanov i ostali, 2018). Sve ove promjene, uočene usporedbom kontrole s druge dvije skupine, ukazivale su na prisustvo patološkog procesa u staničnoj kulturi, odnosno na oksidativni stres.

Nakon što smo uspostavili učinkovit *in vitro* model oksidativnog stresa posredovan vodikovim peroksidom, pristupili smo preciznoj analizi reakcije živčanih matičnih stanica toksičnom okruženju nakon transplantacije. Za parametre smo odabrali **lom DNA**, s obzirom na učinak ROS na strukturu DNA, **površinu stanice**, kako bismo usporedili imunofluorescentne i svjetlosne mikroskopske nalaze o veličini stanica te osnovne funkcije matičnih stanica: **preživljenje, diobu i diferencijaciju**. Parametre smo pratili fluorescencijom i konfokalnom mikroskopijom. Naša je pretpostavka je bila kako će baterija od ovih pet parametara dati dobar uvid u promjenu funkcije pri oksidativnom stresu, kao zajedničkom čimbeniku mnogih bolesti živčanog sustava.

Preživljenje stanice kvantificirali smo praćenjem DAPI signala. Povećanjem koncentracije vodikovog peroksida dobili smo očekivano smanjenje broja živih stanica za 45%, ali promjena sa 100 na 1000 μM dodatno je smanjila broj stanica za samo 23%. Iako ove promjene nisu bile linearne, jedno od potencijalnih objašnjenja bi moglo biti to da su mitotska zbijanja bila više inhibirana pri izlaganju maloj nego velikoj koncentraciji vodikovog peroksida, pa je stoga uočen pad neproporcionalan jačini oksidativnog stresa.

Kako bismo kvantificirali učinak slobodnih radikala na stanicu, odlučili smo pratiti učestalost dvolančanih lomova DNA u stanicama. Rezultati koje smo dobili za γH2AX pokazali su iznimno povećanje učestalosti dvolančanih DNA lomova s porastom koncentracije sa 100 μM na 1000 μM , odnosno povećanje broja stanica pozitivnih na dvolančane

lomove je bilo preko 8 puta. Ovo je bila još jedna bitna potvrda da smo razvili vjerodostojan *in vitro* model oksidativnog stresa, što je u skladu sa znanjem kako vodikov peroksid uzrokuje oštećenja DNA (Petersen i ostali, 2000).

Kako bismo pratili mitotsku aktivnost, koristili smo EdU koji se ugrađuje u strukturu DNA pri svakoj sintezi lanaca. Iako smo pri nižoj koncentraciji vodikovog peroksida pronašli smanjenje mitotske aktivnosti, pronađen je paradoksalan porast s povećanjem koncentracije peroksida sa 100 μM na 1000 μM . Neki autori utvrdili su učinak vodikovog peroksida na smanjenje mitotske aktivnosti stanica praćenjem promjene broja stanica (Zhang i ostali, 2022), no takvo istraživanje provedeno je korištenjem još niže koncentracije (50 μM) vodikovog peroksida. Također je pokazano kako je učestalost dvostrukih lomova DNA povezana s nepopravljenim jednostrukim lomovima te se javlja neovisno o mitotskoj aktivnosti (Mahaseth i Kuzminov, 2016).

Diferencijaciju živčanih matičnih stanica kvantificirali smo imunofluorescentnim praćenjem intenziteta DCX signala, koji je protein specifičan za prijelaz iz stadija nezrelih živčanih matičnih stanica u rane neurone (Francis i ostali, 1999). S obzirom na to da je oksidativni stres stanje u kojem su stanice ugrožene te u prvom redu nastoje preživjeti kako bi mogle obavljati svoju funkciju, očekivali smo da će takva snažna egzogena noksa usporiti diferencijaciju stanica u kompleksne oblike. Međutim, suprotno očekivanju, pronašli smo porast intenziteta signala DCX po stanici nakon izlaganja vodikovom peroksidu. Istraživanja nekih autora pokazala su kako niže koncentracije oksidativnog stresa induciranog parakvatom (5 μM , 25 μM , 100 μM) povećavaju sposobnost diferencijacije pluripotentnih stanica humanog embrionalnog karcinoma u zrelije stanične oblike (Hu i ostali, 2017), no takvo istraživanje ne obrađuje utjecaj na živčane matične stanice koje su multipotentne i samim time nekoliko evolucijskih koraka zrelije te ne istražuje utjecaj iznimno visokih koncentracija oksidativnih radikala. Potencijalni odgovor nalazimo u istraživanju koje je pokazalo da živčane epitelne matične stanice svojom diferencijacijom u zrele oblike stječu bolju sposobnost obrane od oksidativnog stresa (Semkova i ostali, 2022). Čini se kako nezrela stanica kao reakciju na oksidativni stres ubrzava diferencijaciju, čime postaje otpornija na toksično djelovanje takve nokse.

