

# Utjecaj transplatacije živčanih matičnih stanica na ekspresiju gena uključenih u programiranu staničnu smrt nakon ishemijskog moždanog udara

---

Hribljan, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:739248>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-31**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Valentina Hribljan

Utjecaj transplantacije živčanih matičnih stanica na ekspresiju gena uključenih u  
programiranu staničnu smrt nakon ishemijskog moždanog udara

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za matične stanice na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom dr.sc. Dinka Mitrečića, izv. prof. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj transplantacije živčanih matičnih stanica na ekspresiju gena uključenih u programiranu staničnu smrt nakon ishemijskog moždanog udara

Valentina Hribljan

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Ishemijski moždani udar, te posljedične tkivna hipoksija i ishemija, uzrokuju značajno oštećenje moždanog tkiva. Jedan od pristupa u potrazi za pronalaskom uspješne obnove oštećenog tkiva uključuje primjenu matičnih stanica. U ovom istraživanju osnovni cilj bio je istražiti kako transplantacija živčanih matičnih stanica u mozak miša zahvaćen ishemijskim moždanim udarom utječe na ekspresiju gena uključenih u programiranu staničnu smrt. Istražili smo staničnu smrt posredovanu proteinom AIF (*Aifm1*), nekroptozu (*Ripk1*, *Ripk3*, *Mkl1*) te apoptozu (*Casp3*). Nakon što je moždani udar induciran privremenom okluzijom lijeve srednje moždane arterije, živčane matične stanice su transplantirane u striatum zahvaćene polutke (lijeve, ipsilateralne) mozga 24 h nakon moždanog udara. Miševi su žrtvovani 15 dana nakon induciranja moždanog udara te su za analizu ekspresije navedenih gena korištene obje polutke mozga. Transplantacija živčanih matičnih stanica u mozak miševa zahvaćenih moždanim udarom značajno je smanjila ekspresiju gena *Aifm1* i *Casp3* koji potiču staničnu smrt. Istovremeno, ekspresija gena uključenih u nekroptozu (*Ripk1*, *Ripk3*, *Mkl1*) značajno je povišena nakon moždanog udara, dok injiciranje medija nakon moždanog udara smanjuje njihovu ekspresiju. Nalaz da transplantacija živčanih matičnih stanica održava visoku ekspresiju gena *Ripk3* te *Mkl1* može se objasniti njihovom novootkrivenom ulogom u prometu staničnih vezikula.

32 stranice, 10 slika, 1 tablica, 45 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: ishemijski moždani udar, živčane matične stanice, programirana stanična smrt, ekspresija gena

Voditelj: dr. sc. Dinko Mitrečić, izv. prof.

Suvoditelj: dr. sc. Inga Marijanović, doc.

Ocjenitelji: dr. sc. Inga Marijanović, doc.; dr. sc. Sofia Ana Blažević, doc; dr. sc. Damjan Franjević, izv. prof.

Rad prihvaćen: 03.05.2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

Influence of neural stem cell transplantation on the expression of genes involved in the programmed cell death following ischemic brain stroke

Valentina Hribljan

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Ischemic brain stroke is followed by significant tissue damage caused by hypoxia and ischemia. One of the most utilized experimental approaches for treatment of tissue hypoxia includes application of stem cells. In this study, we have analysed the effects of neural stem cell (NSC) transplantation in the mouse brain affected by stroke, on the expression of genes involved in programmed cell death: AIF-mediated cell death (*Aifm1*), necroptosis (*Ripk1*, *Ripk3*, *Mlkl*) and apoptosis (*Casp3*). Stroke had been induced by transient left middle cerebral artery occlusion (tMCAO) and NSC in proliferation supporting medium or the medium alone were transplanted in the striatum of affected (ipsilateral) hemisphere 24 h following stroke. Mice had been sacrificed 14 days following stroke and both hemispheres were used for gene expression analysis. Transplantation of NSC in the mouse brain affected by stroke significantly downregulated damage-supportive genes *Aifm1* and *Casp3*. Moreover, expression of genes involved in necroptosis (*Ripk1*, *Ripk3*, *Mlkl*) was increased following stroke, injection of proliferation supporting medium managed to reduce their level but transplantation of NSC supported high expression levels of *Ripk3* and *Mlkl* for which was recently shown that play important roles in endosomal trafficking and extracellular vesicle generation.

32 pages, 10 figures, 1 table, 45 references, original in: Croatian

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: Ischemic brain stroke, neural stem cells, programmed cell death, gene expression

Supervisor: dr. sc. Dinko Mitrečić, izv. prof.

Cosupervisor: dr. sc. Inga Marijanović, doc.

Reviewers: dr. sc. Inga Marijanović, doc.; dr. sc. Sofia Ana Blažević, doc; dr. sc. Damjan Franjević, izv. prof.

Thesis accepted: 03.05.2018.

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
Moždani udar .....	1
Matične stanice u istraživanju ishemijskog moždanog udara .....	1
Programirana stanična smrt nakon ishemijskog moždanog udara .....	2
Apoptoza .....	3
Programirana stanična smrt posredovana proteinom AIF .....	6
Nekroptoza .....	7
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	8
3. MATERIJALI I METODE .....	10
Izolacija živčanih matičnih stanica te uspostava stanične kulture .....	10
Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu .....	11
Statistička analiza .....	16
4. REZULTATI.....	17
Ekspresijski obrazac gena uključenog u staničnu smrt posredovanju proteinom AIF ( <i>Aifm1</i> ) .....	18
Ekspresija gena <i>Aifm1</i> je povećana nakon moždanog udara dok transplantacija živčanih matičnih stanica normalizira ekspresiju navedenog gena .....	18
Ekspresijski obrazac gena uključenih u nekroptozu ( <i>Ripk1, Ripk3, Mkl1</i> ) .....	19
Ekspresija gena <i>Ripk1</i> povećana je nakon moždanog udara, a živčane matične stanice i samo medij normaliziraju razinu ekspresije.....	19
Ekspresija gena <i>Ripk3</i> i <i>Mkl1</i> povećana je nakon moždanog udara, a njihova visoka ekspresija održana je i nakon transplantacije živčanih matičnih stanica.....	20
Ekspresijski obrazac gena uključenog u apoptozu ( <i>Casp3</i> ) .....	22
Transplantacija živčanih matičnih stanica nakon moždanog udara značajno je smanjila ekspresiju gena <i>Casp3</i> u odnosu na zdravu kontrolu .....	22
5. RASPRAVA.....	23
6. ZAKLJUČAK.....	27
7. LITERATURA.....	28
8. ŽIVOTOPIS.....	32

# 1. UVOD

## Moždani udar

Moždani udar je, uz infarkt srca, najveći zdravstveni problem današnjice. Prema podacima od prije nekoliko godina, incidencija moždanog udara je 95 do 290 slučaja na 100 000 stanovnika, od čega je smrtnost unutar prvih mjesec dana između 13 i 35 % (1). Više od milijun stanovnika Europe zahvaćeno je moždanim udarom svake godine, a zbog demografskih promjena očekuje se kako će taj broj do 2025. premašiti 1.5 milijun (2). U 55-90% slučajeva riječ je o ishemijskom moždanom udaru, koji je predmet ovog istraživanja, dok je u 10-25% slučajeva riječ o hemoragijskom moždanom udaru moždanog udara (1). Ishemijski moždani udar nastaje uslijed prestanka protoka krvi kroz krvnu žilu u mozgu, prilikom čega dolazi do prestanka opskrbe kisikom i hranjivim tvarima zahvaćenog dijela moždanog tkiva, te posljedičnog oštećenja i odumiranja moždanog tkiva. Do hemoragijskog moždanog udara dolazi uslijed puknuća krvne žile u mozgu prilikom čega dolazi do izlivanja krvi u moždani parenhim.

