

# Diferencijacija stanica u primarnoj kulturi neurona iz dva soja transgeničnih miševa

## Differentiation of cells in a primary culture of neurons from two transgenic mouse strains



Mirić, M.<sup>1\*</sup>, S. Kužir<sup>2</sup>, I. Alić<sup>2</sup>

### Sažetak

Matične stanice mogu se diferencirati u različite vrste stanica i nailaze na široku eksperimentalnu primjenu. Iz tog su razloga istraživanja matičnih stanica u posljednjih petnaestak godina u velikom porastu. Cilj je ovog istraživanja usporedba diferencijacije neurona podrijetlom iz dvaju različitih transgeničnih sojeva miša u svrhu prikaza njihovih osobitosti za daljnju primjenu u istraživanjima matičnih stanica. U ovom je radu uzgojena primarna kultura neurona iz dvaju mišjih sojeva, ubikvitarnog GFP-LUC i Thy1-YFP. Uzgojeni neuroni analizirani su 7. i 14. dan, opisan je uzorak izražaja bjelančevina te su međusobno uspoređeni neuroni podrijetlom iz dvaju navedenih mišjih sojeva. Stanice mišjega soja GFP-LUC tijekom 7. dana diferencirale su se u potpunosti u zrele neurone i astrocite. U 100 % stanica pozitivan je GFP. U ovoj su skupini stanica biljezi neurona (MAP2,  $\beta$ 3-tubulin i NeuN) pozitivni u 90 % diferenciranih stanica, a biljeg astrocita (GFAP) samo u 10 % stanica. Tijekom 14. dana stanice su razvijenije, na što upućuju deblji nastavci koji su prisutni u većem broju. Biljezi neurona pozitivni su u 80 % diferenciranih stanica, a biljeg astrocita pozitivan je u 20 % stanica. Stanice mišjega soja Thy1-YFP tijekom 7. dana također su se diferencirale u zrele neurone i astrocite, međutim samo je 20 % neurona YFP-pozitivno. Kao i u GFP-LUC mišjeg soja, 7. dan diferencijacije prisutno je 90 % neurona i 10 % astrocita, a 14. dan 80 % neurona i 20 % astrocita.

### Abstract

Stem cells are able to differentiate into various types of cells, and they are used in a wide range of experimental work. Therefore, stem cell research has been growing enormously over the last fifteen years. The aim of our research was to analyze the differentiation of neurons originating from two different strains of transgenic mice in order to describe their characteristics for their further use in stem cell research. In our study we cultured neurons from two mouse strains, the ubiquitous GFP-LUC and Thy1-YFP strains. The cultured neurons were analyzed on day 7 and day 14; we described the pattern of protein expression, and compared the neurons of the two strains. Cells derived from the GFP-LUC mouse strain were differentiated into neurons and astrocytes on day 7. The cells were 100% GFP positive. Out of these cells, 90% were neurons expressing neuronal markers (MAP2,  $\beta$ 3-tubulin and NeuN) and 10% were astrocytes expressing the astrocyte marker GFAP. On the 14<sup>th</sup> day of differentiation the cells were more developed, with thicker and more numerous processes. 80% of cells expressed neuronal markers while 20% expressed GFAP. Cells derived from the Thy1-YFP mouse strain were also differentiated on the 7<sup>th</sup> day, but only 20% of neurons were Thy1-YFP positive. On the 7<sup>th</sup> day we observed 90% neurons and 10% astrocytes in the Thy1-YFP cell culture, while on the 14<sup>th</sup> day the ratio of neurons decreased to 80% and of astrocytes it increased to 20%. A similar ratio was observed in GFP-LUC cells.

<sup>1</sup>Mladen Mirić, dr. med. vet.,  
<sup>2</sup>izv. prof. dr. sc. Snježana Kužir, dr. sc. Ivan Alić, Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

\*e-mail:  
[miric\\_mladen@yahoo.com](mailto:miric_mladen@yahoo.com)

**Ključne riječi:** GFP-LUC, Thy1-YFP, matične stanice, diferencijacija, biljezi neurona, biljezi astrocita

**Key words:** GFP-LUC, Thy1-YFP, stem cells, differentiation, neuronal markers, astrocyte marker

## UVOD

U posljednjih petnaestak godina tehnologija matičnih stanica intenzivno se razvija, a istraživanja u ovom području pobuđuju velik znanstveni interes širom svijeta. Velik interes za matične stanice, bilo koje vrste, prije svega vidi se prema broju objavljenih radova od kojih se velik broj nalazi u relevantnim bazama kao što je PubMed. Budući da adekvatne terapije za većinu bolesti živčanog sustava još uvijek nema, a njega pacijenata iznimno je skupa i složena, terapija živčanim matičnim stanicama jedan je od najvećih izazova u suvremenoj neuroznanosti.

Matične stanice (engl. *stem cells*) jesu široka populacija stanica od kojih se u kontroliranim uvjetima mogu diferencirati različite vrste stanica. Prema osnovnoj podjeli matične se stanice mogu podijeliti na: totipotentne (zigota), pluripotentne (embrionalne matične stanice), multipotentne (npr. živčane matične stanice) (Hyttel i sur., 2010.; McGeady i sur., 2014.). Živčane matične stanice nalaze se u mozgu odraslog miša, ali i u mozgu čovjeka, i to u subventrikularnoj zoni i u zrnatom sloju hipokampusa (Gage, 2000.; Mitrečić i sur., 2009.; Watson i sur., 2012.).

U istraživanjima matičnih stanica veliku i nezaobilaznu ulogu imaju transgenične životinje, odnosno životinje kojima su zahvaljujući genetičkim modifikacijama „ubačene“ fluorescentne bjelančevine. Najčešća i najpoznatija takva bjelančevina jest zelena fluorescentna bjelančevina ili GFP (engl. *green fluorescent protein*), ili jedna od njegovih spektralnih varijanti: YFP (engl. *yellow fluorescent protein*), RFP (engl. *red fluorescent protein*) i CFP (engl. *cyan fluorescent protein*). U literaturi su opisane brojne modifikacije miševa, no najčešće se radi ili o ubikvitarno pozitivnim životinjama, što znači da sve stanice u tijelu izražavaju zelenu fluorescentnu bjelančevinu, ili o drugoj varijanti kod koje se fluorescentna bjelančevina izražava preko određenog gena i pozitivne su samo određene stanice. U ovom su istraživanju korištena dva mišja soja, ubikvitarni GFP-LUC i Thy1-YFP soj.