Površinu stanice smo također kvantificirali imunofluorescentnim praćenjem DCX. Iako smo, vođeni opažanjima na razini jezgre, očekivali da su se stanice zbog toksičnog djelovanja slobodnih kisikovih radikala smanjile i skvrčile, otkrili smo upravo suprotno - porast površine stanica. Zanimljivo je da je visoka koncentracija vodikovog peroksida, ona kod koje se javljaju dvostruki lomovi DNA, rezultirala trostrukim povećanjem površine pojedinačnih stanica. Iako ovakvu reakciju ne razumijemo, nešto slično je opisano kod astrocita tretiranih vodikovim peroksidom: povećanje međustaničnih spojeva preslagivanjem citoskeleta (Zhu i ostali, 2005), što je temeljeno na osjetljivosti staničnog citoskeleta na djelovanje oksidativnog stresa (Dalle-Donne i ostali, 2001).

U zaključku možemo reći kako je, po svim saznanjima kojima raspoložemo, ovo prvo istraživanje koje je koristilo živčane matične stanice miša kao osnovu za razvoj *in vitro* modela oksidativnog stresa nezrelih preteča neurona. Koristeći temeljne parametre, kako kvantitativne, u smislu brojanja preživjelih stanica, tako i kvalitativne, u smislu opažanja morfoloških promjena, možemo reći kako smo uspostavili model u kojem dolazi do staničnog oštećenja u ovisnosti o koncentraciji vodikovog peroksida.

Nakon što smo uspješno uspostavili model, opisali smo nekoliko zanimljivih, a dijelom i posve neočekivanih pojava: nezrele preteče neurona reagiraju na oksidativni stres povećanjem svoje površine i pružanjem nastavaka koji su mnogo tipičniji za zrelije stanične oblike. I zaista, kada smo mjerili izražaj biljega zrelijih stadija neurona, DCX, pronašli smo kako se njegova prisutnost vrlo značajno povećala. To nam je vrlo jasno sugeriralo kako oksidativni stres posredovan vodikovim peroksidom ubrzava diferencijaciju nezrelih preteča živčanog sustava.

Sve opisano će doprinijeti boljem razumijevanju reakcija nezrelih živčanih stanica na oksidativni stres, što će poboljšati naše znanje o raznim neurološkim bolestima te će pomoći u razumijevanju zbivanja prisutnih nakon terapijske transplantacije matičnih stanica u mozak zahvaćen bolešću.

7. ZAKLJUČCI

1. Uspostavljen model *in vitro* oksidativnog stresa nezrelih stanica živčanog sustava dovodi do smrti stanica u ovisnosti o porastu koncentracije vodikovog peroksida.
2. Dvostruki lomovi DNA, kao jedan od središnjih patofizioloških elemenata oksidativnog stresa, izazvani su prilikom izlaganja stanica vodikovom peroksidu u visokoj koncentraciji (1000 μ M).
3. Izlaganje nezrelih stanica živčanog sustava nižim koncentracijama vodikovog peroksida dovelo je do značajnog pada broja mitotski aktivnih stanica, dok je viša koncentracija peroksida, ona kod koje su se javljaju dvostruki lomovi DNA, praćena mitotskim zbivanjima usporedivima s kontrolnom skupinom.
4. Izlaganje živčanih matičnih stanica oksidativnom stresu posredovanom vodikovim peroksidom povećalo je izražaj DCX, što ukazuje na ubranu diferencijaciju prema neuronima.
5. Izlaganje živčanih matičnih stanica oksidativnom stresu posredovanom vodikovim peroksidom uzrokovalo je povećanje površine stanica, primarno vidljivo u većem broju staničnih nastavaka i njihovih razgranjenja, što također sugerira ubranu staničnu diferencijaciju.