S obzirom na razmjer zahvaćenosti tkiva smanjenim protokom krvi, kod ishemijskog moždanog udara razlikujemo dva područja oštećenog tkiva, a to su jezgra moždanog udara (engl., *infarct core*) i penumbra. Jezgra moždanog udara predstavlja tkivo koje je najviše zahvaćeno smanjenim protokom krvi, pa se stanice koje se tu nalaze više ne mogu spasiti. S druge strane, penumbra je manje zahvaćena ishemijom zato jer dobiva dio krvi iz okolnih kolateralnih žila, pa je to dio tkiva koji se nastoji spasiti terapijskim intervencijama (3). Za sada je intravenozna administracija rekombinantnog tkivnog plazminogen aktivatora (r-tPA) jedini odobreni farmakološki pristup u liječenju ishemijskog moždanog udara, a kako je on primjenjiv u vrlo malom postotku pacijenata (4), potrebni su novi pristupi u liječenju bolesti mozga uzrokovanih ishemijom.

## Matične stanice u istraživanju ishemijskog moždanog udara

Matične stanice postoje u svim tkivima i organima, a predstavljaju populaciju stanica koje su i nakon završenog razvitka zadržale sposobnost samoobnove i diferencijacije u različite vrste stanica. Uloga matičnih stanica je zamjena odumrlih stanica i regeneracija tkiva. Dok je kod manjih oštećenja to moguće, kod većih oštećenja postojanje endogenih matičnih stanica nije dovoljno. Takva oštećenja, a posebno u organima koji inače nemaju obilnu populaciju

endogenih matičnih stanica (mozak), predmet su istraživanja regenerativne medicine. Različiti tipovi multipotentnih matičnih stanica mogu se dobiti izolacijom iz različitih tkiva, tako su npr. neki od izvora mezenhimalnih matičnih stanica koštana srž, periferna krv i adipozno tkivo (5). Međutim, matične stanice mogu se dobiti i reprogramiranjem iz već diferenciranih stanica, a takve stanice nazivaju se inducirane pluripotentne matične stanice (iPSC) (6). Otkrićem iPSC smanjena je potreba za pluripotentnim embrionalnim matičnim stanicama čija je upotreba etički upitna.

Brojna istraživanja na pretkliničkoj i kliničkoj razini pokazala su pozitivan utjecaj transplantacije matičnih stanica nakon ishemijskog moždanog udara. Embrionalne živčane matične stanice transplantirane u mozak štakora koji su pretrpjeli ishemijski moždani udar migrirale su na mjesto ishemijske ozljede, diferencirale se u neurone, astrocite i mikrogliju, te su poboljšale senzomotorne funkcije eksperimentalnih životinja (7). Nadalje, transplantacija mezenhimalnih matičnih stanica u životinjske modele ishemijskog moždanog udara poboljšala je senzomotorne funkcije, potaknula sinaptogenezu te stimulirala regeneraciju živaca (7). Što se tiče kliničkih istraživanja, Kalladka i sur. pokazali su da transplantacija imortalizirane stanične linije živčanih matičnih stanica CTX0E03 u putamen 13 pacijenata koji su pretrpjeli moždani udar, nije imala nikakvih nuspojava te je kod pacijenata zabilježena poboljšana neurološka funkcija (8). Chen i sur., u metaanalizi koja je uključivala 16 studija, objavili su da transplantacija matičnih stanica značajno poboljšava neurološke i motorne funkcije te funkcionalnu neovisnost, ali istovremeno ističu potrebu za novim većim studijama koje bi potvrdile navedene rezultate (9).

### Programirana stanična smrt nakon ishemijskog moždanog udara

Programirana stanična smrt je važno zbivanje u razvoju organizma, ali i kasnije u održavanju homeostaze odrasle jedinice. Njeno postojanje nužno je za uklanjanje nepotrebnih stanica, npr., u razvoju prstiju ruke i noge, ali i stanica koje imaju tumorigeni potencijal. Istovremeno, procesi programirane stanične smrti mogu izmaknuti kontroli, što dovodi do patoloških stanja – u tumorima su stanice promijenjene tako da izbjegavaju smrt (10), dok u nekim drugim bolestima kao što su moždani i srčani udar, postoji upravo suprotan problem prekomjerne stanične smrti. Prema tome, čini se kako je upravo razumijevanje puteva programirane stanične smrti jedan od preduvjeta za liječenje najčešćih bolesti modernog doba.