GFP-LUC mišji soj razmjerno je nov soj, na kojemu još nema niti jedna publikacija. Na sličnim GFP sojevima napravljena su istraživanja poput onoga Koniga i suradnika (2014.), u kojemu je praćena diferencijacija transplantiranih GFP stanica nakon ozljede spinalnog ganglija ili

su GFP stanice štakora korištene za intravaskularnu transplantaciju na modelu amiotrofične lateroskleroze pri čemu su uspješno prošle kroz krvno-moždanu barijeru i ugradile se u mozak domaćina (Mitrečić i sur., 2010.; Mitrečić, 2011.).

Thy1-YFP mišji soj postoji već šesnaest godina (Feng i sur., 2000.), a obilježava ga izražaj fluorescentne bjelančevine pomoću promotora Thy1-gena. Fluorescencija je visokospecifična isključivo za neurone i niti jedna druga stanica nije pozitivna. Iako je ova skupina autora napravila čak 25 sojeva ovoga miša, zanimljivo je da svi imaju različit uzorak fluorescencije i obilježavaju različitu populaciju neurona. Thy1-YFP pozitivne stanice izražavaju fluorescentnu bjelančevinu u svim svojim dijelovima stanice, uključujući: jezgru, perikarion, nastavke (akson i dendriti), čak i spine. Prvi opis soja publiciraju Feng i sur., 2000. te Keller-Peck i sur., 2001., koji su najveći dio istraživanja napravili na dva soja (YFP-H i GFP-S) te tijekom prva dva tjedna postnatalnog života (Porrero i sur., 2010.). Carter i suradnici (2008.) opisali su degenerativne promjene i oporavak koji se zbivaju nakon ozljede kralježnične moždine, dok je druga skupina autora opisala važnost soja u istraživanjima tumora, upalama kao i u cijeljenju rana (Josvay i sur., 2014.). Velika prednost ovoga soja jest vidljiv izražaj YFP u jezgri, ali i u citoplazmi neurona, što omogućuje vizualiziranje čitave stanice (Bannerman i sur., 2005.; Wang i sur., 2006.). Na taj način omogućuje preciznu analizu izražaja bjelančevine u svim dijelovima stanice. Detaljna analiza diferencijacije živčanih matičnih stanica Thy1-YFP soja tijekom diferencijacije *in vitro*, tijekom embrionalnog razvoja i nakon transplantacije u mozak miša zahvaćen moždanim udarom opisana je u ranijim istraživanjima Laboratorija za matične stanice (Alić, 2015.; Alić i sur., 2016.). Nadalje, na istom je soju napravljena i analiza izražaja gena tijekom diferencijacije živčanih matičnih stanica pomoću RT-PCR (Stojanac, 2016.).

Glavni cilj ovoga istraživanja bio je napraviti primarnu kulturu neurona podrijetlom iz dvaju mišjih sojeva, opisati uzorak izražaja bjelančevina te ih međusobno usporediti. Budući da se radi o razmjerno novim mišjim sojevima, primarna kultura neurona na ovim sojevima do sada još nije napravljena.

## MATERIJALI I METODE

### Životinje

Za potrebe ovoga istraživanja korištene su dvije gravidne ženke, podrijetlom iz dvaju različitih mišjih sojeva: ubikvitarni GFP-LUC (izražava GFP u svim stanicama) i Thy1 (izražava YFP u određenim neuronima). Životinje su smještene u nastambi za životinje pri Hrvatskom institutu za istraživanje mozga. Istraživanje je napravljeno u Laboratoriju za matične stanice, a odobreno je rješenjima Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta (ur. broj: 04-77/2010-238) i Veterinarskoga fakulteta (ur. broj: 251-61-01/139-16-2) Sveučilišta u Zagrebu.

### Izolacija živčanih matičnih stanica

Za izolaciju živčanih matičnih stanica korištene su ženke koje su bile gravidne 17,5 dana. Takve su ženke žrtvovane cervikalnom dislokacijom te su im izolirani gravidni rogovi maternice. Od tog se trenutka proces izolacije živčanih matičnih stanica nastavio u sterilnim uvjetima, u staničnoj kulturi. Izolirani gravidni rogovi prebačeni su u sterilnu Petrijevu posudu s HBSS puferom (Gibco). Zametak je odvojen od ovojnice, nakon čega je napravljena dekapitacija te je krajnji mozak (*telencephalon*) pažljivo odvojen. Krajnji mozgovi od 10 zametaka mehanički su usitnjeni škaricama i premješteni u sterilnu tubu (BD Falcon, 50 mL). Kako bi se nastalo usitnjeno tkivo proteolitički razgradilo i kako bi se dobila suspenzija stanica, dodano je 5 mL akutaze (StemPro®Acutase® Cell Dissociation Reagent, Gibco by life Technologies, A11105-01) tijekom 20 minuta, na temperaturi od 37 °C. Tkivo je dodatno usitnjeno mehaničkim provlačenjem kroz nastavak za pipetu tijekom tih 20 minuta. Stanična suspenzija je nakon 20 minuta prebačena u novu tubu i na nju je dodana ista količina medija kako bi se akutaza deaktivirala. Osim toga, cijela je tuba stavljena na centrifugu nabrzinu od 300 g tijekom 6 minuta, na temperaturu od 21 °C. Nakon centrifugiranja potreban je samo talog, stoga se tekući dio uklonio. Stanice su međusobno odvojene i oslobođene komadića tkiva koje je zaostalo, pa je iz tog razloga na talog dodano 2 mL medija. U međuvremenu je, prema broju stanica, pripremljen medij u kojemu su stanice nasadene na podloge. Stanice su

nasadene u mediju (DMEM/F-12 (1:1) (1X)+Glu-taMAX™-I, Gibco by life Technologies, 31331-028) u koji je dodan B-27 (B-27®Supplement (50X), Gibco by life Technologies, 17504-044), Pen Strep (Penicillin Streptomycin, Gibco by life Technologies, 15070-063) i N-2 (N-2 Supplement (100x). Stanice su uzgajane u inkubatoru na temperaturi od 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub>.

### Priprema podloga za diferencijaciju stanica

Podloga za diferencijaciju stanica, odnosno stakla (engl. *cover slips*) promjera 12 mm, pripremana je 4 – 5 dana. Prvo su stakla ostavljena preko noći u dušičnoj kiselini, nakon čega su ispirana sterilnom vodom tijekom dva sata. Nakon ispiranja ostavljena su 24 sata u 70 %-tnom alkoholu. Sljedećeg su dana stakla sterilizirana na temperaturi od 250 °C tijekom 12 sati. Nakon sterilizacije, na stakla je stavljeno 130 µL Poly-D-lizina u koncentraciji 500 µg/mL (Poly-D-lysine hydrobromide, SIGMA, P6407-5MG) tijekom 24 sata. Poly-D-lizin isprane sterilnom vodom, a stakla su premještena u ploče za diferencijaciju (engl. *24 well plate*) te je na njih stavljeno 400 µL laminina u koncentraciji 10 µg/mL (*Laminin from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma basement membrane*, SIGMA, L2020-1MG) tijekom 24 sata. Nakon toga je laminin dva puta ispran svježim medijem i tada su stakla bila spremna za diferencijaciju stanica.