8. ZAHVALA

Želim zahvaliti profesoru Dinku Mitrečiću na velikom povjerenju koje mi je ukazao prilikom ovog istraživanja, vrijednim savjetima te na podršci i nesebično udijeljenom vremenu kako bi izrada ovog rada uspjela. Kao predavač je kroz nastavu u meni probudio veliki interes za pretkliničku znanost, a zatim mi je i kao mentor velikodušno pružio priliku da je поближе upoznam. Također želim zahvaliti Draženu Juraju Petroviću iz Laboratorija za matične stanice na velikoj pomoći prilikom ovog istraživanja.

9. POPIS LITERATURE

Alić, I., Goh, P. A., Murray, A., Portelius, E., Gkanatsiou, E., Gough, G., Mok, K. Y., Koschut, D., Brunmeir, R., Yeap, Y. J., O'Brien, N. L., Groet, J., Shao, X., Havlicek, S., Dunn, N. R., Kvartsberg, H., Brinkmalm, G., Hithersay, R., Startin, C., Hamburg, S., Philips M., Pervushin, K., Turmaine, M., Wallon, D., Rovelet-Lecrux, A., Soininen, H., Volpi, E., Martin, J.E., Foo, J.N., Becker, D.L., Rostagno, A., Ghiso, J., Krsnik, Ž., Šimić, G., Kostović, I., Mitrečić, D., LonDowns Consortium, Francis, P.T., Blennow, K., Strydom, A., Hardy J., Zetterberg, H., i Nižetić, D. (2021). Patient-specific Alzheimer-like pathology in trisomy 21 cerebral organoids reveals BACE2 as a gene dose-sensitive AD suppressor in human brain. *Molecular psychiatry*, 26(10), 5766–5788.

Baker, E. W., Kinder, H. A., i West, F. D. (2019). Neural stem cell therapy for stroke: A multimechanistic approach to restoring neurological function. *Brain and behavior*, 9(3), e01214.

Bergmann, O., Spalding, K. L., i Frisén, J. (2015). Adult Neurogenesis in Humans. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(7), a018994.

Bjorklund, L. M., Sánchez-Pernaute, R., Chung, S., Andersson, T., Chen, I. Y., McNaught, K. S., Brownell, A. L., Jenkins, B. G., Wahlestedt, C., Kim, K. S., i Isacson, O. (2002). Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4), 2344–2349.

Brinar V., Adamec, I., Barun, B., Bašić, S., Bilić, E., Borovečki, F., Gabelić, T., Petelin Gadže, Ž., Habek, M., Jakovčević, A., Krbot Skorić, M., Klepac, N., Mahović Lakušić, D., Nanković, S., Malojčić, B., Petravić, D., Poljaković, Z., Titlic, M., Vuletić, V., Zadro, I. i Žagar, M. (2019). *Neurologija za medicinare* (2.izd.). Zagreb: Medicinska naklada. (str 293.-304.).

Chazotte B. (2011). Labeling nuclear DNA using DAPI. *Cold Spring Harbor protocols*, 2011(1), pdb.prot5556.

Colombowala, A; Samudravijay, A (2022). Phosphorylated H2AX: Prospective Role in DNA Damage Responses and a Credible Tool for Translational Cancer Research. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 9(1), 464-476

- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Milzani, A., Di Simplicio, P., i Colombo, R. (2001). The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. *Free radical biology & medicine*, 31(12), 1624–1632.
- Damjanov, I., Seiwerth, S., Jukić, S., Nola, M. (2018). *Patologija* (5.izd.). Zagreb: Medicinska naklada (str. 25-26.)
- Feigin, V. L., Vos, T., Nichols, E., Owolabi, M. O., Carroll, W. M., Dichgans, M., Deuschl, G., Parmar, P., Brainin, M., i Murray, C. (2020). The global burden of neurological disorders: translating evidence into policy. *The Lancet. Neurology*, 19(3), 255–265.
- Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., Chafey, P., Schaar, B., Vinet, M. C., Friocourt, G., McDonnell, N., Reiner, O., Kahn, A., McConnell, S. K., Berwald-Netter, Y., Denoulet, P., i Chelly, J. (1999). Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron*, 23(2), 247–256.
- Gamulin, S., Marušić, M. i Kovač, Z. (2011). *Patofiziologija* (7. izd.). Zagreb: Medicinska naklada. (str. 122-124, 429-432)
- Ghasemi, N., Razavi, S., i Nikzad, E. (2017). Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy. *Cell journal*, 19(1), 1–10.
- Harris, V. K., Stark, J., Vyshkina, T., Blackshear, L., Joo, G., Stefanova, V., Sara, G., i Sadiq, S. A. (2018). Phase I Trial of Intrathecal Mesenchymal Stem Cell-derived Neural Progenitors in Progressive Multiple Sclerosis. *EBioMedicine*, 29, 23–30.
- Henriques, D., Moreira, R., Schwamborn, J., Pereira de Almeida, L., i Mendonça, L. S. (2019). Successes and Hurdles in Stem Cells Application and Production for Brain Transplantation. *Frontiers in neuroscience*, 13, 1194.
- Hu, Q., Khanna, P., Ee Wong, B. S., Lin Heng, Z. S., Subhramanyam, C. S., Thanga, L. Z., Sing Tan, S. W., i Baeg, G. H. (2017). Oxidative stress promotes exit from the stem cell state and spontaneous neuronal differentiation. *Oncotarget*, 9(3), 4223–4238.
- Huang, W. J., Zhang, X., i Chen, W. W. (2016). Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomedical reports*, 4(5), 519–522.
- Konyalioglu, S., Armagan, G., Yalcin, A., Atalayin, C., & Dagci, T. (2013). Effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in embryonic neural stem cells. *Neural regeneration research*, 8(6), 485–495.
- Kuo, L. J., i Yang, L. X. (2008). Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In vivo (Athens, Greece)*, 22(3), 305–309.
- Mahaseth, T., i Kuzminov, A. (2016). Prompt repair of hydrogen peroxide-induced DNA lesions prevents catastrophic chromosomal fragmentation. *DNA repair*, 41, 42–53.
- Mascetti, V. L., i Pedersen, R. A. (2016). Human-Mouse Chimerism Validates Human Stem Cell Pluripotency. *Cell stem cell*, 18(1), 67–72.

