

# Diferencijacija mišjih mijelinizirajućih oligodendrocita u *in vitro* uvjetima

## Mouse Myelinating Oligodendrocyte Differentiation *In Vitro*

Rebac, R.<sup>1</sup>, S. Kužir<sup>2</sup>, I. Alić<sup>2\*</sup>



### Sažetak

Stanice živčanog sustava, neuroni i glija-stanice razvijaju se iz istih matičnih stanica uz izražaj karakterističnih biljega. Glavni cilj ovog istraživanja bio je istražiti diferencijaciju oligodendrocita te analizirati izražaj biljega karakterističnih za pojedini stadij stanica. Istraživanje je provedeno na stanicama izoliranim od novorođenih Thy1 miševa koji pod utjecajem promotora gena *Thy1* izražavaju zelenu fluorescentnu bjelančevinu u pojedinim neuronima. Izolirani progenitori oligodendrocita diferencirani su do zrelih, mijelinizirajućih oligodendrocita. Stanice su fiksirane 1., 3., 5. i 7. dan diferencijacije te je na njima učinjena imunocitokemija. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je prvog dana diferencijacije 99 % stanica olig2, sox2 i nestin-pozitivno. Već prvog dana diferencijacije 88 ± 2 % stanica je o4 i o1-pozitivno, dok je svega 10 % stanica gfap-pozitivno. Tijekom diferencijacije stanica udio stanica olig2 smanjuje se do 8 ± 2 %, dok se peti dan diferencijacije pojavljuju zreli mijelinizirajući oligodendrociti koji su pozitivni na mbp i plp. Sedmi dan diferencijacije udio stanica pozitivnih na mbp iznosi 13 ± 2 % stanica, dok udio stanica pozitivnih na plp iznosi 84 ± 3 % stanica. Zaključno, rezultati ovog istraživanja pokazuju da se stanice tijekom sedam dana uzgoja *in vitro* mogu u potpunosti diferencirati od progenitora oligodendrocita do zrelih, mijelinizirajućih oligodendrocita koji mogu obavljati mijelinizaciju.

### Abstract

Cells of the nervous system, neurons, and glia-cells originate from the same stem cell population with the expression of specific markers. The main goal of our study was to analyse the differentiation of oligodendrocytes and show the expression of cell stage-characteristic markers. The study was performed on cells isolated from newborn Thy1 mouse pups. Thy1 mice, under the promoter of the *Thy1* gene, express a green fluorescent protein in some neurons. Oligodendrocyte progenitors were differentiated into mature, myelinating oligodendrocytes. The cells were fixed on the 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup>, 5<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> days of differentiation and analysed by immunocytochemistry. Our results showed that on the 1<sup>st</sup> day of differentiation, 99 % of cells were olig2, sox2, and nestin positive. Moreover, on the 1<sup>st</sup> day of differentiation 88 ± 2 % of cells were o4 and o1 positive, while only 10 % of cells were gfap positive. During cell differentiation, the proportion of olig2 positive cells decreased to 8 ± 2 %, while on the 5<sup>th</sup> day of differentiation we observed mature, myelinating oligodendrocytes, mbp, and plp positive cells. On the 7<sup>th</sup> day of differentiation, 13 ± 2 % of cells were mbp positive, while 84 ± 3 % of cells were plp positive. In conclusion, the results of our study showed that cells could be completely differentiated, from oligodendrocyte progenitors to mature, myelinating oligodendrocytes. Mature cells showed myelination of neighbor cells.

<sup>1</sup>Robert Rebac, dr. med. vet., Moderna Switzerland GmbH, Peter Merian-Weg 10, 4052 Basel, Switzerland

<sup>2</sup>prof. dr. sc. Snježana Kužir, doc. dr. sc. Ivan Alić, Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

\*e-adresa: ialic@vef.hr

**Ključne riječi:** matične stanice, diferencijacija, glija-stanice, imunocitokemija, miš

**Key words:** stem cells, differentiation, glia cells, immunocytochemistry, mouse

## UVOD

U posljednjih dvadesetak godina, razvojem tehnologije matičnih stanica, dolazi do intenzivnog porasta istraživanja u području neuroznanosti, posebice u pronalaženju novih oblika terapije. Produljenjem životnog vijeka sve više ljudi obolijeva od različitih oblika bolesti živčanog sustava, a za većinu njih još uvijek nema odgovarajuće terapije. Budući da su prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije troškovi liječenja i najčešće doživotna skrb o pacijentima izrazito veliki, ulažu se velika sredstva za pronalaženje novih oblika liječenja. Poseban interes znanstvene zajednice pobuđuju istraživanja na matičnim stanicama, odnosno induciranim pluripotentnim stanicama koje potječu od samog pacijenta i tako smanjuju imunوسي odgovor organizma. Iako su ovakva istraživanja vrlo popularna i u velikom interesu javnosti, potrebno je provesti velik broj temeljnih istraživanja u staničnoj kulturi, potom na animalnim modelima da bi se u konačnici krenulo prema kliničkim istraživanjima i terapiji čovjeka. Upravo su zbog toga matične stanice u svim svojim oblicima velik izazov i velika nada u liječenju različitih neurodegenerativnih bolesti.

Iako su u literaturi opisane brojne podjele i sistematizacija matičnih stanica, ipak većina autora navodi da su matične stanice (engl. *stem cells*) populacija stanica od kojih se u kontroliranim uvjetima mogu diferencirati različite vrste stanica. Morfološki su matične stanice sitne, okruglaste stanice, veličine 10 – 20 µm. Zahvaljujući svojoj veličini, izražavanju brojnih proteina karakterističnih za matične stanice i neograničenoj sposobnosti dijeljenja, matične se stanice relativno jednostavno umnažaju (proliferiraju) i kasnije razvijaju (diferenciraju) prema određenim tipovima stanica. Prema većini udžbenika iz embriologije osnovna podjela dijeli matične stanice na: totipotentne stanice, pluripotentne stanice i multipotentne stanice.

Zigota je jedini primjer totipotentne stanice jer će se iz nje razviti apsolutno sve stanice budućeg organizma, uključujući i plodove ovojnice. Pluripotentne stanice su embrionalne matične stanice iz kojih će se razviti budućí embrij. To su stanice embrioblasta i, za razliku od zigote, imaju manju sposobnost diferencijacije. Multipotentne matične stanice imaju nešto

manju sposobnost diferencijacije i iz njih će se razviti određena tkiva, organi i organski sustavi, npr. živčane matične stanice, iz kojih će se razviti stanice živčanog sustava: neuroni i glija-stanice. Osim toga opisane su i unipotentne stanice čija je sposobnost diferencijacije još više ograničena te će se od njih razviti određene vrste neurona (Hyttel i sur., 2010.; McGeedy i sur., 2014.). Osim tijekom embrionalnog i fetalnog razdoblja, živčane matične stanice opisane su i u mozgu odraslog miša, ali znatno manje u mozgu čovjeka, i to u subventrikularnoj zoni i u zrnatom sloju hipokampusa (Gage, 2000.; Mitrečić i sur., 2009.; Watson i sur., 2012.).

Budući da u velikom broju neurodegenerativnih bolesti ili stanja, kao što su multipla skleroza, različite vrste demijelinacije ili reaktivna astrogliozna nakon moždanog udara, dolazi do odgovora glija-stanica, potrebno je dobro poznavanje razvojnih stadija stanica kao i izražaj pojedinih biljega tijekom njihova sazrijevanja. Iako glija-stanice kreću od iste živčane matične stanice kao i neuroni, njihov put, kao i izražaj pojedinih biljega, znatno se razlikuju. Tijekom ranog razvoja živčane matične stanice izražavaju nestin (citoplazma) i sox2 (SRV-box 2) (jezgra). Onoga trenutka kad se stanice počnu diferencirati prema glija-lozi, započinju izražavati olig2 (*oligodendrocyte transcription factor*), a2b5 (*cell surface ganglioside epitope*), pdgfra (*platelet-derived growth factor receptor α*) i ng2 (*neuron-gial antigen 2*) koji su biljezi progenitora oligodendrocita. U sljedećoj fazi razvoja prooligodendrocitne stanice izražavaju o4 (*oligodendrocyte marker 4*), olig1 (*oligodendrocyte transcription factor 1*) (jezgra), nkx2.2 (*homeobox protein nkx2.2*) i transferin, ali iz ranijeg razvojnog stadija zadržavaju izražaj ng2. U stadiju oligodendrocita izražavaju o4, o1 (*oligodendrocyte marker 1*), olig1 (citoplazma), cc1 (apc) (*adenomatous polyposis coli (apc, clone cc1)*) (Bin i sur., 2016.). Konačno, potpuno diferencirane stanice, odnosno mijelinizirajući oligodendrociti izražavaju mag (*myelin-associated glycoprotein*), mbp (*myelin basic protein*), plp (*proteolipid protein*) i mog (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*).