### Nasađivanje, diferencijacija i fiksacija stanica

Stanice su nasadene u koncentraciji od 200 do 250 000 stanica po jednom staklu. Budući da su za potrebe ovoga istraživanja korištene primarne kulture neurona, stanice su neposredno nakon izolacije nasadene na prethodno pripremljene podloge. Nakon nasađivanja stanice su stavljene na diferencijaciju u inkubator. Staničama je nakon 24 sata promijenjen medij, kako bi se podržao rast i diferencijacija neurona. Za primarne kulture u Laboratoriju za matične stanice standardno se rabi tzv. kondicionirani medij. Kondicionirani medij dobiven je tako da se Neurobasal medij, u koji su dodani čimbenici i antibiotik, stavi na uzgojene astrocite. Nakon 24 sata medij je pokupljen s astrocita, profiltriran i dodan na neurone. Kondicionirani medij služi kako bi potaknuo rast neurona, budući da su

**Tablica 1.** Primarna protutijela korištena u ovom istraživanju.

Protutijelo	Podrijetlo	Razrjeđenje	Proizvođač
Doublecortin	kunić	1:200	Cell Signaling (#4606)
GFAP	pile	1:250	Abcam (ab4674)
GFP	pile	1:500	Molecular probes (A10262)
MAP2	pile	1:1000	Abcam (ab5392)
NeuN	miš	1:200	Millipore (MAB377)
β3-tubulin	kunić	1:200	Cell Signaling (D71G9)

**Tablica 2.** Sekundarna protutijela korištena u ovom istraživanju.

Protutijelo	Razrjeđenje	Proizvođač
Alexa Fluor 546 koza anti – pile IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A11040)
Alexa Fluor 488 koza anti – kunić IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A11084)
Alexa Fluor 488 koza anti – pile IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A11039)
Alexa Fluor 488 magarac anti – kunić IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A21206)
Alexa Fluor 647 magarac anti – miš IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A21202)
Alexa Fluor 546 magarac anti – kunić IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A21206)
Alexa Fluor 647 magarac anti – kunić IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A21002)

astrociti u njega izlučili svoje produkte koji se fiziološki nalaze u živčanom tkivu. Stanice su za potrebe ovoga istraživanja uzgajane u dvije vremenske točke (7 i 14 dana) kako bismo dobili potpuno diferencirane neurone. Nakon 7 i 14 dana stanice su fiksirane 4 %-tnim paraformaldehidom tijekom 15 minuta te su isprane PBS (engl. *Phosphate buffer saline*) puferom i ostavljene na +4 °C do bojanja.

### **Imunocitokemija**

Fiksirane su stanice tri puta po pet minuta ispirane PBS-om, nakon čega im je dodano 500 μL otopine za permeabilizaciju i blokiranje nespecifičnog vezanja sekundarnog protutijela (0,2 % triton X-100 (Sigma, T8787-100ML) u PBS-u + 3 % kozjeg seruma). Blokiranje sekundarnog protutijela traje 60 minuta. Zatim je stanicama dodano 85 μL otopine primarnog protutijela

(0,2 % triton X-100 u PBS-u + 1 % kozjeg seruma + primarno protutijelo) i to je ostavljeno preko noći u hladnjaku na +4 °C. Primarna protutijela korištena u ovom istraživanju prikazana su u tablici 1.

Sljedeći dan primarna protutijela isprana su tri puta po pet minuta PBS-om, poslije čega je na stanice stavljena otopina sekundarnih protutijela (0,2 % triton X-100 u PBS-u + sekundarno protutijelo). Popis sekundarnih protutijela korištenih u ovom istraživanju prikazan je u tablici 2. Inkubacija sekundarnim protutijelima zbiva se na sobnoj temperaturi u zamračenoj prostoriji tijekom dva sata. Nakon toga su sekundarna protutijela ispirana istim postupkom kao i primarna te se na stanice stavlja DAPI, fluorescentna boja za jezgre, u koncentraciji 1:8000. DAPI je ispran nakon deset minuta, i to jednako kao primarna i sekundarna protutije-

la, odnosno tri puta po pet minuta. Nakon što je DAPI ispran, stanice su poklopljene medijem za fluorescentno poklapanje (Dako Fluorescent Mounting Medium, S3023). Poklopljeni su preparati ostavljeni na sušenju u hladnjaku na +4 °C i bili su spremni za mikroskopiranje na konfokalnom mikroskopu (Zeiss, LSM 510 Meta).

### Prebrojavanje stanica

Broj obojenih stanica određen je nakon slikanja preparata konfokalnim mikroskopom (Zeiss LSM 510 Meta) na deset vidnih polja. Za kvantifikaciju stanica *in vitro* korištene su stanice obaju mišjih sojeva u vremenskim točkama od 7 i 14 dana. Kvantifikacija je rađena kako bi se odredio broj Thy1 pozitivnih stanica, broj neurona i astrocita u primarnoj kulturi neurona. Prebrojavanje je napravljeno od strane dvaju neovisnih istraživača, a rezultati prebrojavanja poklapali su se u 100 % slučajeva.

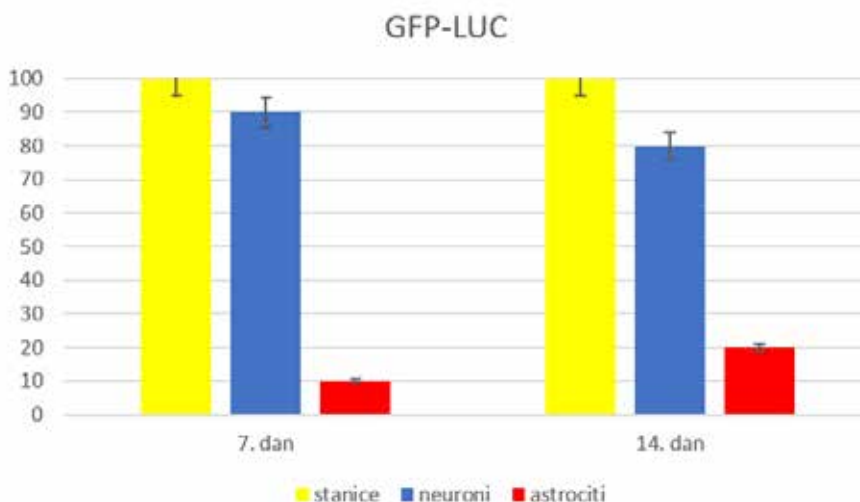
## REZULTATI

### Diferencijacija GFP-LUC stanica

Tijekom sedmog dana diferencijacije stanice podrijetlom od GFP-LUC mišjeg soja u potpunosti su se diferencirale u zrele, razgranate neurone i astrocite. Budući da su stanice podrijetlom od ubikvitarnog mišjeg soja, sve stanice, neuroni i astrociti, GFP su pozitivne (slika 1 A-C, zeleno). Osim GFP-a, koji je pozitivan u 100 % diferenciranih stanica, napravljeno je bo-