- Mazzini, L., Gelati, M., Profico, D. C., Sorarù, G., Ferrari, D., Copetti, M., Muzi, G., Ricciolini, C., Carletti, S., Giorgi, C., Spera, C., Frondizi, D., Masiero, S., Stecco, A., Cisari, C., Bersano, E., De Marchi, F., Sarnelli, M. F., Querin, G., Cantello, R., ... ALS-NSCs Trial Study Group (2019). Results from Phase I Clinical Trial with Intraspinal Injection of Neural Stem Cells in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Long-Term Outcome. *Stem cells translational medicine*, 8(9), 887–897.
- Mijiritsky, E., Ferroni, L., Gardin, C., Peleg, O., Gultekin, A., Saglanmak, A., Delogu, L. G., Mitrecic, D., Piattelli, A., Tatullo, M., i Zavan, B. (2019). Presence of ROS in Inflammatory Environment of Peri-Implantitis Tissue: In Vitro and In Vivo Human Evidence. *Journal of Clinical Medicine*, 9(1), 38.
- Mitrečić, D., Hribljan, V., Jagečić, D., Isaković, J., Lamberto, F., Horánszky, A., Zana, M., Foldes, G., Zavan, B., Pivoriūnas, A., Martinez, S., Mazzini, L., Radenovic, L., Milasin, J., Chachques, J. C., Buzanska, L., Song, M. S., i Dinnyés, A. (2022). Regenerative Neurology and Regenerative Cardiology: Shared Hurdles and Achievements. *International journal of molecular sciences*, 23(2), 855.
- Mitrečić, D., Nicaise, C., Gajović, S., i Pochet, R. (2010). Distribution, differentiation, and survival of intravenously administered neural stem cells in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell transplantation*, 19(5), 537–548.
- Nicaise, C., Mitrecic, D., i Pochet, R. (2011). Brain and spinal cord affected by amyotrophic lateral sclerosis induce differential growth factors expression in rat mesenchymal and neural stem cells. *Neuropathology and applied neurobiology*, 37(2), 179–188.
- Ogura, C., Hirano, K., Mizumoto, S., Yamada, S., i Nishihara, S. (2021). Dermatan sulphate promotes neuronal differentiation in mouse and human stem cells. *Journal of biochemistry*, 169(1), 55–64.
- Pawluk, H., Kołodziejska, R., Grzešek, G., Woźniak, A., Kozakiewicz, M., Kosinska, A., Pawluk, M., Grzechowiak, E., Wojtasik, J., i Kozera, G. (2022). Increased Oxidative Stress Markers in Acute Ischemic Stroke Patients Treated with Thrombolytics. *International journal of molecular sciences*, 23(24), 15625.
- Petersen, A. B., Gniadecki, R., Vicanova, J., Thorn, T., i Wulf, H. C. (2000). Hydrogen peroxide is responsible for UVA-induced DNA damage measured by alkaline comet assay in HaCaT keratinocytes. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 59(1-3), 123–131.
- Popescu, I. R., Nicaise, C., Liu, S., Bisch, G., Knippenberg, S., Daubie, V., Bohl, D., i Pochet, R. (2013). Neural progenitors derived from human induced pluripotent stem cells survive and differentiate upon transplantation into a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Stem cells translational medicine*, 2(3), 167–174.
- Sadler, T. W. (2008). *Langmanova medicinska embriologija* (10. izd.). Zagreb: Školska knjiga. (str. 287-295).
- Sanghai, N., i Tranmer, G. K. (2021). Hydrogen Peroxide and Amyotrophic Lateral Sclerosis: From Biochemistry to Pathophysiology. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(1), 52.
- Semkova, V., Haupt, S., Segschneider, M., Bell, C., Ingelman-Sundberg, M., Hajo, M., Weykopf, B., Muthukottiappan, P., Till, A., i Brüstle, O. (2022). Dynamics of Metabolic Pathways and Stress Response Patterns during Human Neural Stem Cell Proliferation and Differentiation. *Cells*, 11(9), 1388.

Sies H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox biology*, *11*, 613–619.

Wijesekera, L. C., i Leigh, P. N. (2009). Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet journal of rare diseases*, *4*, 3.

Zhang, X., Liu, Z., Yang, W., Zhao, F., Zhang, C., Feng, H., Zhou, T., Zhong, J., Zou, Y., Feng, H., Ge, H., i Hu, R. (2022). Tetrahydrofolate Alleviates the Inhibitory Effect of Oxidative Stress on Neural Stem Cell Proliferation through PTEN/Akt/mTOR Pathway. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2022*, 9021474.

Zhu, D., Tan, K. S., Zhang, X., Sun, A. Y., Sun, G. Y., i Lee, J. C. (2005). Hydrogen peroxide alters membrane and cytoskeleton properties and increases intercellular connections in astrocytes. *Journal of cell science*, *118*(Pt 16), 3695–3703.

10. SAŽETAK

Marko Gavrančić

Oksidativni stres izaziva dvolančane lomove DNA živčanih matičnih stanica i ubrzava njihovu diferencijaciju