Veliku ulogu u temeljnim istraživanjima diferencijacije stanica imaju laboratorijske životinje, ponajprije miševi i štakori. Danas postoji

velik broj komercijalno dostupnih različitih sojeva miševa dobivenih genetskim manipulacijama. Feng i suradnici (2000.) opisali su transgenične linije miša koje pod promotorom gena *Thy1* u određenim neuronima izražavaju zelenu fluorescentnu bjelančevinu. U laboratoriju za matične stanice Hrvatskog instituta za istraživanje mozga provedeno je nekoliko istraživanja na ovom soju (Alić i sur., 2016., Stojanac, 2016., Mirić i sur., 2017.). U tim je istraživanjima fokus bio na neuronima, s obzirom na to da je fluorescencija specifična za neurone. Budući da u protokolu za diferencijaciju neruona nije moguće uzgojiti oligodendrocite, pristupili smo drugačijem protokolu (Chen i sur. 2007.) kako bismo dobili čistu populaciju oligodendrocita. Stoga je glavni cilj ovog istraživanja bio izolirati i kultivirati mišje progenitore oligodendrocita, diferencirati ih do potpuno zrelih, mijelinizirajućih oligodendrocita te provesti analizu izražaja biljega karakterističnih za pojedini razvojni stadij stanica.

## MATERIJALI I METODE

### Životinje

Za potrebe ovoga istraživanja korišteni su novorođeni (perinatalni) miševi (engl. *perinatal day 0*, P0) jednog legla transgenične linije B6.Cg-Tg(*Thy1-YFP*)16Jrs/J (YFP-16). Istraživanje je provedeno u Laboratoriju za matične stanice na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga, a odobreno je od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta (ur. broj: 04-77/2010-238) i Veterinarskog fakulteta (ur. broj: 251-61-01/139-17-1) Sveučilišta u Zagrebu.

### Izolacija progenitora oligodendrocita

Izolacija i kultivacija stanica provedene su prema Chen i suradnicima (2007.). Za izolaciju progenitora oligodendrocita korišteno je jedno leglo, odnosno šest novorođenih miševa. Novorođeni miševi pothlađeni su na ledu, dekapitirani te je materijal stavljen u Petrijevu posudicu s hladnim HBSS (Gibco) puferom. Nakon dekapitacije svih miševa promijenjen je pufer kako bi se uklonio višak krvi. Pod disekcijskim mikroskopom medijalno je prerezana koža i lubanja te je izoliran mozak. U sljedećem su koraku uklonjeni ostaci moždanih ovojnica

i krvnih žilica kako bi se izoliralo čisto živčano tkivo. Osim toga uklonjeno je moždano deblo i mali mozak te je za izolaciju stanica korišten samo korteks. Izolirani korteksi prebačeni su u čisti HBSS pufer te su sterilnim kirurškim škarićama usitnjeni na komadiće od oko 1 mm<sup>3</sup>. Na usitnjeno tkivo dodano je 13,6 mL HBSS-a u koji je dodano 0,8 mL DNA-ze I (0,2 mg/mL) i 0,6 mL tripsina (0,25 %) te je inkubirano 15 minuta u inkubatoru na 37 °C. Nakon djelovanja enzima sadržaj je prebačen u sterilnu tubu od 50 mL te je dodano 5 mL DMEM20S medija kako bi se spriječilo djelovanje enzima, a zatim je centrifugirano na 100 g (~ 800 r.p.m.) tijekom 5 minuta. Nakon završetka centrifugiranja pipetom je uklonjen tekući sadržaj, a na stanice je dodano 20 mL DMEM20S medija te je nježno titrirano kako bi se stanice odvojile od ostataka tkiva. Titracija je jako važan korak kako bismo dobili što više stanica, ali pritom treba biti oprezan da se stanice ne bi mehanički uništile. Kad je suspenzija stanica gotovo homogena, potrebno je pričekati da se istalože ostaci tkiva, a suspenziju stanica potrebno je dva puta profiltrirati kroz 70 µL najlonski filter (engl. *nylon cell strainer*) kako bi se dobile stanice bez komadića tkiva ili ovojnica. Izolirane stanice nasađene su u posude za uzgoj stanica (engl. *flasks*) koje su prethodno obložene s poli-D-lizinom te je u jednu flasku stavljeno 10 mL stanične suspenzije koja sadržava približno 10 000 000 stanica. Stanice su potom uzgajane u inkubatoru pod temperaturom od 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub>. Sljedećih 10 dana stanicama je mijenjan medij svaka dva dana, a medij sadržava DMEM, 4mM L-glutamin, 1mM natrijev piruvat 20 % FBS te Pen/Strep (Gibco).

### Priprema podloga za diferencijaciju stanica

Neposredno prije nasađivanja stanica potrebno je prirediti podloge za diferencijaciju stanica, odnosno stakla (engl. *cover slips*) promjera 12 mm. Budući da su kvalitetno pripremljene podloge jedan od glavnih čimbenika u diferencijaciji stanica, priprema mora biti besprijekorna, a za sam postupak potrebno je 4 – 5 dana. Prvi je korak stavljanje stakalaca u dušičnu kiselinu preko noći na tresilicu (engl. *shaker*). Nakon tretmana u kiselini stakla treba dobro isprati sterilnom vodom tijekom dva sata uz uzastopne izmjene vode. Kako bi se kiselina potpuno isprala, ispiranje se također radi na

tresilici. Nakon ispiranja stakla su ostavljena 24 sata u 70 %-tnom alkoholu. Sljedeći dan, nakon izlivanja alkohola, stakla su sterilizirana na temperaturi od 250 °C tijekom 12 sati. Nakon sterilizacije i hlađenja stakla su spremna za nasađivanje stanica. U laminaru je na stakla stavljeno 250 µL poli-D, L-ornitina tijekom 24 sata. Nakon oblaganja s poli-D, L-ornitinom stakla su isprana svježim medijem i spremna su za nasađivanje stanica.

### **Nasađivanje, diferencijacija i fiksacija stanica**

Deset dana nakon uzgoja u flaskama stanice su proliferirale i u potpunosti prekrile dno flaske u nekoliko slojeva, pri čemu su na dnu astrociti, dok se na površini nalaze progenitori oligodendrocita spremni za nasađivanje na podloge. Sljedeći je korak odvojiti progenitore oligodendrocita, što se radi na tresilici pri velikoj brzini od 200 r.p.m., a postupak se izvodi u dvije faze. U prvoj su fazi flaske na tresilici sat vremena kako bi se odvojile stanice mikroglije, koje se vrlo brzo odvajaju. Nakon sat vremena izmijeni se medij te se posude za uzgoj stanica ponovno stave na tresilicu preko noći. Ključan je korak u ovom postupku hermetičko zatvaranje posuda za uzgoj stanica, čime se sprječava dotok kisika, jer se tako progenitori oligodendrocita lakše odvajaju od podloge. Nakon toga pokupi se suspenzija stanica, a u posude za uzgoj stanica doda se 10 mL svježeg medija te se postupak može ponoviti još jednom nakon deset dana. Suspenzija prikupljenih stanica stavi se

u netretiranu Petrijevu posudu tijekom 30 – 60 minuta u inkubator, kako bi se uklonili astrociti i mikroglije, koji će se vrlo brzo prihvatiti za podlogu, dok će progenitori oligodendrocita ostati u suspenziji. Dobivene stanice potrebno je još jednom profiltrirati kroz filter s veličinom pora od 20 µm. Filtriranu suspenziju stanica potom centrifugiramo 10 minuta na 100 g. Nakon centrifuge ukloni se tekućina, a istaložene se stanice resuspenziraju u maloj količini medija (~ 0,5 mL), izbroje se i nasade na stakla u gustoći od  $1 \times 10^4$  po četvornom centimetru. Stanice se potom diferenciraju u inkubatoru pod temperaturom od 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub>. Medij za diferencijaciju mijenja se svaka dva dana, a sadržava 20 ng/mL PDGF-AA i 20 ng/mL bFGF. Stanice su fiksirane u vremenskim točkama 1., 3., 5. i 7. dan diferencijacije s 4 %-tnim paraformaldehidom (PFA) tijekom 15 minuta te su isprane PBS (engl. *phosphate buffer saline*) puferom i ostavljene na +4 °C do bojenja.