jenje stanica na tipične biljege neurona (MAP2,  $\beta$ 3-tubulin i NeuN) te za astrocite (GFAP). Tipični citoplazmatski biljezi neurona (MAP2 i  $\beta$ 3-tubulin) pozitivni su u 90 % diferenciranih stanica (grafikon 1) i jasno su pozitivni u perikarionu i nastavcima neurona (slika 1A i C, crveno). Treći biljeg neurona NeuN (slika 1A-C, plavo) koji je specifičan za jezgru neurona, također boji 90 % stanica, ali osim u jezgrama, NeuN je u potpuno diferenciranim stanicama pozitivan i u nastavcima. Pozitivnost NeuN-a u nastavcima očituje se kao granulirani signal koji je izražen gotovo čitavom dužinom nastavaka. Na stopljenim slikama jasno se vidi da se sva tri biljega neurona u potpunosti podudaraju sa signalom GFP-a. Svega je 10 % (grafikon 1) stanica diferencirano u astrocite i GFAP je pozitivno te također pokazuje kolokalizaciju s GFP-om (slika 1B, crveno).

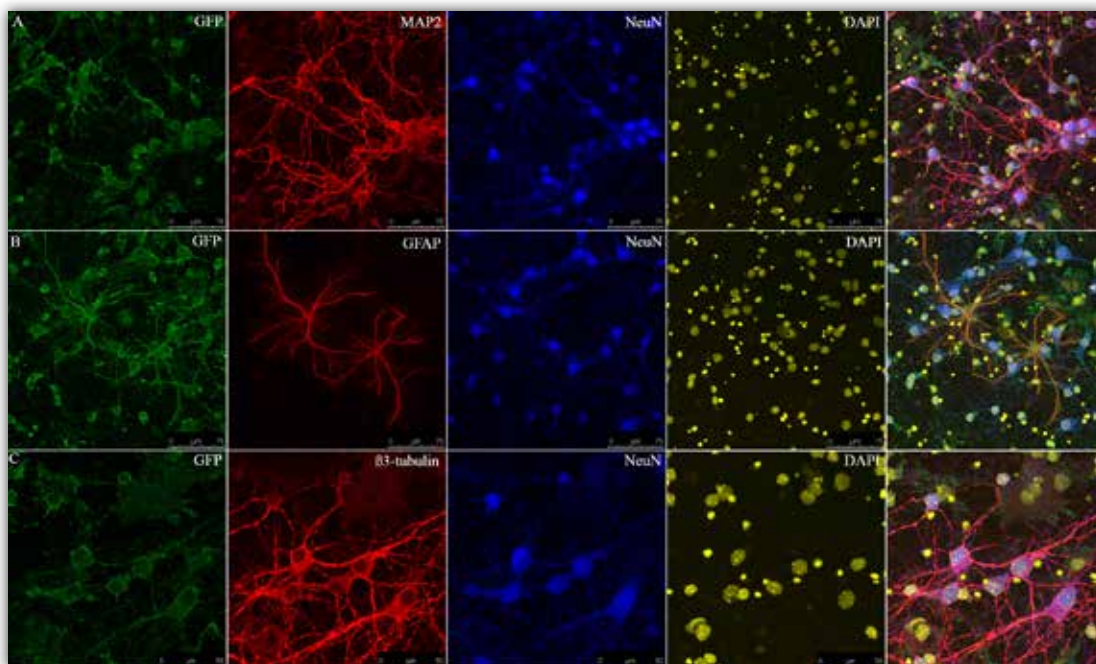
Tijekom četrnaestog dana diferencijacije stanice su znatno razvijenije nego u prethodnoj vremenskoj točki. Razvijenost, odnosno zrelost stanica očituje se u većem broju i debljini samih nastavaka. U ovoj vremenskoj točki govorimo o potpuno zreloj primarnoj kulturi mišjih neurona. Ukupan broj stanica u kulturi manji je zbog prirodnog odumiranja stanica *in vitro*, ali su one izrazito diferenciranije i zrelije. Neurona u staničnoj kulturi ima 80 % od ukupnog broja prebrojenih stanica (grafikon 1) i u potpunosti kolokaliziraju s MAP2 (slika 2A, crveno),  $\beta$ 3-tubulinom (slika 2C, crveno) i NeuN-om (slika 2A-C, plavo). Zrelost neurona najbolje se vidi na snažnom izražaju NeuN-a čija je citoplazmatska



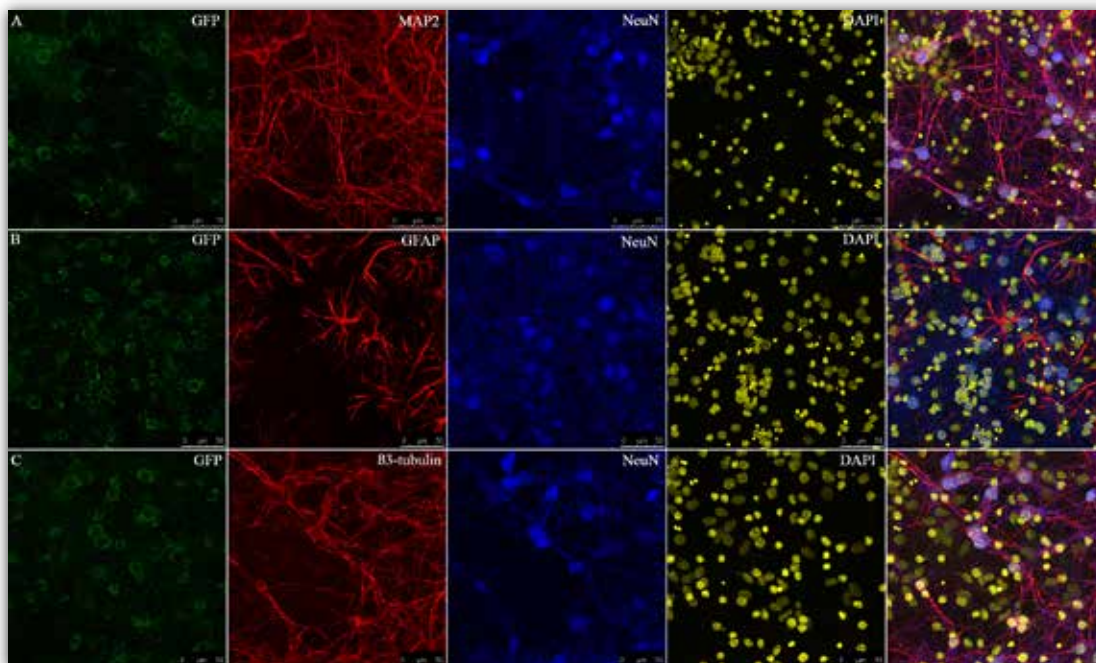
**Grafikon 1.** Prebrojavanjem ukupnog broja stanica na deset vidnih polja određen je broj neurona i astrocita tijekom diferencijacije stanica u primarnoj kulturi neurona. Na osi X prikazane su vremenske točke diferencijacije stanica, dok je na osi Y prikazan broj stanica izražen u postotku.