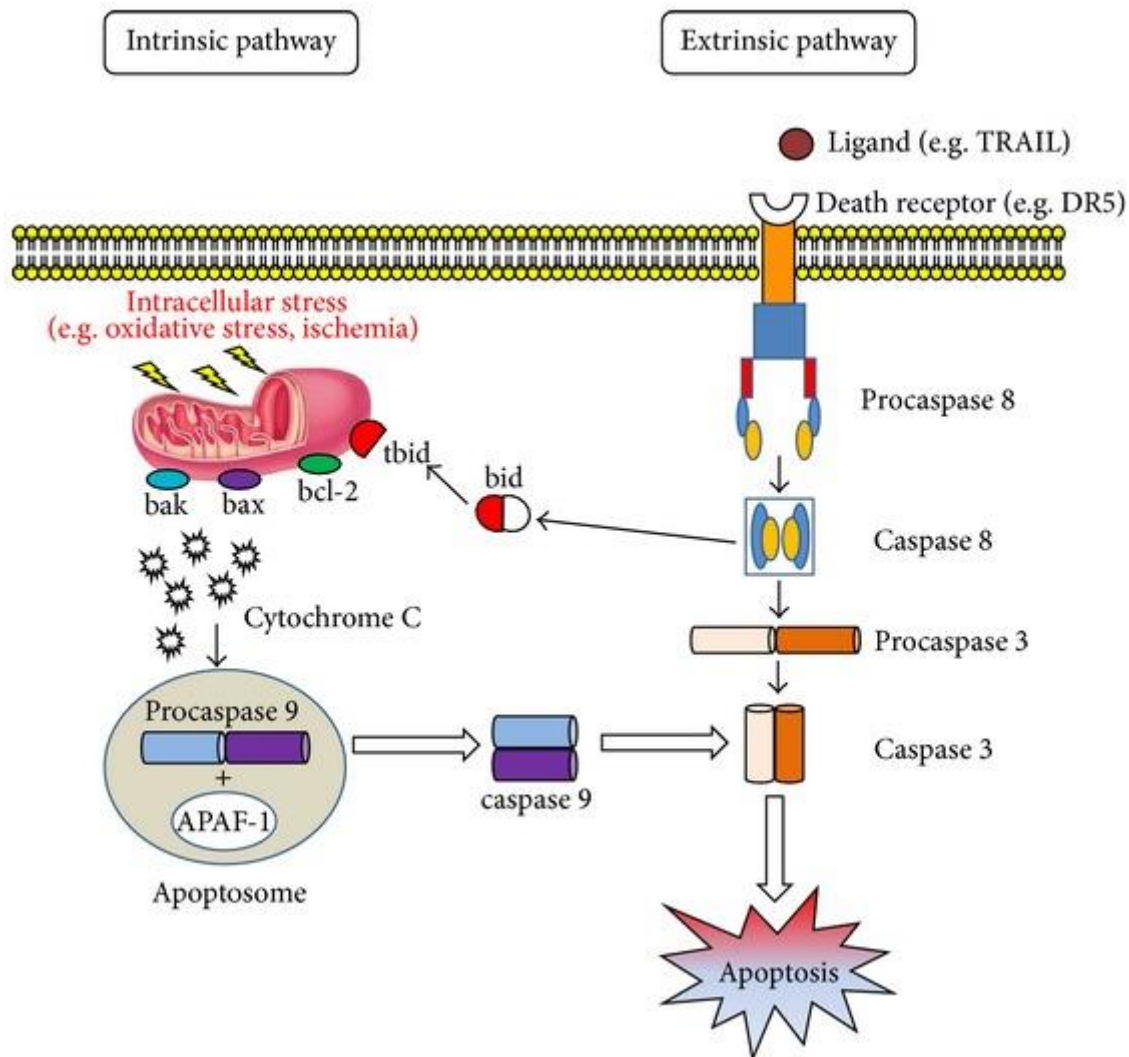


Stanična smrt se do nedavno dijelila na programiranu staničnu smrt ili apoptozu, koju karakterizira fagocitoza umirućih stanica, te neorganiziranu i slučajnu (11) staničnu smrt ili nekrozu koju karakterizira izlivanje staničnog sadržaja i upala. Danas znamo kako uz apoptozu postoji više različitih tipova programirane stanične smrti, od kojih su neki obilježeni nekrotičkom morfologijom. Berghe i sur. su objavili pregledni rad u kojem opisuju različite tipove programirane tj., regulirane nekroze: parthanatozu (engl., *parthanatos*), nekroptozu (engl., *nekroptosis*), oksitozu (engl., *oxytosis*), ferroptozu (engl., *ferroptosis*), NETozu (engl., *NETosis*), pironekrozu (engl., *pyronecrosis*) i piroptozu (engl., *pyroptosis*) (12). Navedeni tipovi stanične smrti se razlikuju u molekulama kojima su posredovani, a zajedničko im je da u svim slučajevima dolazi do smrti stanice koja je popraćena izlivanjem staničnog sadržaja u izvanstanični prostor. Pojava staničnog sadržaja u međustaničnom prostoru je pokazana kao jedan od glavnih okidača upale. Još jedan tip programirane stanične smrti je i autofagija (13), za čije je otkriće 2016. godine dobivena Nobelova nagrada. U ovom istraživanju fokusirali smo se na apoptozu, programiranu staničnu smrt posredovanu proteinom AIF i nekroptozu - puteve programirane stanične smrti za koje je pokazano da imaju ulogu u patologiji nakon ishemijskog moždanog udara (14–16).

### Apoptoza

Apoptoza je tip programirane stanične smrti koja je posredovana kaspazama, a njena biokemijska obilježja su fragmentacija DNA, premještanje fosfatidilserina u vanjski sloj stanične membrane te gubitak mitohondrijskog potencijala (17). Kaspaze su cisteinske proteaze koje cijepaju proteine na mjestu aspartata, a djeluju u kaskadi. Apoptoza se može pokrenuti vanjskim putem posredovanim receptorima smrti ili unutarnjim putem posredovanim mitohondrijem (**Slika 1.**). Vanjski put aktivira se vezanjem faktora smrti kao što su npr., FasL (engl., *First apoptotic signal ligand*), TNF- $\alpha$  (engl., *Tumor necrosis factor- $\alpha$* ) i TRAIL (engl., *TNF-related apoptosis-inducing ligand*), na odgovarajući receptor smrti. Taj događaj uzrokuje procesiranje prokaspaze 8 u aktivnu kaspazu 8. Unutarnji ili mitohondrijski put, koji se aktivira unutarstaničnim stresom, posredovan je vezanjem proapoptičkih i antiapoptičkih članova bcl proteinske obitelji na membranu mitohondrija. Antiapoptički čimbenici, npr., bcl-2, inhibiraju oslobađanje citokroma C iz mitohondrija, dok proapoptički, npr., bax i bid, djeluju suprotno, potičući oslobađanje citokroma C. Oslobođeni citokrom C veže se na APAF-1 (engl., *apoptotic protease activating factor*) formirajući heptamerni

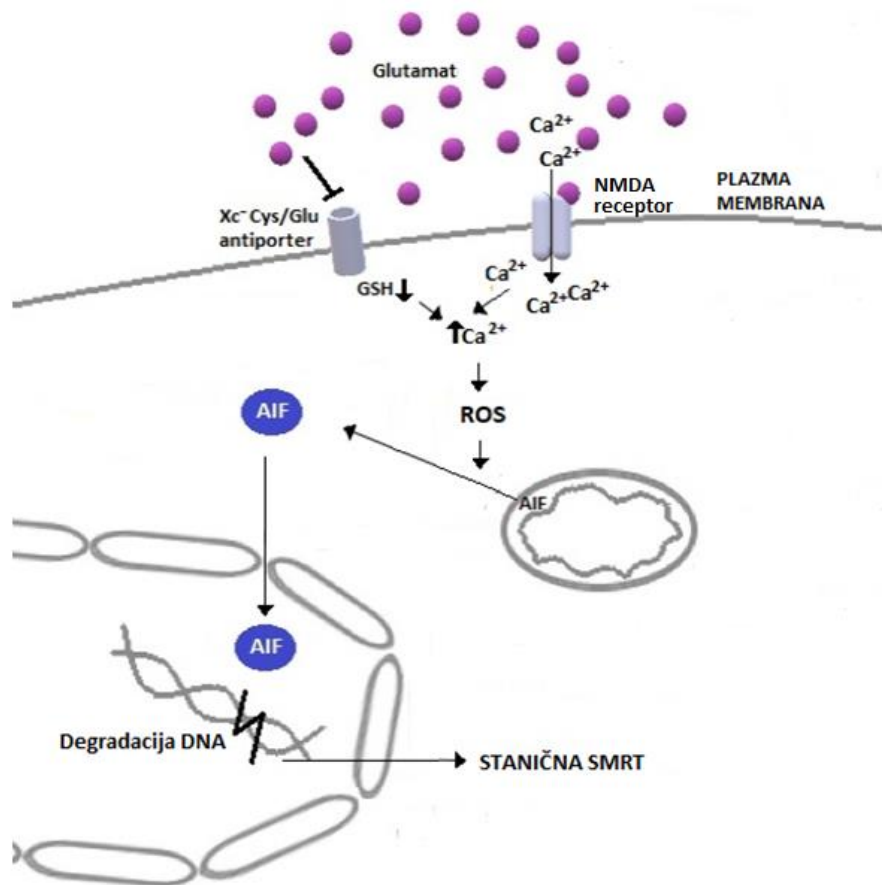
kompleks koji djeluje kao nosač za procesiranje prokaspaze 9 u aktivnu kaspazu 9. Kaspaza 8 koja je aktivirana vanjskim putem te kaspaza 9 koja je aktivirana unutarnjim putem, cijepaju prokaspazu 3 u aktivnu kaspazu 3. Kaspaza 3 jedna je od glavnih egzekucijskih kaspaza. Ona je odgovorna za cijepanje više od 1300 staničnih supstrata, pa tako npr., cijepa ICAD (engl., *inhibitor of caspase-activated DNase*) oslobađajući CAD (engl., *caspase-activated DNase*) koji sudjeluje u apoptotičkoj DNA fragmentaciji, cijepanjem ATP11A/C i XKR8 (engl., *XK Related 8*) uzrokuje premještanje fosfatidilserina u vanjski sloj citoplazmatske membrane, dok cijepanjem ROCK1 (engl., *Rho-associated protein kinase 1*) uzrokuje apoptotičko „pupanje“ membrane (17). Fosfatidilserin u vanjskom sloju plazma membrane signal je makrofazima koji fagocitiraju apoptotičke stanice u procesu eferocitoze (engl., *efferoctosis*) koji je toliko učinkovit da je *in vivo* teško pronaći apoptotičke stanice čak i u tkivima u kojima veliki broj stanica umire apoptozom (17).