### **Imunocitokemija**

Nakon fiksacije u određenim vremenskim točkama stanice pohranjene na +4 °C isprane su tri puta po pet minuta PBS-om, nakon čega je na njih nasloženo 500 µL otopine za permeabilizaciju stanične membrane i blokiranje nespecifičnog vezanja sekundarnog protutijela (0,2 % triton X-100 (Sigma, T8787-100ML) u PBS-u + 3 % kozjeg seruma). Prema uobičajenom protokolu (Alić i sur., 2016.), blokiranje nespecifičnog vezanja sekundarnog protutijela traje 60 minuta. Nakon blokiranja na stanice je dodano 85

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

Protutijelo	Podrijetlo	Razrjeđenje	Proizvođač
<i>gfap</i>	štakor	1:1000	ThermoFisher Scientific (13-0300)
<i>mbp</i>	štakor	1:200	Abcam (ab7349)
<i>nestin</i>	miš	1:200	Abcam (ab22035)
<i>o1</i>	miš	1:200	eBioscience (14-6506-80)
<i>o4</i>	miš	1:200	Sigma (O7139)
<i>olig2</i>	miš	1:200	Millipore (MABN50)
<i>plp</i>	miš	1:200	Merck (MAB388)
<i>sox2</i>	kunić	1:200	Abcam (ab97959)

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

Protutijelo	Razrjeđenje	Proizvođač
Alexa Fluor 568 koza anti - štakor IgG (H+L)	1:1000	ThermoFisher (A11077)
Alexa Fluor 633 koza anti - miš IgM	1:500	ThermoFisher (A21046)
Alexa Fluor 568 koza anti - miš IgM	1:1000	ThermoFisher (A21043)
Alexa Fluor 488 magarac anti - kunič IgG (H+L)	1:1000	ThermoFisher (A21206)
Alexa Fluor 488 magarac anti - miš IgG (H+L)	1:1000	ThermoFisher (A21202)

$\mu$ L otopine primarnog protutijela (0,2 % triton X-100 u PBS-u + 1 % kozjeg seruma + primarno protutijelo) i stanice su pohranjene na inkubaciju preko noći u hladnjaku na +4 °C. Primarna protutijela korištena u ovom istraživanju prikazana su u tablici 1.

Sljedeći dan, nakon inkubacije primarnih protutijela, stanice su ponovno isprane tri puta po pet minuta PBS-om, te je nakon ispiranja na stanice naslojena 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. Sekundarna protutijela inkubirana su u zamračenoj prostoriji na sobnoj temperaturi tijekom dva sata. Nakon završetka inkubacije stanice su ponovno isprane tri puta po pet minuta PBS-om te je na njih naslojena fluorescentna boja (DAPI) koja boji DNA odnosno jezgru svih stanica u koncentraciji 1 : 8000. Nakon deset minuta inkubacije na sobnoj temperaturi stanice su ponovno isprane PBS-om te su poklopljene medijem za fluorescentno poklapanje (Dako Fluorescent Mounting Medium, S3023). Poklopljeni preparati pohranjeni su u hladnjaku na +4 °C do analize na konfokalnom mikroskopu (Zeiss).

### Prebrojavanje stanica

Stanice su prebrojene na deset reprezentativnih vidnih polja, po vremenskoj točki, izabranih korištenjem konfokalnog mikroskopa (Zeiss). Reprezentativna polja izabrana su nasumično s obzirom na to da su stanice prilikom nasadivanja ravnomjerno nasadene. Prebroja-

vanje je provedeno tako da se odredi broj i razvojni stadij glija-stanica u pojedinoj vremenskoj točki. Stanice su prebrojene na temelju izražaja sljedećih biljega: progenitora oligodendrocita (olig2), prooligodendrocita (o4), oligodendrocita (o1), mijelinizirajućih oligodendrocita (mbp i plp) te astrocita (gfap). Tri uzastopna prebrojavanja stanica napravila su dva potpuno neovisna istraživača, a rezultati prebrojavanja poklapali su se u 100 % slučajeva. Nakon prebrojavanja izračunata je prosječna vrijednost broja stanica, standardna devijacija te standardna pogreška, a za određivanje statističke značajnosti korištena je jednosmjerna ANOVA. Statistička značajnost prikazana je pomoću (\*) te se razlikuje ako je: P < 0,05 (\*), P < 0,01 (\*\*), P < 0,001 (\*\*\*), P < 0,0001 (\*\*\*\*).

## REZULTATI

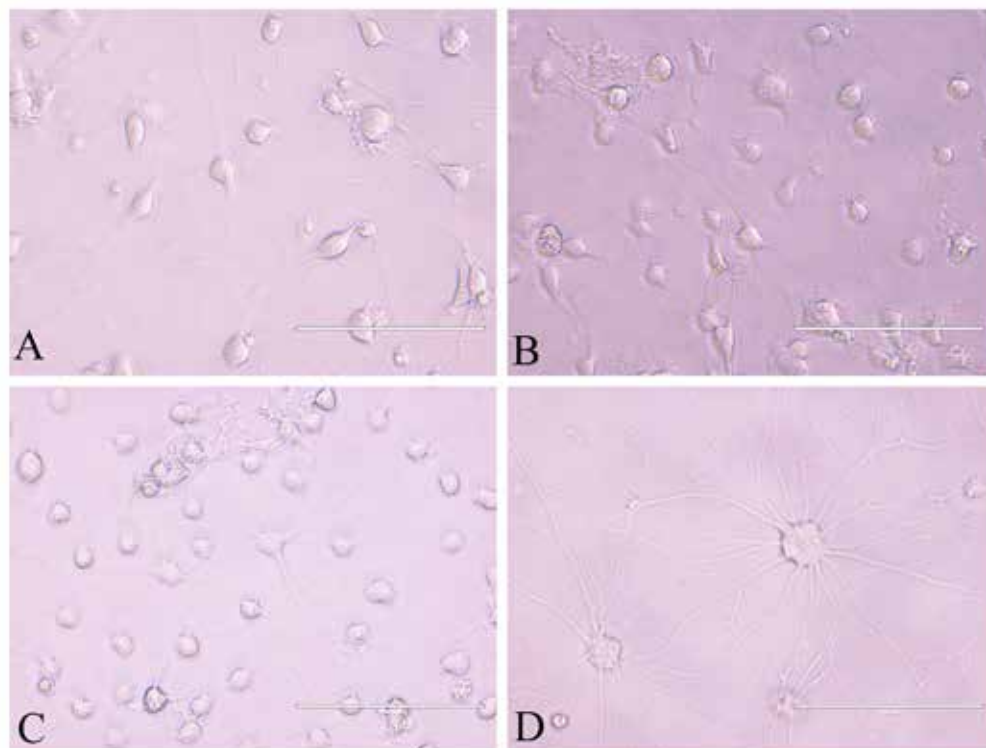
### Diferencijacija glija-stanica

Tijekom sedam dana uzgoja *in vitro*, stanice, progenitori oligodendrocita, u potpunosti su se diferencirale od stanica koje izražavaju biljege matičnih stanica i progenitora oligodendrocita sve do potpuno zrelih, mijelinizirajućih oligodendrocita. Diferencijacija glija-stanica 1., 3., 5. i 7. dan *in vitro* (DIV) prikazana je na slici 1.