Oksidativni stres uzrokovan reaktivnim kisikovim radikalima je jedan od zajedničkih patofizioloških elemenata mnogih neuroloških bolesti. Budući da je transplantacija matičnih stanica postupak koji se trenutno naširoko klinički testira, a odumiranje transplantata je prepoznato kao jedan od najvećih problema takvih terapijskih zahvata, u ovom radu smo istražili kako oksidativni stres djeluje na nezrele preteče neurona. U tu svrhu smo razvili *in vitro* model nezrelih neurona dobivenih iz živčanih matičnih stanica miša koje smo tretirali vodikovim peroksidom. U ovisnosti o koncentraciji vodikovog peroksida, oksidativni stres uzrokuje odumiranje stanica te izaziva dvolančane lomove DNA. Također, u maloj koncentraciji usporava dijeljenje stanica. Istovremeno smo pronašli kako oksidativni stres ubrzava diferencijaciju nezrelih stanica, što je dokumentirano u pojačanom izražaju DCX te povećanju površine stanica koje su bile potaknute pružati nastavke tipične za zrelije razvojne oblike. Rezultati ovog istraživanja daju uvid u promjenu osnovnih parametara nezrelih preteča živčanog sustava izloženih oksidativnom stresu te mogu doprinijeti boljem razumijevanju zbivanja prisutnih u raznim neurološkim bolestima te onima tijekom terapijske transplantacije stanica u živčano tkivo zahvaćeno bolešću.

Ključne riječi: živčane matične stanice, oksidativni stres, vodikov peroksid, diferencijacija razvojnih preteča neurona, dvolančani lom DNA

11. SUMMARY

Marko Gavrančić

Oxidative stress induces double-stranded DNA breaks in neural stem cells and accelerates cell differentiation

Oxidative stress mediated by reactive oxygen species is one of the common pathophysiological elements of many neurological diseases. Since stem cell transplantation is a method that is currently being widely clinically tested, with cell death within graft which is recognized as one of the biggest obstacles in that kind of therapeutic approach, in this work we developed an *in vitro* model of early neurons derived from mouse neural stem cells, which we treated with hydrogen peroxide. Dependent on hydrogen peroxide concentration, oxidative stress induced cell death and double – stranded DNA breaks. Also, in small concentrations it decreased cell division. In the same model we found that oxidative stress induced differentiation of immature cells, as evidenced by increased DCX expression and the total surface of cells. We observed that cells increased number and thickness of their cellular projections, which is typical for more mature developmental stages. The results of this study give insight how basic parameters of immature nervous system precursors exposed to oxidative stress change which contributes to better understanding of events present in neurological diseases and during therapeutic cell transplantation into the tissue affected by pathological process.

Keywords: neural stem cells, oxidative stress, hydrogen peroxide, neuronal precursor differentiation, double-stranded DNA breaks

12. ŽIVOTOPIS

Rođen sam u Zagrebu 18. studenog 2000. godine. Obrazovanje sam započeo u Osnovnoj školi Miroslava Krleže u Zagrebu 2006. godine. XV. gimnaziju u Zagrebu upisao sam 2014. godine. Kao učenik drugog razreda srednje škole sudjelovao sam u projektu za darovite učenike „Neuroetika“ s istraživanjem „Tretman ADHD-a u djece u Hrvatskoj“, a u suradnji s Hrvatskim institutom za istraživanje mozga, Prirodoslovno matematičkim fakultetom Sveučilišta u Zagrebu te udrugom „Buđenje“. U okviru tog projekta istraživali smo i raspravili moralnu opravdanost farmakološke terapije djece s ADHD-om. Maturirao sam 2019. godine i upisao Medicinski Fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Kao demonstrator radio sam na Katedri za fiziologiju i imunologiju te volontirao na Katedri za patofiziologiju i Katedri za anatomiju i kliničku anatomiju. U rujnu 2021. godine dobio sam „Potvrdu o izvrsnosti u patofiziologiji za studente medicine“ na Katedri za patofiziologiju Medicinskog fakulteta. Kao suautor sažetka „Respiratorni simptomi i komplikacije COVID – 19 u žena reproduktivne dobi“, u rujnu 2021. godine sudjelovao sam na *13. međunarodnom kongresu o ginekološkoj endokrinologiji, humanoj reprodukciji i menopauzi s međunarodnim sudjelovanjem*. U travnju 2023. godine sudjelovao sam na međunarodnom kongresu *NeuRi – 12th student congress of neuroscience* s usmenim izlaganjem sažetka „Influence of hydrogen peroxide on expression of γ H2AX in neural stem cells“ kao prvi autor.