**Slika 1.** Imunocitokemija GFP-LUC stanica (zeleno) tijekom 7. dana diferencijacije. Slika A. Bojenje s MAP2 (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika. Slika B. Bojenje s GFAP-om (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika. Slika C. Bojenje s  $\beta$ 3-tubulinom (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika.



**Slika 2.** Imunocitokemija GFP-LUC stanica (zeleno) tijekom 14. dana diferencijacije. Slika A. Bojenje s MAP2 (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika. Slika B. Bojenje GFAP-om (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika. Slika C. Bojenje  $\beta$ 3-tubulinom (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika.



granularnost neusporedivo veća nego u prethodnoj vremenskoj točki. Budući da se astrociti sporije diferenciraju, ali i zbog odumiranja pojedinih neurona u ovoj vremenskoj točki nalazi se veći broj GFAP-pozitivnih stanica i iznosi 20 % (grafikon 1) od ukupnog broja prebrojenih stanica (slika 2B, crveno).

Kao negativna kontrola bojenja stanica na jedno staklo u svakoj vremenskoj točki stavljena je samo otopina sekundarnih protutijela.

Budući da nije bilo primarnih protutijela, sekundarna se protutijela nisu imala na što vezati te na ovim preparatima nije vidljiv nikakav signal (nije prikazano).

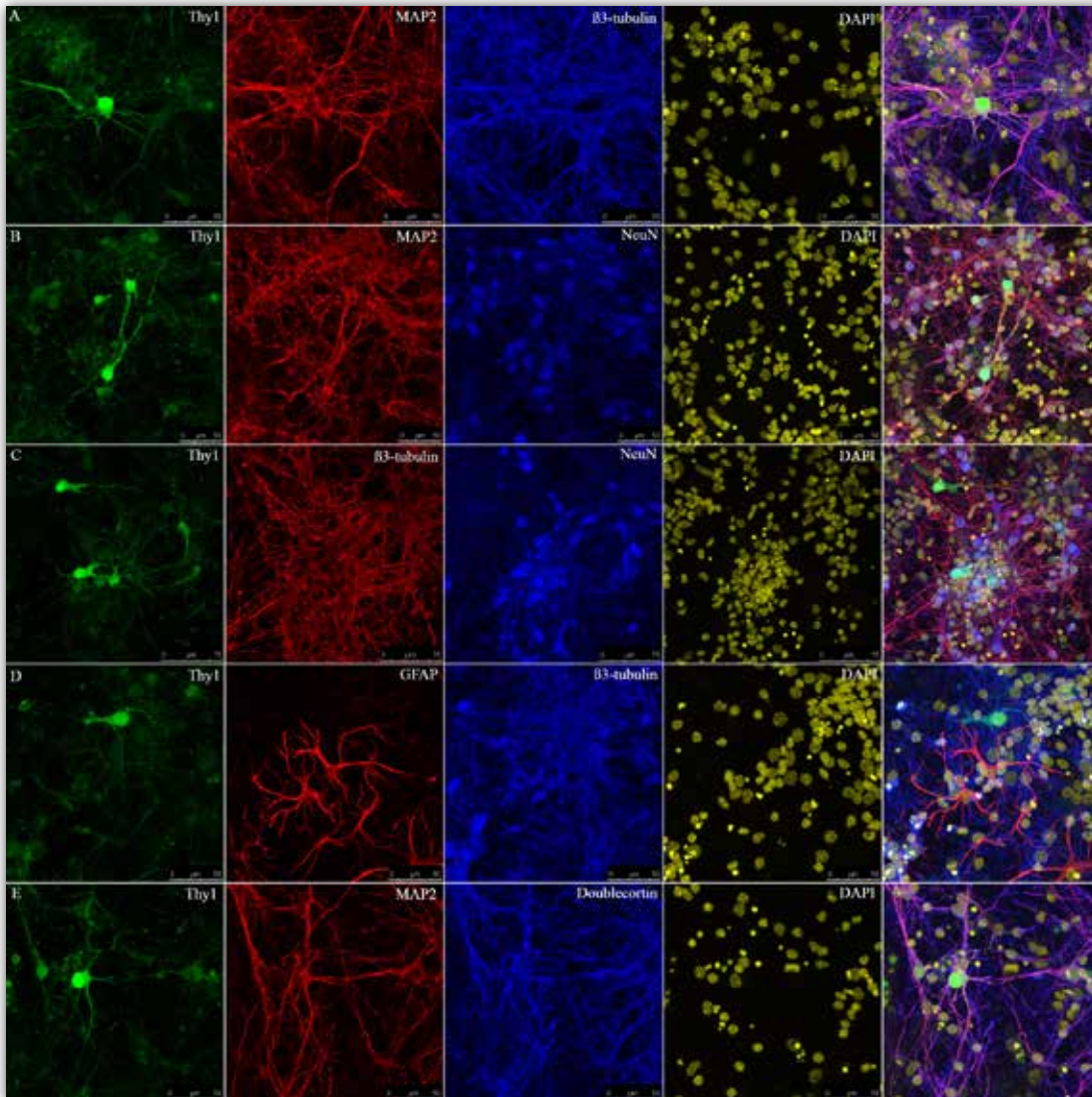
### Diferencijacija stanica *Thy1*

Tijekom sedmog dana diferencijacije stanice podrijetlom od mišjeg soja *Thy1-YFP* u potpunosti su se diferencirale u zrele neurone i astrocite. Budući da ovaj mišji soj ne izražava

ubikvitarno GFP, već samo u određenom postotku neurona, prebrojavanjem stanica vidljivo je da svega 20 % neurona izražava GFP, odnosno njegovu varijantu YFP (slika 3A-E, zeleno). Osim ovoga biljega neurona, čija se fluorescencija izražava bez imunocitokemije, na stanicama je napravljena imunocitokemija kako bi se odredila kolokalizacija s biljezima neurona (MAP2,  $\beta$ 3-tubulin, NeuN i Doublecortin) te astrocita (GFAP). Sve Thy1-pozitivne stanice kolokaliziraju s tipičnim biljezima neurona: MAP2 (slika 3A, B i E, crveno),  $\beta$ 3-tubulin (slika 3A, plavo, C, crveno i D, plavo), NeuN (slika 3B i C, plavo) te Doublecortin (slika 3E, plavo). Niti jedna Thy1-pozitivna stanica nije GFAP-pozitivna, odnosno izražaj Thy1 specifičan je za neurone. Na

stopljenim slikama (slika 3A-E) vidi se potpuna kolokalizacija Thy1 s biljezima neurona (ljubičasto), dok su astrociti crveni. Prebrojavanjem diferenciranih stanica u ovoj vremenskoj točki vidljivo je da je u kulturi prisutno 90 % neurona i 10 % astrocita. Od ukupnog broja neurona njih je 20 % Thy1-pozitivno (grafikon 2).