Prvog dana diferencijacije, odnosno dvadeset i četiri sata nakon nasadivanja na prethodno priređene podloge, stanice su započele s diferencijacijom. Stanice su nasadene u stadiju progenitornih stanica koje su okruglasta oblika i neposredno nakon nasadivanja pružile su jedan ili više nastavaka (slika 1.A) te izražavaju speci-

**Slika 1.** Diferencijacija glija-stanica 1. (A), 3. (B), 5. (C) i 7. (D) dana *in vitro*.

Tijekom sedam dana diferencijacije stanice su praćene i fotografirane svjetlosnim mikroskopom (Evos, ThermoFisher).  
Skala = 100  $\mu$ m

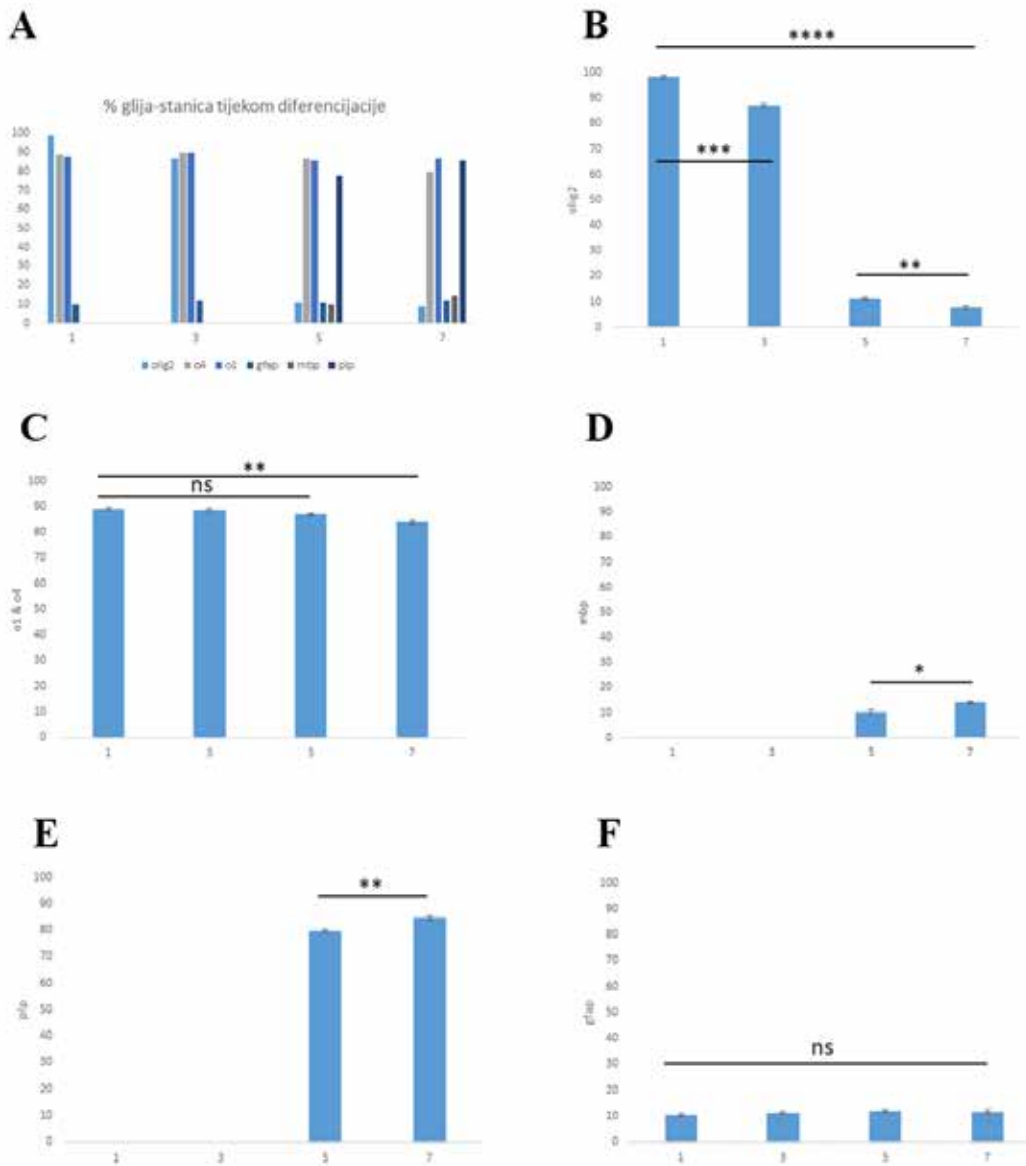


fične biljege glija-stanica. Gotovo 99 % stanica je olig2-pozitivno, za kojeg je poznato da je biljeg progenitora oligodendrocita (slike 2.A i 2.B, 3.B i 3.F). U tri uzastopna brojenja po deset vidnih polja vidi se da je  $97 \pm 3$  % stanica olig2-pozitivno. Osim toga stanice još uvijek izražavaju biljege matičnih stanica kao što su *sox2* (slika 3.A) i *nestin*. U istom razvojnem stadiju  $88 \pm 2$  % stanica izražava biljege prooligodendrocita (o4) i oligodendrocita (o1) (slike 2.A i 2.C). Te su stanice i olig2-pozitivne, dok je svega 10 % stanica *gfap*-pozitivno (slike 2.A i 2.F). Iako stanice tijekom prvog dana izražavaju biljege nekoliko razvojnih stadija oligodendrocita, na temelju analize intenziteta imunocitokemije i same morfologije stanica jasno je vidljivo da je više od 90 % stanica izrazito olig2-pozitivno, a vrlo blijedo, iako u velikom postotku, zadržavaju pozitivnost na biljege matičnih stanica, kao i znatno razvijenijih stadija prooligodendrocita i oligodendrocita.

Trećeg dana diferencijacije stanice su znatno više diferencirane nego u prvoj vremenskoj točki. Pružile su brojne razgranate nastavke i poprimaju morfologiju oligodendrocita (slika 1.B). Tijekom trećeg dana diferencijacije  $86 \pm 3$

% stanica je olig2-pozitivno (slika 2.A i 2.B, slika 4.B). Stanice više ne izražavaju biljege matičnih stanica, dok je razina izražaja biljega o4 i o1 ista kao i prvog dana diferencijacije i iznosi  $88 \pm 2$  % (slike 2.A i 2.C, 4.F i 4.J). Što se tiče biljega astrocita, stanje je slično kao i prvog dana diferencijacije i iznosi  $10 \pm 2$  % pozitivnih stanica (slike 2.A i 2.F, 4.A, 4.E i 4.I). Astrociti, odnosno *gfap*-pozitivne stanice izražavaju u svojim jezgrama i olig2, ali isto tako kolokaliziraju s biljuzima o4 i o1. Potpuna kolokalizacija *gfap*-a i o1 vidljiva je na slici 4.L koja se očituje pojavom žute boje na stopljenoj slici. U ovom stadiju diferencijacije, kako je i očekivano, još uvijek nema ni jedne *mbp* ili *plp*-pozitivne stanice (slike 2.A, 2.D i 2.E).

Peti dan diferencijacije stanice morfološki izgledaju kao potpuno diferencirani oligodendrociti (slika 1.C). Budući da su stanice gotovo potpuno diferencirane, udio izražaja pojedinih biljega znatno se promijenio u odnosu na prethodne dvije vremenske točke. Udio olig2-pozitivnih stanica smanjio se za 70 % u odnosu na prvu vremensku točku i iznosi svega  $11 \pm 2$  % stanica (slike 2.A i 2.B). Zanimljivo da udio prooligodendrocita i oligodendrocita ostaje gotovo



**Slika 2.** Analiza diferencijacije glija-stanica 1., 3., 5. i 7. dana *in vitro*. Postotak glija-stanica tijekom diferencijacije (A). Izražaj olig2-pozitivnih stanica tijekom diferencijacije stanica (B); statistički značajna razlika prikazana je između svih vremenskih točaka pri čemu je  $P < 0,001$  (\*\*\*) između 1. i 3. dana, između 1. i 5. (7.) dana  $P < 0,0001$  (\*\*\*\*), dok je između 5. i 7. dana  $P < 0,01$  (\*\*). Izražaj o1 i o4-pozitivnih stanica tijekom diferencijacije stanica (C); tijekom prvih pet dana diferencijacije nema statistički signifikantne razlike između pojedinih točaka, dok je razlika vidljiva između 1. i 7. dana  $P < 0,01$ . Izražaj mbp-pozitivnih stanica tijekom diferencijacije stanica (D); prikazana je statistički signifikantna razlika između 5. i 7. dana diferencijacije  $P < 0,05$  (\*). Izražaj plp-pozitivnih stanica tijekom diferencijacije stanica (E); prikazana je statistički signifikantna razlika između 5. i 7. dana diferencijacije  $P < 0,01$ . Izražaj gfp-pozitivnih stanica tijekom diferencijacije stanica (F) konstantan je i ne pokazuje statistički signifikantnu razliku između pojedinih vremenskih točaka diferencijacije.

na istoj razini tijekom cijelog razdoblja diferencijacije i u ovoj vremenskoj točki iznosi  $86 \pm 2\%$  (slike 2.A i 2.C, 5.B i 5.F). Vrlo se slično ponašaju i gfp-pozitivne stanice i u ovoj vremenskoj točki je svega  $11 \pm 2\%$  stanica gfp-pozitivno. Budući da stanice morfološki izgledaju kao potpuno zreli oligodendrociti, započele su izražavati biljege zrelih, odnosno mijelinizirajućih oligodendrocita. Tako udio mbp-pozitivnih stanica iznosi  $10 \pm 2\%$ , dok je udio plp-pozitivnih stanica znatno veći i iznosi  $79 \pm 2\%$  (slike 2.A, 2.D i 2.E, slika 5.L). Sve mbp i plp-pozitivne stanice u potpunosti kolokaliziraju s o4 i o1-pozitivnim

stanicama (slike 5.D i 5.H). No kako je vidljivo i na grafičkom prikazu (slike 2.D i 2.E), svega  $12\%$  mijelinizirajućih oligodendrocita izražava mbp i plp, odnosno kolokalizira.