**Slika 1. Shematski prikaz apoptoze.** Apoptoza se može manifestirati kroz vanjski (engl., *extrinsic pathway*) ili unutarnji (engl., *intrinsic pathway*) put. Vanjski put pokreće se vezanjem liganda na specifični receptor smrti što uzrokuje cijepanje prokaspaze 8 u kaspazu 8. Kaspaza 8 inducira apoptozu direktno aktivirajući kaspazu 3 ili cijepajući bid (*BH3 interacting domain death agonist*) što uzrokuje oslobađanje citokroma C iz mitohondrija i aktivaciju kaspaze 9 i 3. Djelovanje kaspaze 3 odgovorno je za fragmentaciju DNA i staničnu smrt u brojnim tkivima. Unutarnji ili mitohondrijski put je posredovan vezanjem proapoptičkih i antiapoptičkih članova bcl proteinske obitelji na membranu mitohondrija. Antiapoptički članovi, npr bcl-2, inhibiraju oslobađanje citokroma c iz mitohondrija, dok proapoptički, npr., bax i bid, djeluju suprotno potičući oslobađanje citokroma C. Oslobođeni citokrom C veže se na APAF-1 (*apoptotic protease activating factor*) formirajući multimerni kompleks koji regrutira i aktivira kaspazu 9 koja zatim aktivira kaspazu 3 što rezultira staničnom smrću. Preuzeto iz Loreto i sur. (18).

## Programirana stanična smrt posredovana proteinom AIF

Susin i sur. 1999. godine identificirali su protein koji može inducirati staničnu smrt neovisnu o kaspazama, a kako je tada apoptoza bila sinonim za programiranu staničnu smrt, nazvali su ga AIF (engl., *apoptosis inducing factor*) (19). Uloga proteina AIF opisana je u putevima partanatoze (engl., *parthanatos*) i oksitoze (engl., *oxytosis*) u koje je uključen i glutamat koji se prekomjerno oslobađa nakon ishemijskog moždanog udara (12) (Slika 2.). U partanatozi, glutamat se veže na NMDA receptore koji se otvaraju i kroz njih u stanicu ulaze  $Ca^{2+}$  ioni što uzrokuje tzv. ekscitotoksičnost. Posljedica ekscitotoksičnosti je nakupljanje reaktivnih kisikovih radikala koji uzrokuju oštećenje DNA čime se prekomjerno aktivira PARP (engl., *Poly (ADP-ribose) poly-merase*). Aktivirani PARP uzrokuje nakupljanje PAR polimera što rezultira oslobađanjem proteina AIF iz vanjske membrane mitohondrija te njegovu translokaciju u jezgru što dovodi do stanične smrti (20). U slučaju oksitoze, glutamat inhibira cistein-glutamat antiporter (Xc-) te time smanjuje razinu unutarstaničnog glutationa što dovodi do oksidativne toksičnosti koja također rezultira staničnom smrću posredovanom proteinom AIF (21). Do danas su otkriveni mnogi proteini koji sudjeluju u putu stanične smrti posredovane proteinom AIF. Protein IDUNA (RNF 146, *ring finger protein*) ima protektivno djelovanje blokirajući translokaciju proteina AIF u citoplazmu (22). S druge strane, protein CYPA (engl., *Cyclophilin A*) u citoplazmi stvara kompleks s AIF-om koji se pokazao važnim za indukciju stanične smrti (23). Dugo se znalo da translokacija AIF-a u jezgru uzrokuje degradaciju DNA, ali i da AIF nema nukleaznu aktivnost. Wang i sur. nedavno su otkrili da protein MIF (engl., *Macrophage migration inhibitory factor*), koji je inače dobro poznati protuupalni citokin, zajedno s AIF-om translocira u jezgru te svojom nukleaznom aktivnošću degradira DNA (24). Iako se AIF najčešće spominje uz programiranu staničnu smrt, on ima važnu ulogu u oksidativnoj fosforilaciji te u održanju morfologije mitohondrija (14).

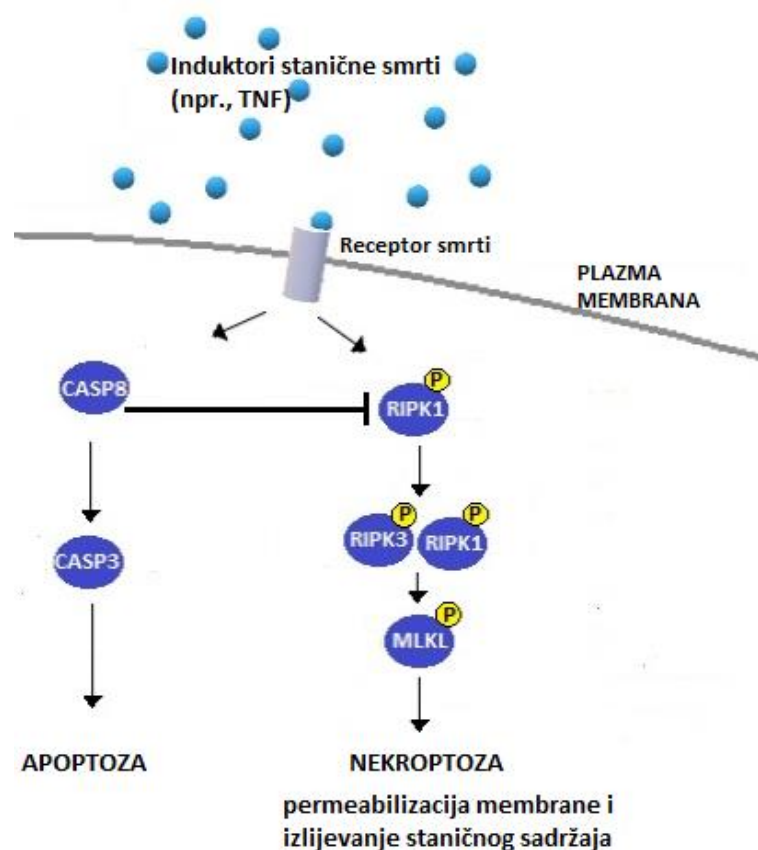


**Slika 2. Pojednostavljeni shematski prikaz programirane stanične smrti posredovane proteinom AIF.** Glutamat, koji se prekomjerno oslobađa nakon ishemijskog moždanog udara, se veže na NMDA receptore koji se otvaraju i kroz njih u stanicu ulaze  $\text{Ca}^{2+}$  ioni što uzrokuje tzv. ekscitotoksičnost. Posljedica ekscitotoksičnosti je nakupljanje reaktivnih kisikovih radikala (ROS) koji uzrokuju oštećenje DNA čime se prekomjerno aktivira PARP (engl., *Poly (ADP-ribose) poly-merase*) (nije prikazano). Aktivirani PARP uzrokuje nakupljanje PAR polimera što rezultira oslobađanjem proteina AIF iz vanjske membrane mitohondrija te njegovu translokaciju u jezgru što dovodi do stanične smrti (20). S druge strane, u slučaju oksitoze, glutamat inhibira cistein-glutamat antiporter ( $\text{Xc}^-$ ) te time smanjuje razinu unutarstaničnog glutationa što dovodi do oksidativne toksičnosti koja također rezultira staničnom smrću posredovanom proteinom AIF (21).

## Nekroptoza

Nekroptoza je programirana stanična smrt nekrotičke morfologije koja je posredovana kinazama RIPK1 (engl., *Receptor Interaction Protein kinase 1*), RIPK3 (engl., *Receptor Interaction Protein kinase 3*) te pseudokinazom MLKL (engl., *Mixed-lineage kinase domain-like protein*). Put nekroptoze, kao i vanjski put apoptoze, aktivira se vezanjem liganda na receptore smrti (Slika 3.). Kada su aktivirani od strane receptora smrti, RIPK1 i RIPK3 udružuju se u kompleks koji se zove nekroptosom, fosforiliraju MLKL koji onda oligomerizira, odlazi na membranu te je permeabilizira (25). RIPK1 i RIPK3 udružuju se u kompleks preko svojih RHIM

(engl., RIP *homotypic interaction motif*) domena te dalje polimeriziraju u filamentozne beta-amiloidne strukture (26). Fosforilirani MLKL tvori kationske kanale na plazma membrani preferencijalno propusne za  $Mg^{2+}$ , ali ne i za  $Ca^{2+}$ , te se pretpostavlja da se takvi kanali stvaraju u početnoj fazi nekroptoze, dok se kasnije MLKL organizira u veće pore što uzrokuje lizu membrane a time i staničnu smrt (27). Međutim, ukoliko se u stanici u trenutku aktivacije receptora smrti nalazi dovoljno aktivne kaspaze 8, ona će cijepati neke stanične supstrate uključujući RIPK1 i RIPK3 te će tako usmjeriti stanicu u apoptozu (28).