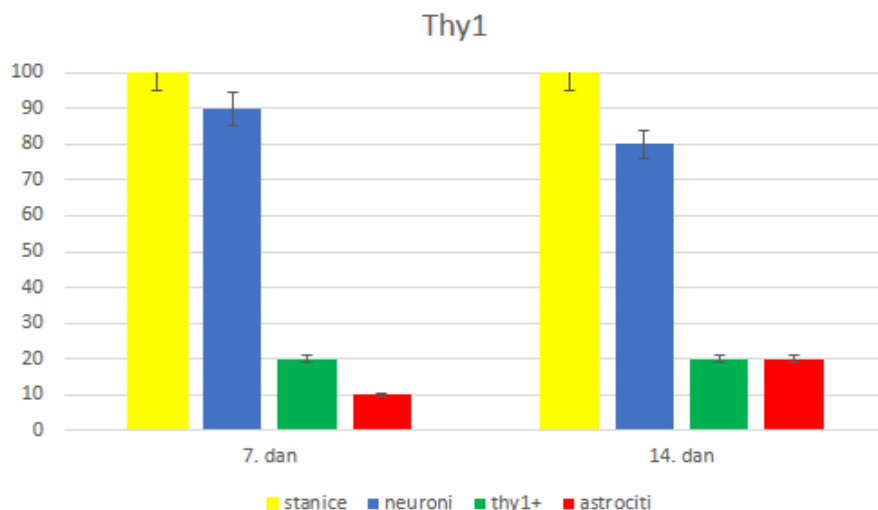
Tijekom četrnaestog dana diferencijacije stanice su znatno razvijenije nego u prethodnoj vremenskoj točki. Kao i kod prethodnog mišjeg soja, razvijenost, odnosno zrelost stanica očituje se u većem broju i debljini samih nastavaka. I u ovih je stanica ukupan broj stanica po vidnom polju nešto manji, ali i ovdje zbog načina uzgoja stanica prevladavaju neuroni (80 %), od kojih je 20 % Thy1-pozitivno, a udio astrocita iznosi



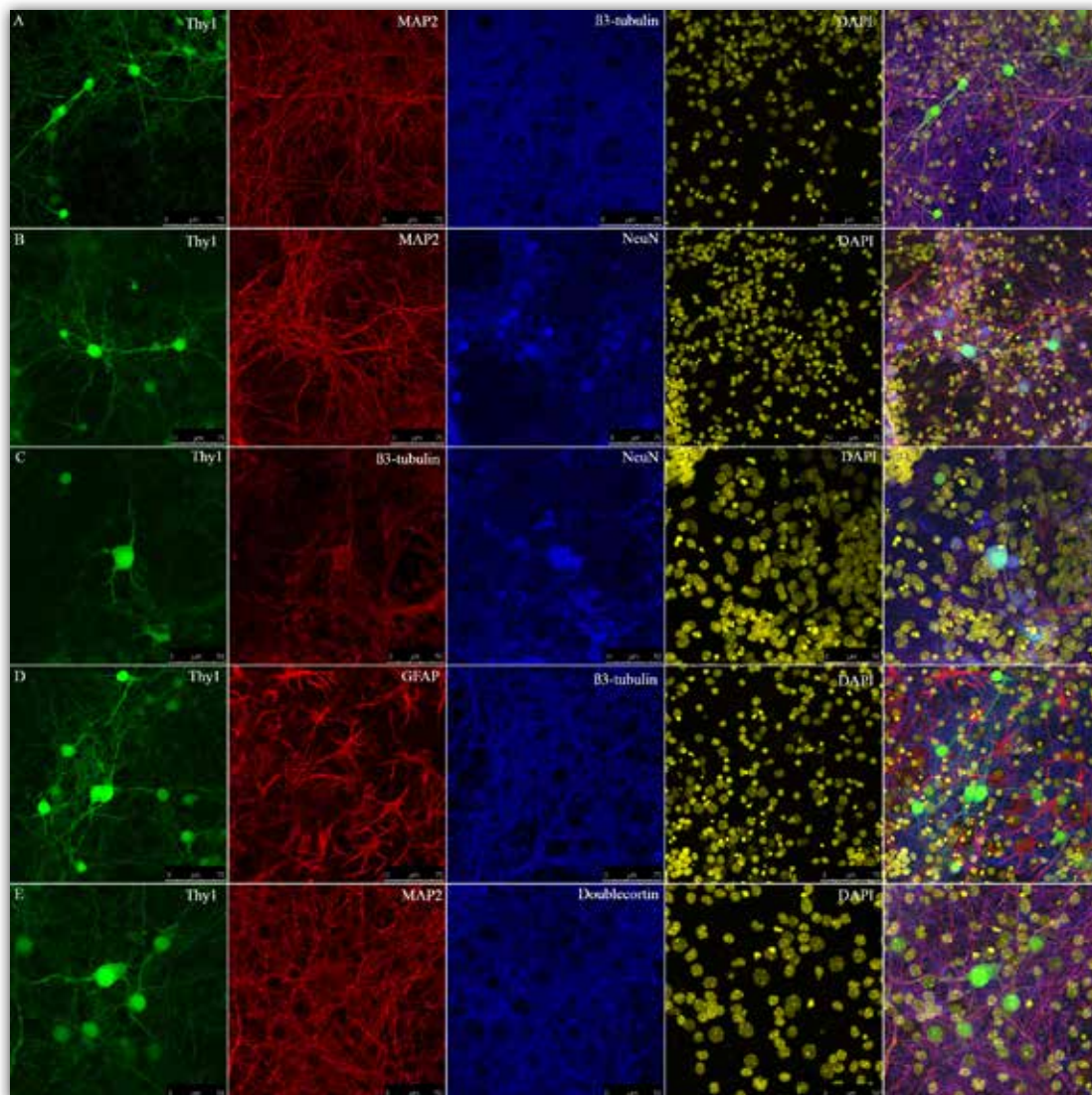
**Slika 3.** Imunocitokemija stanica Thy1 (zeleno) tijekom 7. dana diferencijacije. Slika A. Bojenje s MAP2 (crveno),  $\beta$ 3-tubulinom (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika. Slika B. Bojenje s MAP2 (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika. Slika C. Bojenje s  $\beta$ 3-tubulinom (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika. Slika D. Bojenje s GFAP-om (crveno),  $\beta$ 3-tubulinom (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika. Slika E. Bojenje s MAP2 (crveno), Doublecortinom (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika.