Sedmi dan diferencijacije stanice su dosegnule maksimalan razvoj u diferencijaciji glija-stanica (slika 1.D). Udio olig2-pozitivnih stanica znatno se smanjio i iznosi svega  $8 \pm 2\%$  stanica (slike 2.A i 2.B). Udio o4 i o1-pozitivnih stanica neznatno se smanjio, ali i dalje iznosi  $82 \pm 3\%$  stanica (slike 2.A i 2.C), za razliku od gfp-pozitivnih stanica čiji je udio malo porastao i iznosi  $11 \pm 3\%$  stanica (slike 2.A i 2.F).

**Tablica 3.** Postotak glija-stanica 1., 3., 5. i 7. dana *in vitro* (DIV) tijekom diferencijacije.

	olig2	o4	o1	gfap	mbp	plp
<i>DIV</i>						
1	97 ± 3 %	88 ± 2 %	88 ± 2 %	10 %		
3	86 ± 3 %	88 ± 2 %	88 ± 2 %	10 ± 2 %		
5	11 ± 2 %	86 ± 2 %	86 ± 2 %	11 ± 2 %	10 ± 2 %	79 ± 2 %
7	8 ± 2 %	82 ± 3 %	82 ± 3 %	11 ± 3 %	13 ± 2 %	84 ± 3 %

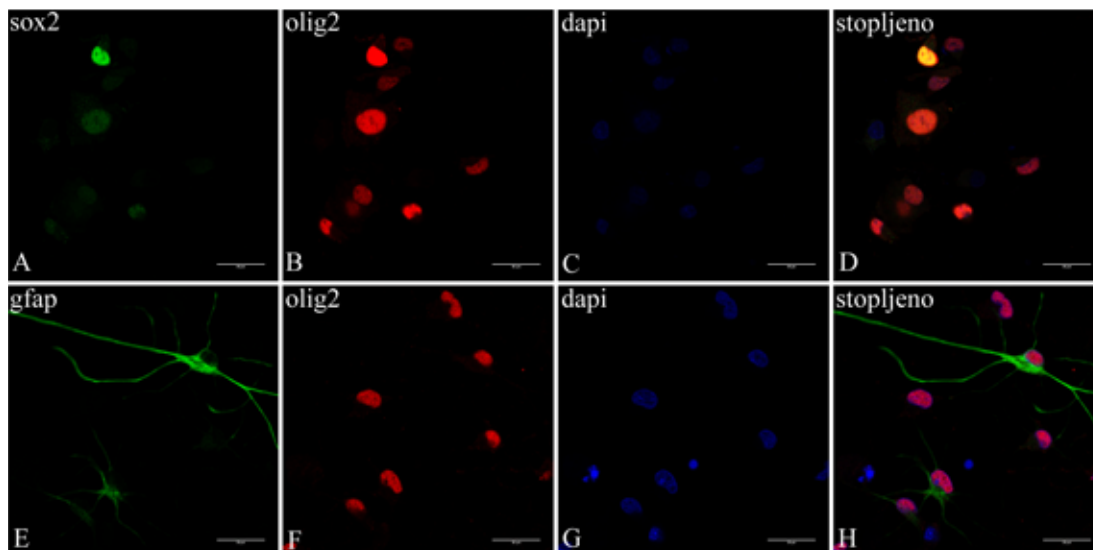
Gledajući sveukupno, iako je zabilježen mali pad, odnosno blagi porast u izražaju ovih triju biljega tijekom razdoblja diferencijacije, izražaj ovih biljega je konstantan (slike 2.A, 2.C i 2.D). Postotak mbp pozitivnih stanica porastao je na  $13 \pm 2 \%$ , dok je postotak plp-pozitivnih stanica porastao na  $84 \pm 3 \%$  (slike 2.A, 2.D i 2.E). Na slici 6, osim prije opisane kolokalizacije između mbp-a i biljega o4, o1 te plp, u kombinaciji mbp + o4 (slika 6.D), jasno se vidi gdje mbp-pozitivna stanica mijelinizira, odnosno omotava se oko o4 pozitivne stanice. Radi bolje preglednosti postotak diferencijacije stanica u svim vremenskim točkama prikazan je i u tablici 3.

Osim diferencijacije stanica, izražaja specifičnih biljega koji se pojavljuju tijekom razvoja stanica vidljiva je i razlika u intenzitetu svakog pojedinog biljega. Od biljega korištenih u ovom istraživanju jedino su sox2 i olig2 nuklearni bi-

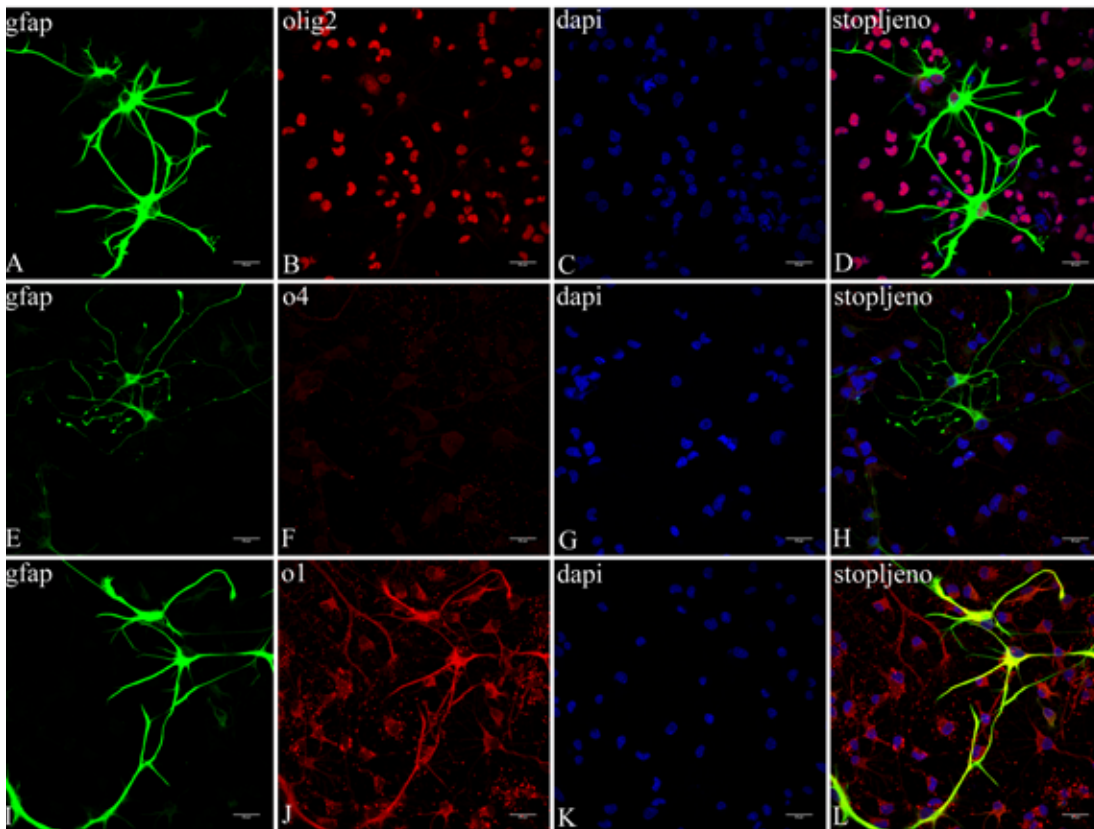
ljezi, dok su ostali biljezi citoplazmatski. Tijekom prvog dana razvoja jasno je vidljiv vrlo slab izražaj nestina, gotovo na granici detektibilnosti. Nasuprot tome, biljezi prooligodendrocita (o4) i oligodendrocita (o1) pojavljuju se od prvog dana diferencijacije i zadržavaju se do kraja u gotovo jednakom intenzitetu. Zanimljivo je da oba biljega, osim ujednačene citoplazmatske pozitivnosti, imaju i snažnu, također citoplazmatsku, vezikularnu pozitivnost koja se povećava tijekom diferencijacije, posebno u o1-pozitivnih stanica (slike 4 – 6).