**Slika 3. Pojednostavljeni shematski prikaz puta nekroptoze.** Put nekroptoze, kao i vanjski put apoptoze, aktivira se vezanjem liganda na receptore smrti. Aktivacija receptora smrti uzrokuje fosforilaciju RIPK1 koji fosforilira RIPK3, te se s njim udružuje u kompleks koji se zove nekroptosom. Nekroptosom zatim uzrokuje fosforilaciju MLKL koji onda oligomerizira, odlazi na membranu te je permeabilizira (25). Međutim, ukoliko se u stanici u trenutku aktivacije receptora smrti nalazi dovoljno aktivne kaspaze 8, ona će cijepati neke stanične supstrate uključujući RIPK1 i RIPK3 te će tako usmjeriti stanicu u apoptozu (28).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učinak transplantacije živčanih matičnih stanica nakon ishemijskog moždanog udara na ekspresiju gena uključenih u različite tipove

programirane stanične smrti: programiranu smrt posredovanu proteinom AIF (*Aifm1*), nekroptozu (*Ripk1*, *Ripk3*, *Mlkl*) te apoptozu (*Casp3*), u ipsilateralnoj (zahvaćenoj moždanim udarom) i kontralateralnoj (nazahvaćenoj) hemisferi.

Specifični ciljevi ovog istraživanja bili su:

- Uspostaviti stabilnu kulturu živčanih matičnih stanica izolacijom iz telencefaličkog zida embrija miša starih 14.5 dana
- Odrediti izražaj gena *Aifm1*, *Ripk1*, *Ripk3*, *Mlkl* i *Casp3*, u zahvaćenoj i nezahvaćenoj hemisferi mozga četiriju skupina miševa: (1) zdravi miševi, (2) miševi zahvaćeni moždani udarom, (3) miševi zahvaćeni moždanim udarom u koje su transplantirane živčane matične stanice i (4) miševi zahvaćeni moždanim udarom u koje je injiciran medij koji potiče proliferaciju te koji služi za uzgoj živčanih matičnih stanica

Pretpostavka je da će 15 dana nakon indukcije moždanog udara ekspresija gena uključenih u puteve programirane stanične smrti biti povišena u ipsilateralnoj hemisferi mozga, a da će u kontralateralnoj hemisferi ekspresija ostati nepromijenjena. Istovremeno smo pretpostavili kako će transplantacija živčanih matičnih stanica u striatum ipsilateralne hemisfere miševa s vidljivim kortiko-striatalnim moždanim udarom normalizirati ekspresiju navedenih gena.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### Izolacija živčanih matičnih stanica te uspostava stanične kulture

Za izolaciju živčanih matičnih stanica korišten je soj miševa B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J. Živčane matične stanice izolirane su iz telencefaličkog zida embrija starih 14.5 dana kako je opisano (30). Ukratko, 14.5. dana skotnosti ženke su eutanazirane cervikalnom dislokacijom. Abdomen im je dezinficiran 70% etanolom. Iz abdominalne šupljine izvađena su oba roga maternice s embrijima te su stavljeni u petrijevu posudicu u kojoj se nalazio hladni 1xPBS pufer. Embriji su izolirani iz maternice te su prebačeni u čistu petrijevu posudicu s 1xPBS-om. Glava je odvojena na mjestu vratne leđne moždine. Napravljen je sagitalni rez kroz kožu i lubanju, te je izoliran mozak i stavljen u čisti 1xPBS. Izolirani mozgovi prenijeti su pipetom, čijem je nastavku odrezan vrh u čisti 1xPBS u petrijevoj posudici. U jednu petrijevu posudicu stavljeno je 4-5 izoliranih mozgova embrija koji su zatim usitnjeni škaricama. Usitnjeno tkivo prebačeno je u epruveti 50 ml uz pomoć pipete čijem je nastavku odrezan vrh. Višak 1xPBS-a usisan je pipetom. Dodano je 5 ml enzima akutaze te je sadržaj epruvete zagrijavan u vodenoj kupelji 20 min na 37 °C. Nakon 10 minuta, sadržaj u epruveti lagano je promiješan pipetom (nastavak bez vrha) te je epruveta vraćena u vodenu kupelj na još 10 minuta. Nakon ukupno 20 minuta u vodenoj kupelji, sadržaj epruvete još jednom je promiješan i pušten da se istaloži. Mutna tekućina koja je sadržavala stanice, pipetom je prebačena u novu epruvetu pazeći da se ne pokupe komadići nerazgrađenog tkiva koji su pali na dno. U epruvetu je dodano 10 ml medija DMEM/F-12 (Gibco, Life Technologies, 31331-028) te je sadržaj epruvete centrifugiran na 400 g/6 min (2070 o/min). Za vrijeme centrifugiranja, pripremljen je medij za rast živčanih matičnih stanica: 22 ml medija DMEM/F-12, 220 µl N-2 suplement (Gibco, Life Technologies, 17502-048), 220 µl Penicillin/Streptomycin (Gibco, Life Technologies, 15070-063), 440 µl B-27 suplementa (Gibco, Life Technologies, 17504-044), 44 µl EGF (engl. *Recombinant Mouse Epidermal Growth Factor*, PMG8041), 44 µl FGFb (engl. *Recombinant Mouse Fibroblast Growth Factor-basic*, PMG0035). Navedeni volumeni dovoljni su za jednu posudu za uzgoj stanica u koju idu stanice dobivene iz 4-5 mozgova embrija miša. Nakon centrifugiranja supernatant je odstranjen pipetom te je u talog stanica dodano 2 ml pripremljenog medija za rast. Sadržaj epruvete lagano je promiješan uz pomoć pipete kako bi se talog resuspendirao. Suspenzija stanica prebačena je u ostatak pripremljenog medija (20 ml) za rast. Suspenzija stanica u mediju za rast nasađena je pipetom u posudu za uzgoj stanica lagano ispuštajući sadržaj po



dnu posude kako se ne bi stvorili mjehurići. Nasađene stanice pogledane su pod mikroskopom te su posude za uzgoj stanica stavljene u inkubator na 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>.

Stanice su održavane u kulturi tako da su se presađivale treći ili četvrti dan kada su bile vidljive nakupine živčanih matičnih stanica (neurosfera) promjera 150-200 μm. Živčane matične stanice presađene su na način da je sadržaj posude za uzgoj stanica pipetom prebačen u epruvetu 50 ml te centrifugiran na 400 g/6 min. Supernatant je odliven i u talog stanica je dodano 3 ml temperirane akutaze. Epruveta je stavljena u vodenu kupelj na 37 °C na ukupno 10 min. Nakon 5 min, sadržaj je resuspendiran 20ak puta te je epruveta vraćena u vodenu kupelj na još 5 min. Nakon ukupno 10 min u vodenoj kupelji, sadržaj je ponovno resuspendiran pomoću pipete te je zatim prebačen u čistu epruvetu u koju je prethodno dodano 9 ml temperiranog medija DMEM/F-12 kako bi se neutralizirala akutaza. Sadržaj epruvete lagano je resuspendiran te ponovno centrifugiran na 400 g/6 min. U međuvremenu je pripremljen medij za rast prema već opisanom postupku. Nakon centrifugiranja, supernatant je pažljivo odliven te je u talog dodano 2 ml medija za rast. Talog je lagano resuspendiran pomoću pipete i prebačen u posudu za uzgoj stanica u koju je prethodno dodano 20 ml medija za rast. Postupak je ponovljen nakon 3-4 dana kada su se pojavile neurosfere.

### Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

U ovom istraživanju korišteni su uzorci RNA koja je izolirana iz obiju hemisfera mozga četiri skupine životinja: zdravi miševi [**H**, engl. *Healthy*] (n=3), miševi zahvaćeni moždanim udarom [**S**, engl. *Stroke*] (n=4), miševi zahvaćeni moždanim udarom u koje su transplantirane živčane matične stanice [**S+C**, engl. *Stroke + Cells*] (n=4-7) te miševi zahvaćeni moždanim udarom u koje je injiciran medij koji služi za uzgoj živčanih matičnih stanica [**S+M**, engl. *Stroke + Medium*] (n=4-5). Miševi iz čijih je hemisfera mozga izolirana RNA koja je korištena u ovom istraživanju prošli su sljedeće postupke: indukcija moždanog udara metodom privremene okluzije srednje lijeve moždane arterije, stereotaktička injekcija živčanih matičnih stanica ili samo medija u striatum ipsilateralne hemisfere 24 h nakon induciranja moždanog udara, izolacija ipsilateralne (lijeve, zahvaćene moždanim udarom) i kontralateralne (desne, nezahvaćene moždanim udarom) hemisfere 14 dana nakon stereotaktičke injekcije te izolacija ukupne RNA iz obiju hemisfera. Miševi kojima je induciran moždani udar bili su soja C57Bl/6NCrI koji je na istoj genetičkoj podlozi kao i soj B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J iz kojeg su izolirane živčane matične stanice te se radilo o mužjacima starim 3 mjeseca. Životinje su bile

uzgajane u nastambi za životinje Hrvatskog instituta za istraživanje mozga na temperaturi  $22 \pm 2$  °C, sa  $55\% \pm 10\%$  vlage te ciklusom od 12h svjetla i 12h mraka. Voda i suha hrana bile su im dostupne *ad libitum*.

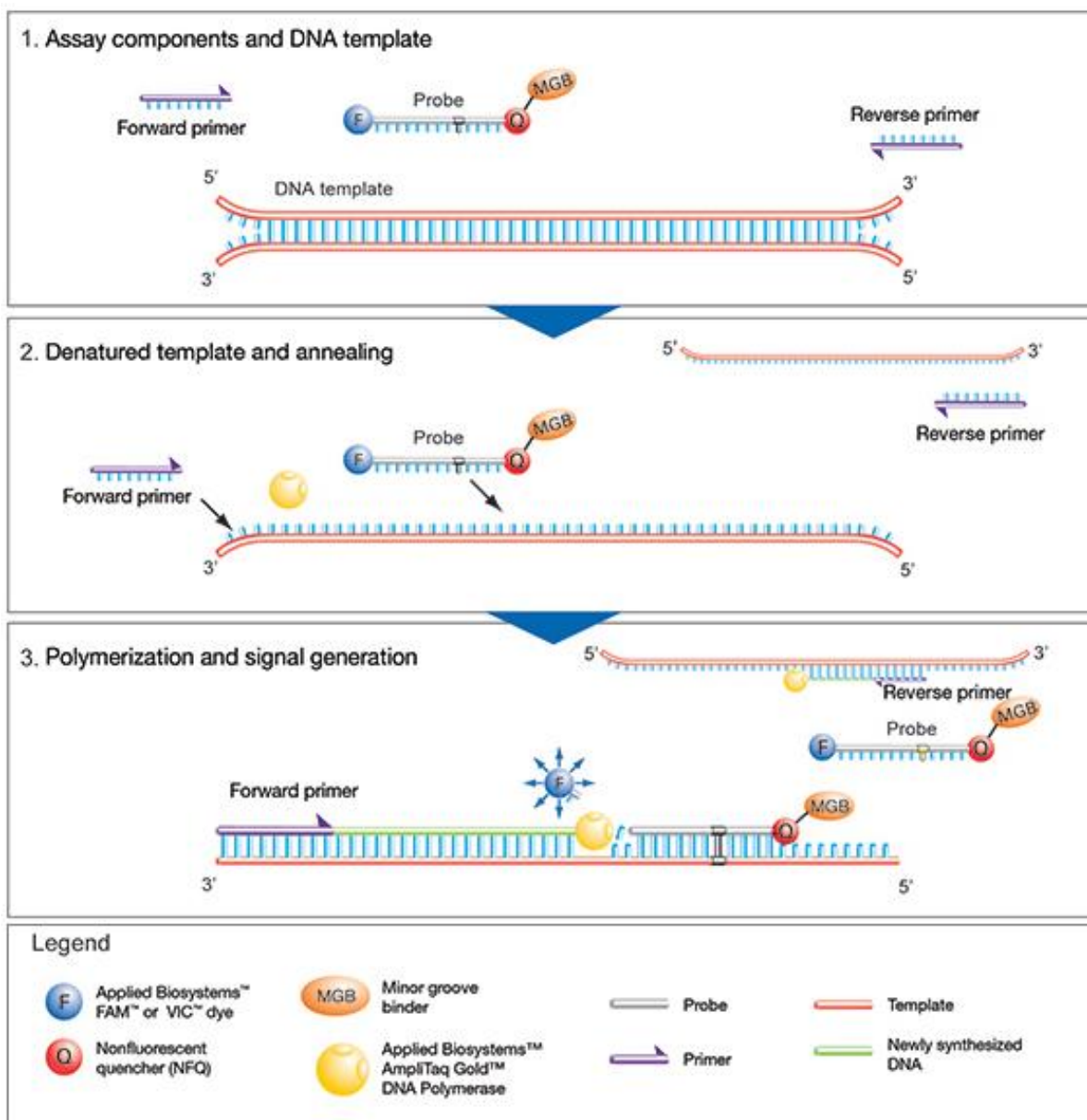
RNA je prepisana u cDNA uz pomoć komercijalno dostupnog kita: high capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, Kalifornija. 94404, SAD) prema uputama proizvođača te u uređaju *27020 Thermal Cycler (Applied Biosystems)*. Kombinacije proba i početnica (engl., *assays*) korištene u ovom istraživanju prikazane su u **tablici 1**, dok je ekspresija gena analizirana s obzirom na endogenu kontrolu beta aktin (ACTB MGB 4352933E) (*TaqMan Gene Expression Assays*). Svi uzorci rađeni su u duplikatima sa 1 µg cDNA u ukupnom volumenu 20 µL, a lančana reakcija pomilerazom u stvarnom vremenu napravljena je prema uputama proizvođača u uređaju Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System.

**Tablica 1.** Popis *TaqMan*<sup>®</sup> kombinacija proba i početnica (engl., *assays*), zajedno s njihovim kataloškim brojevima, korištene u ovom istraživanju (izvor: Applied Biosystems).

Kombinacija proba i početnica	Kataloški broj
<i>Aifm1</i>	Mm00442548_m1
<i>Ripk1</i>	Mm00436354_m1
<i>Ripk3</i>	Mm00444947_m1
<i>Mlkl</i>	Mm01244222_m1
<i>Casp3</i>	Mm01195085_m1

Mehanizam djelovanja *Applied Biosystems*<sup>™</sup> *TaqMan*<sup>®</sup> *real-time PCR* kombinacija proba i početnica prikazan je na **slICI 4**. Kombinacije proba i početnica (engl., *assays*) sadrže: par neobilježenih početnica specifičnih za gen te probe sa FAM<sup>™</sup> ili VIC<sup>™</sup> fluorogenim bojama na 5' kraju, dok je na 3' kraju molekula koja se veže na mali utor u DNA (engl., *minor groove binder, MGB*) i nefluorescentna molekula koja hvata signal fluorescentnih boja (engl., *nonfluorescent quencher, NFQ*). Na početku lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu, podigne se temperatura kako bi se denaturirala dvolančana cDNA. Tijekom prvog koraka, signal iz fluorescentne boje na 5' kraju probe hvata NFQ na 3' kraju pa se signal ne može detektirati. U sljedećem koraku, reakcijska temperatura se snizi kako bi se omogućilo

vezanje početnica i probe na komplementarne sljedove u cDNA. *Taq* DNA polimeraza sintetizira nove lance DNA koristeći neoznačene početnice. Kada polimeraza dođe do obilježene probe, njena 5' nukleazna aktivnost razgrađuje probu odvajajući boju od molekule koja hvata signal boje. Sa svakim ciklusom lančane reakcije polimerazom, oslobađa se sve više boje, što rezultira povećanjem intenziteta fluorescencije koje je proporcionalno sintetiziranom amplikonu.