**Grafikon 2.** Prebrojavanjem ukupnog broja stanica na deset vidnih polja određen je broj neurona, Thy1-pozitivnih neurona i astrocita tijekom diferencijacije stanica u primarnoj kulturi neurona. Na osi X prikazane su vremenske točke diferencijacije stanica, dok je na osi Y prikazan broj stanica izražen u postotku.



**Slika 4.** Imunocitokemija stanica Thy1 (zeleno) tijekom 14. dana diferencijacije. Slika A. Bojenje s MAP2 (crveno),  $\beta$ 3-tubulinom (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika. Slika B. Bojenje s MAP2 (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika. Slika C. Bojenje s  $\beta$ 3-tubulinom (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika. Slika D. Bojenje GFAP-om (crveno),  $\beta$ 3-tubulinom (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika. Slika E. Bojenje s MAP2 (crveno), Doublecortinom (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika.





također 20 % (grafikon 2). Na slici 4 prikazane su stanice obojene biljezima neurona i astrocита. Osim imunohistokemije na svim su slikama obojene i jezgre DAPI bojom (žuto).

Zanimljiva je velika pozitivnost Doublecortina (slika 3 i 4E, plavo) za koji iz literature znamo da je biljeg mladih neurona, odnosno neurona u nastanku. Ovakvim načinom uzgoja stanica i u ovim uvjetima Doublecortin je pozitivan u objema vremenskim točkama i u potpunosti kolokalizira s Thy1 i drugim biljezima neurona, što se jasno vidi na stolpljenim slikama (slika 3 i 4E, ljubičasto).

Kao negativna kontrola bojanja stanica, na jedno staklo u svakoj vremenskoj točki stavljena je samo otopina sekundarnih protutijela. Budući da za Thy1 nije potrebno protutijelo, na ovim su preparatima vidljive samo Thy1 (zele- ne) stanice (nije prikazano).

## RASPRAVA

Tijekom ovog istraživanja napravljena je primarna kultura neurona podrijetlom od dvaju mišjih sojeva, GFP-LUC i Thy1-YFP. Stanice su neposredno nakon izolacije nasadene na prethodno pripremljene podloge te su stavljene na diferencijaciju tijekom četrnaest dana kako bi se odredio broj diferenciranih stanica, uzorak izražaja fluorescentne bjelančevine te međusobno usporedile stanice podrijetlom od ovih dvaju sojeva.

Budući da se radi o stanicama u primarnoj kulturi neurona, stanice su uzgajane tjedan dana dulje nego što se diferenciraju živčane matične stanice u Laboratoriju za matične stanice. Stanice podrijetlom iz GFP-LUC soja 100 % su pozitivne budući da je GFP ubikvitarno „ubačen“ u blastocistu miša. Sve su stanice pozitivne, odnosno zelene. Za vizualizaciju ovog biljega potrebno je protutijelo, što je uobičajeno kod ubikvitarnih GFP mišjih sojeva. Opisujući kulturu stanica GFP je citoplazmatski biljeg, koji je intenzivno pozitivan u čitavoj citoplazmi perikariona i nastavaka, dok jezgra nije pozitivna. Nadalje, razlikuje se citoplazmatska obojenost neurona i astrocита, dok se u neuronima vidi granularna pozitivnost, astrociti su zagasito zelene boje i signal je ujednačen, odnosno nema granulacije kakva je opisana u neurona. Stanice podrijetlom iz ovoga soja potpuno su se

diferencirale za sedam dana, a nakon četrnaest dana dosežu svoj maksimalni diferencijacijski potencijal. Stanice pokazuju kolokalizaciju sa svim neuronskim biljezima kao i glije.

Stanice Thy1-YFP također su se potpuno diferencirale već sa sedam dana te su kao i stanice GFP-LUC dosegnule svoj maksimum četrnaestog dana. Za razliku od GFP, za Thy1 nije potrebno protutijelo, ovaj je biljeg pozitivan u čitavoj stanici, uključujući perikarion s jezgrom, nastavcima, čak i spinama. Na temelju broja spina i položaja na nastavcima određuje se sinaptička aktivnost, odnosno funkcionalna uloga neurona, međusobno, ali i sa stanicama glije (Vukšić i sur., 2008.). No, za razliku od GFP-a, Thy1 je pozitivan samo u određenom broju neurona, i to u svega 20 % stanica. Ovaj je broj stalan i ne mijenja se tijekom diferencijacije stanica.

Iako je način uzgoja i diferencijacije ovih stanica prilagođen neuronima, i zapravo pogoduje razvoju neurona, ipak se u kulturi tijekom sedmoga dana nalazi 10 % astrocита (GFAP-pozitivnih stanica) dok je četrnaestog dana taj udio porastao na 20 %. Razmjerno velik postotak astrocита može se objasniti na tri načina: astrociti se znatno sporije diferenciraju tijekom embrionalnog razvoja pa im i u *in vitro* uvjetima treba više vremena da bi postigli svoju pozitivnost, drugi je uzrok taj što su stanice izolirane iz starijih zametaka i odmah nasadene te je u startu bilo više progenitora glije i, konačno, odumiranjem neurona i starenjem kulture aktiviraju se glija-stanice koje imaju ulogu čistača i na taj način dolaze do izražaja. Iako ovi rezultati pokazuju znatno veći udio astrocита u odnosu na prethodna istraživanja na živčanim matičnim stanicama (Alić i sur., 2016.; Stojanac, 2016.), rezultati ovog istraživanja svojevrsan su nastavak i nadogradnja postojećih rezultata budući da je analiza napravljena na primarnoj kulturi stanica. U svom istraživanju Stojanac (2016.) opisuje izražaj GFAP-a već treći dan diferencijacije na razini izražaja gena, dok su imunocitokemijski prve stanice vidljive tek peti dana diferencijacije. Rezultat ovog istraživanja pokazuje da su i progenitori GFAP pozitivni, odnosno razina nukleinskih kiselina u stanici dovoljna je da bi se mogla očitati, ali da bi se stvorila bjelančevina vizualizirana s protutijelima, potrebna su još dva dana diferencijacije. Iako je

materijal iz kojega su izolirani primarni neuro-ni stariji, odnosno zreliji tri dana od prethodnih istraživanja, sedmi dan diferencijacije u kulturi se nalazi samo 5 % više astrocita u odnosu na živčane matične stanice.