U ovom istraživanju, osim po vremenskim točkama, provedena je i analiza izražaja svakog pojedinog biljega tijekom sedam dana diferencijacije stanica. Prema tome tijekom diferencijacije olig2-pozitivnih stanica vidljiva je statistički značajna razlika između svih vremenskih točaka, pri čemu je  $P < 0,001$  (\*\*\*) između 1. i

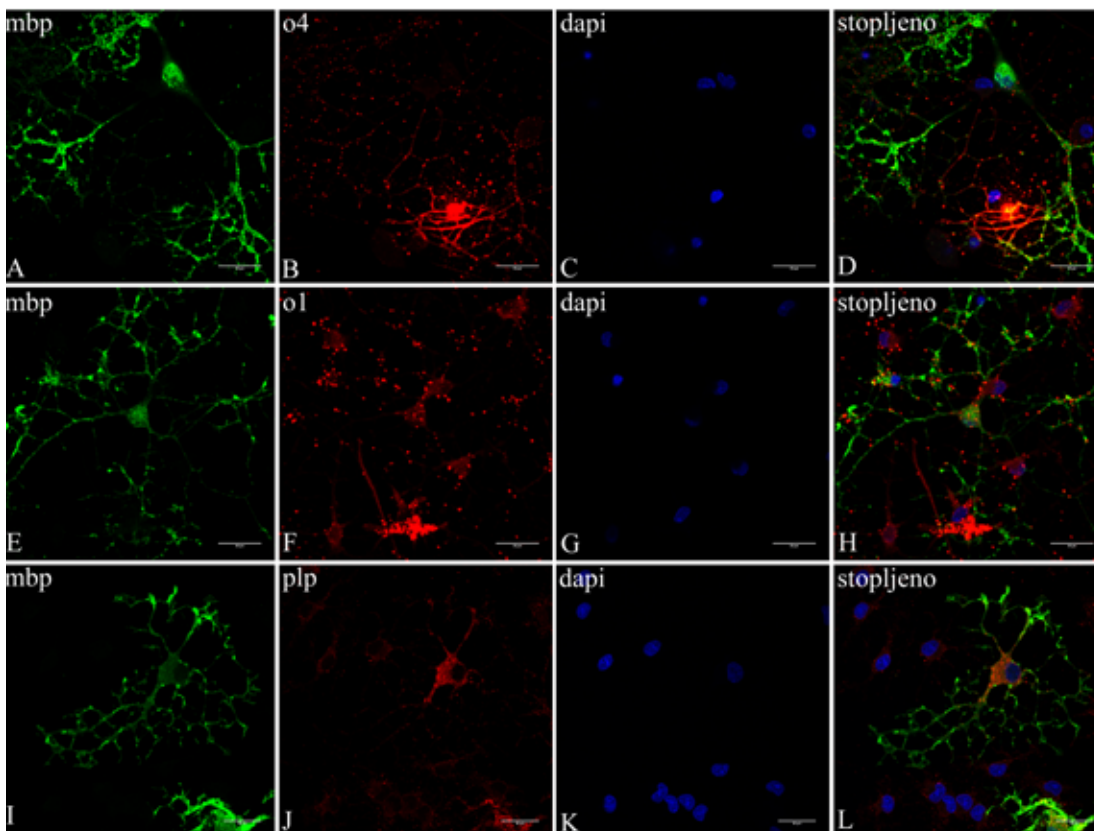
**Slika 3.** Imunocitokemija glija-stanica 1. dana diferencijacije *in vitro*. Tijekom prvog dana diferencijacije 99 % stanica je olig2-pozitivno (B i F), dok neke od njih izražavaju i sox2 (A) te kolokaliziraju različitim intenzitetom (žuto). Svega je 10 % stanica je gfap-pozitivno (E), a sve gfap-pozitivne stanice izražavaju i olig2 (H, stopljena slika). Na slikama (C i G) plavo su obojene jezgre svih stanica (DAPI). Skala = 20  $\mu$ m





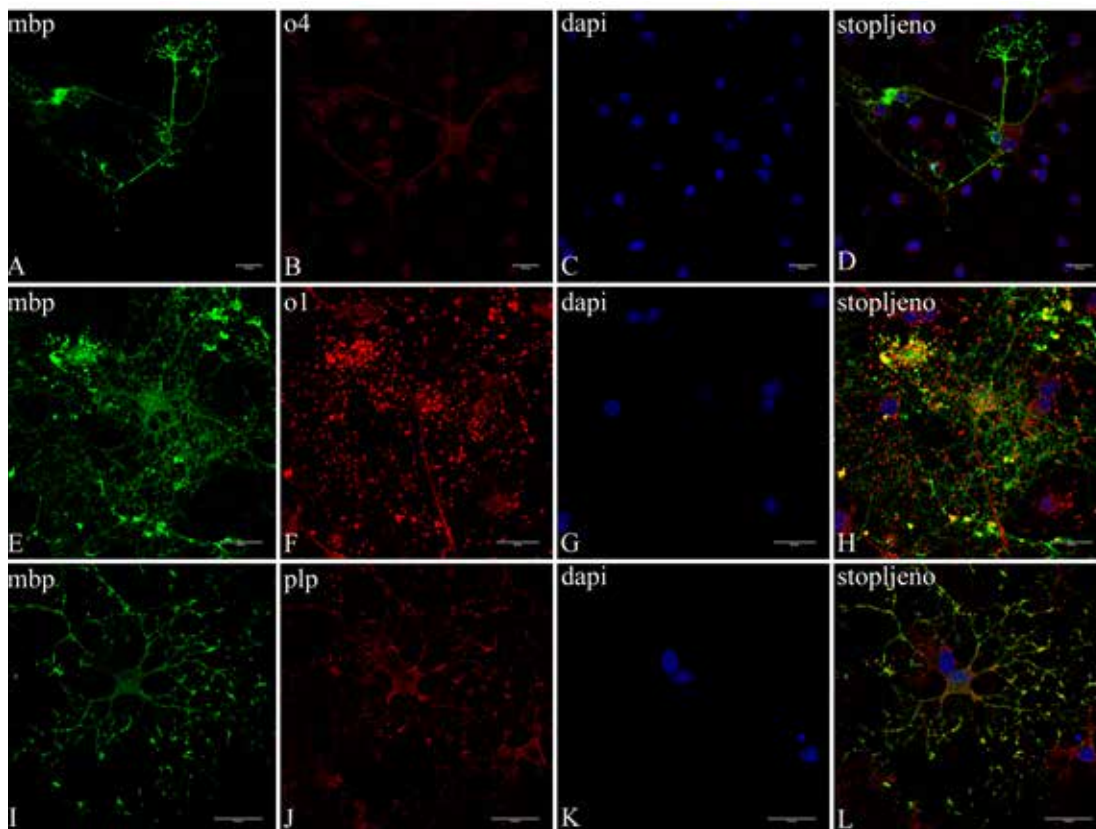


**Slika 4.** Imunocitokemija glija-stanica 3. dana diferencijacije in vitro. Tijekom trećeg dana diferencijacije  $86 \pm 3\%$  stanica je olig2-pozitivno (B),  $88 \pm 2\%$  stanica je o4 (F) i o1 (J) pozitivno, dok je  $10 \pm 2\%$  stanica gfap-pozitivno (A, E i I). Na slici L vidi se potpuna kolokalizacija (žuto) između gfap i o1-pozitivnih stanica. Na slikama (C, G i K) plavo su obojene jezgre svih stanica (DAPI). Skala =  $20 \mu\text{m}$