**Slika 4. Prikaz djelovanja TaqMan® Gene Expression kombinacija proba i početnica (engl., assays).**

Kombinacije proba i početnica (engl., assays) sadrže: uzvodne (engl., *Forward primers*) i nizvodne (engl., *Reverse primers*) neobilježene početnice specifične za gen te probe sa FAM™ ili VIC™ fluorogenim bojama na 5' kraju, dok je na 3' kraju molekula koja se veže na mali utor u DNA (engl., *Minor groove binder, MGB*) i nefluorescentna molekula koja hvata signal fluorescentnih boja (engl., *nonfluorescent quencher, NFQ*).

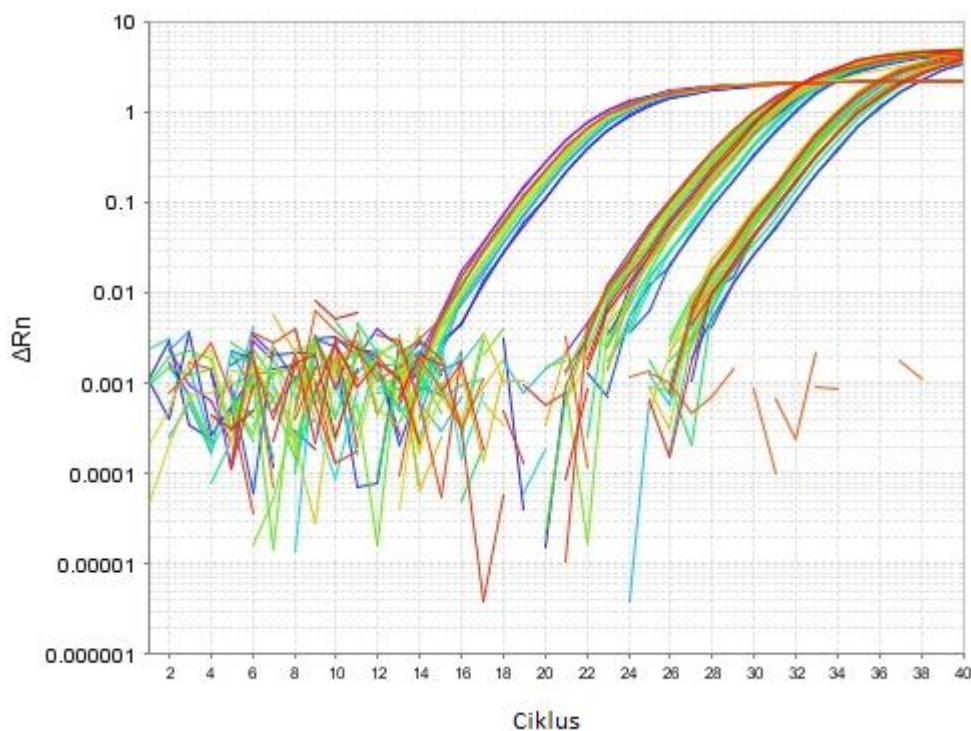
1. Na početku lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu, podigne se temperatura kako bi se denaturirala dvolančana cDNA. Tijekom prvog koraka, signal iz fluorescentne boje na 5' kraju probe hvata NFQ na 3' kraju pa se signal ne može detektirati.

2. U sljedećem koraku, reakcijska temperatura se snizi kako bi se omogućilo vezanje početnica i probe na komplementarne sljedove u cDNA.

3. Taq DNA polimeraza sintetizira nove lance DNA koristeći neoznačene početnice. Kada polimeraza dođe do obilježene probe, njena 5' nukleazna aktivnost razgrađuje probu odvajajući boju od molekule koja hvata signal boje.

(izvor: službena web stranica tvrtke *ThermoFisher Scientific*)

Uređaj mjeri intenzitet fluorescencije u svakom ciklusu prilikom čega nastaje amplifikacijska krivulja (**Slika 5.**). Na amplifikacijskoj krivulji postoji granična vrijednost signala (engl., *threshold*) koja predstavlja vrijednost intenziteta fluorescencije na kojoj signal dobiven amplifikacijom željenog gena preraste početnu buku. Za analizu ekspresije gena uzima se broj ciklusa ( $C_T$ , *threshold cycle*) koji se nalazi u dijelu amplifikacijske krivulje između granične vrijednosti signala te platoa koji nastaje kada se reagensi potroše, tj., nema više amplifikacije gena pa je intenzitet fluorescencije na konstantnoj vrijednosti. Analiza ekspresije gena napravljena je na način da je od  $C_T$  vrijednosti za određeni gen oduzeta  $C_T$  vrijednost endogene kontrole (beta aktin) te je tako dobivena  $\Delta C_T$  vrijednost. Relativna ekspresija gena dobivena je pomoću formule  $2^{-\Delta C_T}$ .



**Slika 5. Primjer amplifikacijske krivulje.** Os y označava intenzitet izmjerene fluorescencije, dok je na x osi broj ciklusa. Različite boje krivulja predstavljaju različite uzorke rađene u duplikatima. Granična vrijednost signala (engl., *threshold*) je vrijednost intenziteta fluorescencije na kojoj signal dobiven amplifikacijom željenog gena preraste početnu buku. Dio amplifikacijske krivulje u kojem se uzima broj ciklusa za analizu ( $C_T$  – *threshold cycle*) je onaj između granične vrijednosti signala te platoa koji nastaje kada se reagensi potroše, tj., nema više amplifikacije gena pa je intenzitet fluorescencije na konstantnoj vrijednosti.

## Statistička analiza

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (engl., *standard error*, SE). Usporedba među grupama napravljena je koristeći one-way ANOVA s post-hoc Tukey testom koji omogućava usporedbu skupina s različitim brojem članova. Statistička analiza napravljena je u programu GraphPad Prism. Razlike među grupama smatrane su značajnima s  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$  i  $P < 0,001$ .