U ovom su istraživanju zapažena i opisana dva neočekivana nalaza. Stanice podrijetlom od obaju sojeva pozitivne su i kolokaliziraju 100 % s neuronskim biljezima. No, NeuN, za koji iz dostupne literature znamo da boji jezgru stanice (engl. *neuron nuclei*), u ovih je, zrelih stanica, granulirano obojio i nastavke neurona. Posebno do izražaja dolazi četrnaesti dan kad njegov izražaj gotovo podsjeća na druge citoplazmat-ske biljege. Drugi je biljeg Doublecortin koji je obojio sve stanice, zrele i manje zrele. Za Doublecortin se također zna da boji samo mlade, novonastale, uglavnom bipolarne neurone. U ovim uvjetima uzgoja, Doublecortin je pozitivan u potpuno zrelih stanicama i potpuno kolokali-zira s Thy1 i drugim biljezima neurona.

## ZAHVALA

Zahvaljujemo doc. dr. sc. Dinku Mitrečiću, voditelju Laboratorija za matične stanice u kojemu je provedeno istraživanje za potrebe diplomskog rada. Istraživanje je povedeno u sklopu projekta „Mladi mozak“ financiranom od Europske unije.

## LITERATURA

- ALIĆ, I. (2015): Morfološka analiza nastanka i diferencijacije neurona u staničnoj kulturi, tijekom razvoja zametka i nakon transplantacije u mozak miša korištenjem matičnih stanica dobivenih iz mišjeg soja THY1 YFP-16. Disertacija. Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska.
- ALIĆ, I., N. KOSI, K. KAPURALIN, D. GORUP, S. GAJOVIĆ, R. POCHET, D. MITREČIĆ (2016): Neural stem cells from mouse strain Thy1 YFP are a valuable tool to monitor and evaluate neuronal differentiation and morphology. *Neuroscience letters* 634, 32–41.
- BANNERMAN, P. G., A. HAHN, S. RAMIREZ, M. MORLEY, C. BÖNNEMANN, S. YU, G.-X. ZHANG, A. ROSTAMI, D. PLEASURE (2005): Motor neuron pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis: studies in THY1-YFP transgenic mice. *Brain* 128, 1877–1886.
- CARTER, L. M., M. L. STARKEY, S. F. AKRIMI, M. DAVIES, S. B. MCMAHON. E. J. BRADBURY (2008). The Yellow Fluorescent Protein (YFP-H) mouse reveals neuroprotection as a novel mechanism underlying chondroitinase ABC-mediated repair after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 28,14107–14120.
- FENG, G., R. H. MELLOR, M. BERNSTEIN, C. KELLER-PECK, Q. T. NGUYEN, M. WALLACE, J. M. NERBONNE, J. W. LICHTMAN, J. R. SANES (2000): Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28, 41–51.
- GAGE, F. H. (2000): Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433–1438.
- JOSVAY, K., Z. WINTER, R. KATONA, L. PECZEL, A. MARTON, A. BUHALA, G. SZAKONYI, Z. OLAH, C. VIZLER (2014): Besides neuro-imaging, the Thy1-YFP mouse could serve for visualizing experimental tumours, inflammation and wound-healing. *Scientific Reports*, DOI: 10.1038/srep06776.
- HYTTTEL, P., F. SINOWATZ, M. VEJLSTED (2010): *Essentials of domestic animal embryology*. Saunders Elsevier. Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto. str. 23–56.
- KELLER-PECK, C., M. K. WALSH, W. B. GAN, G. FENG, J. R. SANES, J. W. LICHTMAN (2001): Asynchronous synapse elimination in neonatal motor units: Studies using GFP transgenic mice. *Neuron* 31, 381–394.
- KONIG, N., C. TROLLE, K. KAPURALIN, I. ADAMEYKO, D. MITREČIĆ, H. ALDSKOGIUS, P. J. SHORLAND, E. N. KOZLOVA (2014): Murine neural crest stem cells and embryonic stem cell-derived neuron precursors survive and differentiate after transplantation in a model of dorsal root avulsion. *J Tissue Eng Regen Med*. doi: 10.1002/term.1893.
- MITREČIĆ, D., S. GAJOVIĆ, R. POCHET (2009): Toward the treatments with neural stem cells: experiences from amyotrophic lateral sclerosis. *Anat. Rec.* 292, 1962–1967.
- MITREČIĆ, D., C. NICAISE, S. GAJOVIĆ, R. POCHET (2010): Distribution, differentiation, and survival of intravenously administered neural stem cells in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Transplant.* 19, 537–548.

- MITREČIĆ, D. (2011): Current advances in intra-vascular administration of stem cells for neurological diseases: a new dose of rejuvenation injected. *Rejuvenation Res.* 5, 1–3.
- MCGEADY, T. A., P. J. QUINN, E. S. PITZPATRICK, M. T. RYAN (2014): Veterinarska embriologija. *Naklada Slap*. Zagreb. 1–30.
- PORRERO, C., P. RUBIO-GARRIDO, C. AVENDAÑO, F. CLASCÁ (2010): Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing Thy1-eYFP-H transgenic mice. *Brain Res.* 1345, 59–72.
- STOJANAC, A. (2016): Analiza izražaja gena tijekom in vitro diferencijacije neurona. *Studentski znanstveni rad*. Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska.
- VUKŠIĆ, M., D. DEL-TURCO, C. B. ORTH, G. J. BURBACH, G. FENG, C. M. SCHWARZACHER, W. STEPHAN, T. DELLER (2008): 3D-reconstruction and functional properties of GFP-positive and GFP-negative granule cells in the fascia dentata of the Thy1-GFP mouse. *Hippocampus* 18, 364–375.
- WANG, Y., J. ZHANG, S. MORI, J. NATHANS (2006): Axonal growth and guidance defects in Frizzled3 Knock-Out mice: a comparison of diffusion tensor magnetic resonance imaging, neurofilament staining, and genetically directed cell labeling. *J. Neurosci.* 26, 355–364.
- WATSON, C., G. PAXINOS, L. PUELLES (2012): *The mouse nervous system*. Elsevir. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo. str. 16–45.

## 42<sup>ND</sup> WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS AND FECAVA 23<sup>RD</sup> EUROCONGRESS

25-28 September, 2017  
Copenhagen, Denmark

[www.wsava2017.com](http://www.wsava2017.com)



WSAVA  
CONGRESS  
2017  
15-28 September  
Copenhagen, Denmark



The Danish  
Veterinary Association  
SvHKS