**Slika 5.** Imunocitokemija glija-stanica 5. dana diferencijacije in vitro. Tijekom petog dana diferencijacije  $86 \pm 2\%$  stanica je o4 (B) i o1 (F) pozitivno, svega  $10 \pm 2\%$  stanica je mbp (A, E i I) pozitivno, dok je  $79 \pm 2\%$  stanica plp (J) pozitivno. Sve mbp-pozitivne stanice kolokaliziraju s o4 (D), o1 (H) i plp (L). Svega  $12\%$  mijelinizirajućih stanica pozitivno je na oba biljega mijelinizirajućih oligodendrocita (mbp i plp, H). Na slikama (C, G i K) plavo su obojene jezgre svih stanica (DAPI). Skala =  $20 \mu\text{m}$

**Slika 6.** Imunocitokemija glija-stanica 7. dana diferencijacije *in vitro*. Tijekom sedmog dana diferencijacije  $82 \pm 3$  % stanica je o4 (B) i o1 (F) pozitivno, svega  $13 \pm 2$  % stanica je mbp (A, E i I) pozitivno, dok je  $84 \pm 3$  % stanica plp (J) pozitivno. Na stopljenoj slici (D) vidi se kako sitnija, mbp (zelena) pozitivna stanica mijelinizira veću, o4 (crvenu) pozitivnu stanicu. Na slikama (C, G i K) plavo su obojene jezgre svih stanica (DAPI). Skala = 20  $\mu$ m



3. dana, između 1. i 5. (7.) dana je  $P < 0,0001$  (\*\*\*\*), dok je između 5. i 7. dana  $P < 0,01$  (\*\*) (slika 2.B). Nasuprot tome, tijekom diferencijacije o1 i o4-pozitivnih stanica tijekom prvih pet dana nema statistički signifikantne razlike između pojedinih točaka, dok je razlika vidljiva jedino između 1. i 7. dana,  $P < 0,01$  (\*\*) (slika 2.C). Iako se mbp i plp-pozitivne stanice pojavljuju tek peti dan diferencijacije, između ovih dviju vremenskih točaka vidljiva je statistički signifikantna razlika, pri čemu je za mbp-pozitivne stanice  $P < 0,05$  (\*) (slika 2.D), dok je za plp-pozitivne stanice  $P < 0,01$  (slika 2.E). Jedini biljeg koji je konstantan i kod kojega nema statistički signifikantne razlike između pojedinih vremenskih točaka jest gfap (slika 2.F).

## RASPRAVA

Tijekom ovog istraživanja, po prvi puta u Laboratoriju za matične stanice napravljena je izolacija progenitora oligodendrocita i njihova diferencijacija do zrelih, mijelinizirajućih oligodendrocita. Sami postupak izolacije i diferencijacije stanica napravljen je prema Chen i suradnicima (2007.). Prema navedenom protokolu progenitore oligodendrocita moguće je izolirati iz novorođenih štakora ili miševa, ali isto tako i iz embrija miša. Ako se izolacija radi iz embrija miša, onda je postupak izolacije stanica, ali i uzgoj do neurosfera, gotovo identičan onome opisanom u izolaciji živčanih matičnih stanica za uzgoj neurona (Kosi i sur., 2015.; Alić i sur., 2016.; Kosi i sur., 2018.). U ovom istraživanju izolacija progenitora oligodendrocita napravljena je iz novorođenih miševa. Tijekom analize rezultata zabilježeno je nekoliko vrlo bitnih činjenica po čemu se ovo istraživanje razlikuje od originalnog protokola (Chen i sur., 2007.). Prema originalnom protokolu stanice nakon tjedan dana diferencijacije *in vitro* izražavaju a2b5 i o4, ali ne o1 i mbp. Iz ovoga se jasno vidi da stanice u originalnom istraživanju izražavaju biljege progenitora oligodendrocita (a2b5) i pro-oligodendrocita (o4), ali ne i oligodendrocita (o1) ili mijelinizirajućih oligodendrocita (mbp). U ovom istraživanju kao biljeg progenitora oligodendrocita korišten je olig2 čiji se izražaj podudara s

izražajem a2b5 (Zhang, 2001.). Rezultati ovoga istraživanja pokazuju da je prvog dana diferencijacije preko 90 % stanica olig2 pozitivno, a sazrijevanjem stanica razina olig2 se znatno smanjuje, da bi sedmog dana diferencijacije iznosila svega 8 %. Druga vrlo bitna razlika u odnosu na originalni protokol jest izražaj o4 i o1. Kako je vidljivo u rezultatima, stanice su pozitivne na oba biljega tijekom čitavog razdoblja diferencijacije i to u vrlo visokom postotku od gotovo 90 %. Zanimljivo je da prema Chen i suradnicima (2007.) stanice čak niti nakon sedam dana uzgoja nisu o1 pozitivne, odnosno nisu dosegnule stadij oligodendrocita. S druge strane Zhang (2001.) navodi da se izražaj o4 dobrim dijelom preklapa s izražajem biljega progenitora oligodendrocita, kao što su olig2 i a2b5, ali isto tako i u istoj mjeri izražaj o4 se preklapa s izražajem o1, odnosno zrelim oligodendrocitima. Rezultati ovog istraživanja u potpunosti se podudaraju s istraživanjem Zhang-a (2001.) jer oba biljega, o4 i o1, pozitivni su vrlo rano i kolokaliziraju s olig2 tijekom prva tri dana diferencijacije. Isto tako sva tri biljega kolokaliziraju s gfapom koji je tipični biljeg astrocita, iako je ovim načinom uzgoja u kulturi prisutno svega 10 % astrocita. Mali postotak astrocita, kao niti jedna stanica mikroglije, očekivan je nalaz jer je priprema i način izolacije usmjeren isključivo prema progenitorima oligodendrocita. Konačno, treća velika razlika jesu mijelinizirajuće stanice. Iako su stanice diferencirane prema protokolu, rezultati ovog istraživanja pokazuju da se mijelinizirajuće stanice pojavljuju u kulturi već petog dana diferencijacije i to u značajnom postotku. Prema stadiju sazrijevanja, mbp i plp pozitivne stanice se pojavljuju u isto vrijeme što je slučaj i u ovom istraživanju, ali zanimljivo je da je znatno manji udio mbp pozitivnih stanica, koji iznosi nešto više od 10 % ukupnog broja stanica, u odnosu na udio plp pozitivnih stanica koji je gotovo 80 %. Na temelju ovoga proizlazi zaključak da petog dana diferencijacije, od ukupnog broja mijelinizirajućih stanica, svega 12 % stanica izražava oba mijelinizirajuća biljega. Sedmog dana taj omjer se povećava u korist mbp pozitivnih stanica. Na temelju svega je vidljivo da su i u završnoj fazi diferencijacije stanice u potpunosti pratile diferencijacijski put opisan u Zhang (2001.).

Progenitori oligodendrocita izolirani su iz novorođenih Thy1 miševa. Ovaj transgenični soj

miša napravila je grupa autora Feng i suradnici (2000.). Soj je karakterističan po tome što pod utjecajem promotora *Thy1* gena u određenim stanicama izražava zelenu fluorescentnu bjelančevinu. Izražaj bjelančevine je karakterističan za neurone i nikada se ne pojavljuje u niti jednoj drugoj vrsti stanica. Na ovom soju napravljena su brojna morfološka istraživanja *in vitro* (Feng i sur., 2000.; Corti i sur., 2006.; Alić i sur., 2016.), ali i istraživanje izražaja gena tijekom *in vitro* diferencijacije (Stojanac, 2016.). Iako je u navedenim istraživanjima način uzgoja stanica bio usmjeren prema neuronima, svega 3-5 % stanica jesu glija-stanice koje nikada nisu izražavale zelenu fluorescentnu bjelančevinu. U istraživanju Mirić i suradnika (2017.) od istog soja napravljena je primarna kultura neurona, čija je izolacija i početni način uzgoja sličan uzgoju oligodendrocita, ali ni u ovom istraživanju nisu zabilježeni oligodendrociti, a prisutni astrociti također nisu bili Thy1 pozitivni. Rezultati ovoga istraživanja, napravljeni na isključivo glija-stanicama, potvrđuju da je izražaj zelene fluorescentne bjelančevine u Thy1 miševima specifičan isključivo za neuronsku lozu jer niti jedna stanica u ovom istraživanju nije bila Thy1 pozitivna. Na temelju svega navedenog, a uspoređujući rezultate ovog istraživanja sa sličnim istraživanjima, jasno je vidljivo da je moguće u *in vitro* uvjetima uzgojiti potpuno zrele i funkcionalno aktivne neurone, astrocite i oligodendrocite podrijetlom od Thy1 miševa, ali u odvojenim pokusima. Prednosti ovakvih pokusa su da možemo ciljano diferencirati različite tipove stanica, no međutim veliki nedostatak jest da još uvijek nismo uspjeli uzgojiti neurone i oligodendrocite u ko-kulturi. No kako to u znanosti obično biva, upravo je ovo veliki izazov na kojem trenutno radimo kako bismo što vjerodostojnije mogli usporediti *in vitro* uvjete s onima u mozgu miša.

Laboratorijske životinje, u prvom redu miševi, zbog relativno jeftinog načina uzgoja, ali i brzog reproduktivnog ciklusa, smatraju se idealnim pokusnim životinjama za proučavanje različitih fizioloških i patoloških stanja u ljudi. Međutim tijekom fiziološkog, embrionalnog, fetalnog i postnatalnog razvoja glija-stanica postoji velika razlika u pojavi i sazrijevanju istih u ove dvije vrste. Naime u miša tijekom embrionalnog razvoja ne dolazi do razvoja glija-stanica,

odnosno nema njihovih progenitora, bilo da se radi o progenitorima oligodendrocita ili astrociti (Alić, 2015.). S druge strane u čovjeka, progenitori glija-stanica pojavljuju se rano tijekom embrionalnog razvoja, već sredinom gestacije i to u diencefalonu odakle kreću u migraciju (Jakovcević i Zecević, 2005.a; Jakovcević i sur., 2009.). Isto tako velika razlika u odnosu na miša se odnosi u izražaju biljega *olig1* *olig2*, pri čemu je opisano da u čovjeka, osim što boji progenitore oligodendrocita, boji i specifičnu subpopulaciju neurona te utječe na stanice neuronske loze (Jakovcević i Zecević, 2005.b). Drugim riječima, ovaj nalaz upućuje na blisku povezanost između neuronske i glija loze stanica, što zapravo i nije neobično budući da obje populacije kreću od iste živčane matične stanice, a kasnije se opredjeljuju i usmjeravaju prema određenoj populaciji stanica (McGeedy i sur., 2014.).

U brojnim istraživanjima patoloških stanja vrlo često se u prvi plan stavljaju neuroni i njihova patologija. Međutim glija-stanice imaju posebno važnu ulogu jer svojom potpornom funkcijom podržavaju neurone. Važnost glija-stanica vidljiva je u snažnoj obrani nakon moždanog udara gdje se glija-stanice organiziraju i migriraju na mjesto ozljede i tvore snažnu granicu između zdravog i bolesnog tkiva (Kosi i sur., 2018.). Iako su u ovakvim reakcijama najzaslužniji astrociti, prvenstveno reaktivni astrociti, osim njih javljaju se i oligodendrociti kao i stanice mikroglije i tako sprječavaju daljnje propadanje tkiva. U modelu demijelinacijske ozljede kralježnične moždine i mozga, dolazi do propadanja mijelina, što je idealan model za proučavanje multiple skleroze u čovjeka. U ovom modelu autori su opisali aktivaciju „novorođenih“ progenitora oligodendrocita korištenjem transgeničnih životinja (Fancy i sur., 2009.; Fancy i sur., 2011.). Prema navedenom istraživanju aktiviraju se *olig2* pozitivne stanice koje dolaze na mjesto ozljede te se diferenciraju prema zrelim oblicima oligodendrocita. Zaključno, rezultati ovoga istraživanja, podudaraju se s *in vivo* istraživanjima (Fancy i sur., 2009.; Fancy i sur., 2011.) i još jednom ukazuju na važnost *in vitro* rezultata i mogućnosti usporedbe s istraživanjima na *in vivo* modelima, ali isto tako pružaju nove spoznaje koje nas usmjeravaju prema kliničkim istraživanjima.

## 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. Doktorski rad. Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu. 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. *Neurosci. Lett.* 634, 32-41.
- BIN, J. M., S. N. HARRIS, T. E. KENNEDY (2016): The oligodendrocyte-specific antibody 'CC1' binds Quaking 7. *J. Neurochem.* 139, 181-186.
- CHEN, Y., V. BALASUBRAMANIAN, J. PENG, E. C. HURLOCK, M. TALLQUIST, J. LI, Q. R. LU (2007): Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells. *Nat. Protoc.* 2, 1044-1051.
- CORTI, S., F. LOCATELLI, D. PAPADIMITRIOU, C. DONADONI, S. SALANI, R. DEL BO, S. STRAZZER, N. BRESOLIN, G. P. COMI (2006): Identification of a Primitive Brain-Derived Neuronal Stem Cell Population Based on Aldehyde Dehydrogenase Activity. *Stem Cells* 24, 975-985.
- FANCY, S. P. J., S. E. BARANZINI, C. ZHAO, D. I. YUK, K. A. IRVINE, S. KAING, N. SANAI, R. J. M. FRANKLIN, D. H. ROWITCH (2009): Dysregulation of the Wnt pathway inhibits timely myelination and remyelination in the mammalian CNS. *Genes Dev.* 23, 1571-1585.
- FANCY, S. P. J., E. P. HARRINGTON, T. J. YUEN, J. C. SILBEREIS, C. ZHAO, S. E. BARANZINI, C. C. BRUCE, J. J. OTERO, E. J. HUANG, R. NUSSE, R. J. M. FRANKLIN, D. H. ROWITCH (2011): *Axin2* as regulatory and therapeutic target in newborn brain injury and remyelination. *Nat. Neurosci.* 26, 1009-1016.
- 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.

- HYTTEL, 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.
- JAKOVCEVSKI, I., N. ZECEVIC (2005a): Sequence of Oligodendrocyte Development in the Human Fetal Telencephalon. *Glia* 49, 480-491.
- JAKOVCEVSKI, I., N. ZECEVIC (2005b): Oligo Transcription Factors Are Expressed in Oligodendrocyte and Neuronal Cells in Human Fetal CNS. *J. Neurosci.* 25, 10064-10073.
- JAKOVCEVSKI, I., R. FILIPOVIC, M. ZHICHENG, S. RAKIC, N. ZECEVIC (2009): Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain. *Front. Neuroanat.* 3, 1-15.
- KOSI, N., I. ALIĆ, M. KOLAČEVIĆ, N. VRSALJKO, N. JOVANOVIĆ MILOŠEVIĆ, M. SOBOL, A. PHILIMONENKO, P. HOZAK, S. GAJOVIĆ, R. POCHE, D. MITREČIĆ (2015): Nop2 is expressed in adult mouse and human brain and is linked to proliferation and differentiation of neural stem cells during brain regeneration. *Brain Res.* 1597, 65-73
- KOSI, N., I. ALIĆ, I. SALAMON, D. MITREČIĆ (2018): Stroke promotes survival of nearby transplanted neural stem cells but does not influence their differentiation. *Neurosci. Lett.* 666, 111-119.
- MCGEADY, T. A., P. J. QUINN, E. S. PITZPATRICK, M. T. RYAN (2014): Veterinarska embriologija. Naklada Slap. Zagreb. str. 1-30.
- MIRIĆ, M., S. KUŽIR, I. ALIĆ (2017): Diferencijacija stanica u primarnoj kulturi neurona iz dva soja transgeničnih miševa. *Veterinar* 55, 10-20.
- MITREČIĆ, D., S. GAJOVIĆ, R. POCHE (2009): Toward the Treatments with Neural Stem Cells: Experiences from Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Anat. Rec.* 292, 1962-1967.
- STOJANAC, A. (2016): Analiza izražaja gena tijekom in vitro diferencijacije neurona. Studentski znanstveni rad. Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu. Zagreb, Hrvatska.
- WATSON, C., G. PAXINOS, L. PUELLES (2012): The Mouse Nervous System. Elsevier. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo. str. 16-45.
- ZHANG, S. C. (2001): Defining glial cells during CNS development. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 840-843.

U Europskoj uniji sterilizirano je **73%** mačaka,



dok ih je u Hrvatskoj sterilizirano samo **33%**