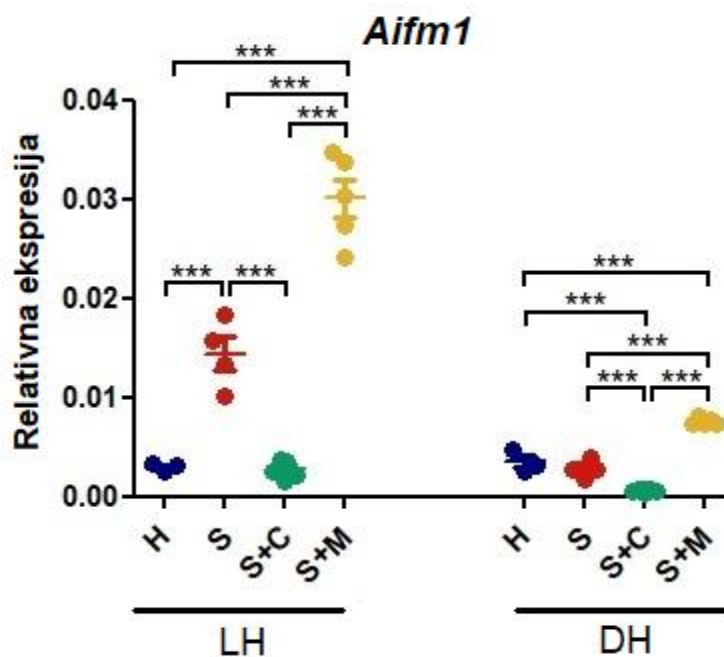
## 4. REZULTATI

U ovom istraživanju analizirana je ekspresija gena uključenih u puteve programirane stanične smrti: staničnu smrt posredovanu proteinom AIF (*Aifm1*), nekroptozu (*Ripk1*, *Ripk3*, *Mkl1*) te apoptozu (*Casp3*) nakon moždanog udara. U istraživanje su bile uključene četiri skupine životinja: zdravi miševi [**H**, engl. *Healthy*], miševi zahvaćeni moždani udarom [**S**, engl. *Stroke*], miševi zahvaćeni moždanim udarom u čiji su striatum transplantirane živčane matične stanice [**S+C**, engl. *Stroke + Cells*] te miševi zahvaćeni moždanim udarom u čiji je striatum injiciran medij koji potiče proliferaciju te koji služi za uzgoj živčanih matičnih stanica [**S+M**, engl. *Stroke + Medium*]. Živčane matične stanice ili samo medij injicirani su 24 h nakon induciranja moždanog udara, a miševi su žrtvovani 14 dana nakon injiciranja živčanih matičnih stanica, tj. medija. Analiza ekspresije gena napravljena je na ipsilateralnoj (lijevoj, **LH**) te kontralateralnoj (desnoj, **DH**).

## Ekspresijski obrazac gena uključenog u staničnu smrt posredovanju proteinom AIF (*Aifm1*)

Ekspresija gena *Aifm1* je povećana nakon moždanog udara dok transplantacija živčanih matičnih stanica normalizira ekspresiju navedenog gena

Moždani udar uzrokovao je značajno povećanje ekspresije gena *Aifm1* u ipsilateralnoj (lijevoj, **LH**), ali ne i u kontralateralnoj (desnoj, **DH**) hemisferi (**Slika 5.**). Transplantacija živčanih matičnih stanica nakon ishemijskog moždanog udara u ipsilateralnoj hemisferi smanjila je ekspresiju navedenog gena na razinu sličnu onoj zabilježenoj kod zdravih miševa. S druge strane, injekcija medija nije imala pozitivan učinak na ekspresiju navedenog gena. Štoviše, medij je uzrokovao dodatno povećanje ekspresije gena *Aifm1* što je zabilježeno i u kontralateralnoj (desnoj) hemisferi (**Slika 6.**). Moždani udar nije uzrokovao povećanje ekspresije gena *Aifm1* u kontralateralnoj hemisferi, dok je u toj hemisferi u grupi životinja u koje su transplantirane matične stanice, ekspresija gena *Aifm1* bila značajno snižena u odnosu na ostale tri skupine.



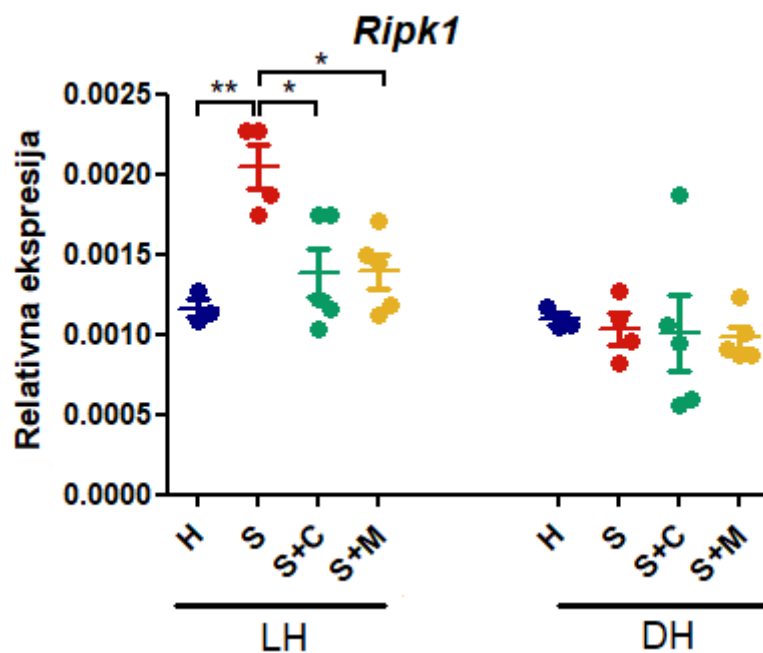
**Slika 6. Relativna razina ekspresije gena *Aifm1* u ipsilateralnoj (lijevoj, LH) i kontralateralnoj (desnoj, DH) hemisferi.** Uključene grupe: zdravi miševi [H, engl. *Healthy*], miševi zahvaćeni moždanim udarom [S, engl. *Stroke*], miševi zahvaćeni moždanim udarom u čiji su striatum transplantirane živčane matične stanice [S+C, engl. *Stroke + Cells*] te miševi zahvaćeni moždanim udarom u čiji je striatum injiciran medij koji potiče proliferaciju te koji služi za uzgoj živčanih matičnih stanica [S+M, engl. *Stroke + Medium*]. Razine mRNA svakog gena pokazane su kao postotak beta-aktina (endogene kontrole). Razlike među grupama smatrane su značajnima uz  $P < 0,05$  (\*);  $P < 0,01$  (\*\*) i  $P < 0,001$  (\*\*\*)



## Ekspresijski obrazac gena uključenih u nekroptozu (*Ripk1*, *Ripk3*, *Mlkl*)

Ekspresija gena *Ripk1* povećana je nakon moždanog udara, a živčane matične stanice i samo medij normaliziraju razinu ekspresije

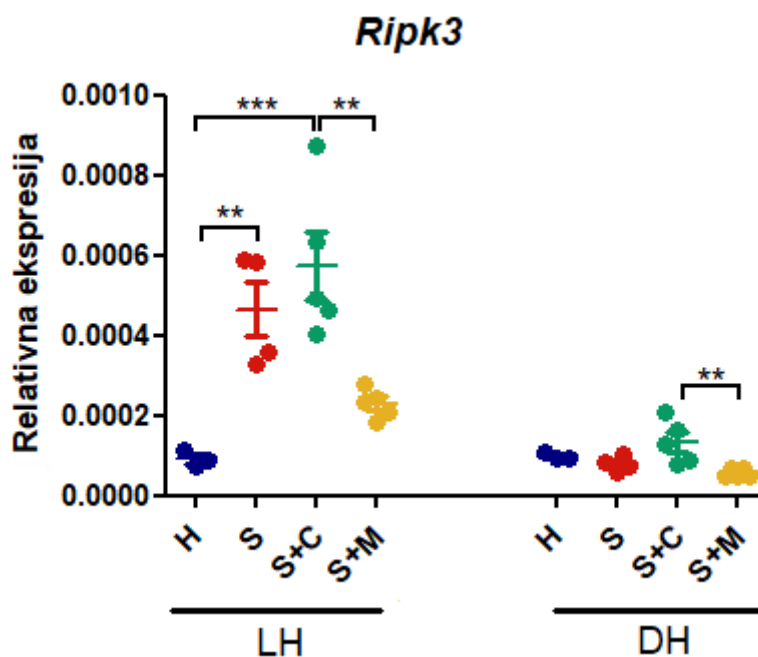
U ipsilateralnoj hemisferi, ekspresija gena *Ripk1* značajno je povećana nakon moždanog udara, a transplantacija živčanih matičnih stanica ili samo medija smanjuju razinu ekspresije navedenog gena na razinu sličnu onoj izmjerenoj u zdravih miševa (**Slika 7.**). S druge strane, u kontralateralnoj hemisferi nema statistički značajnih razlika među grupama u razini ekspresije gena *Ripk1* (**Slika 7.**)



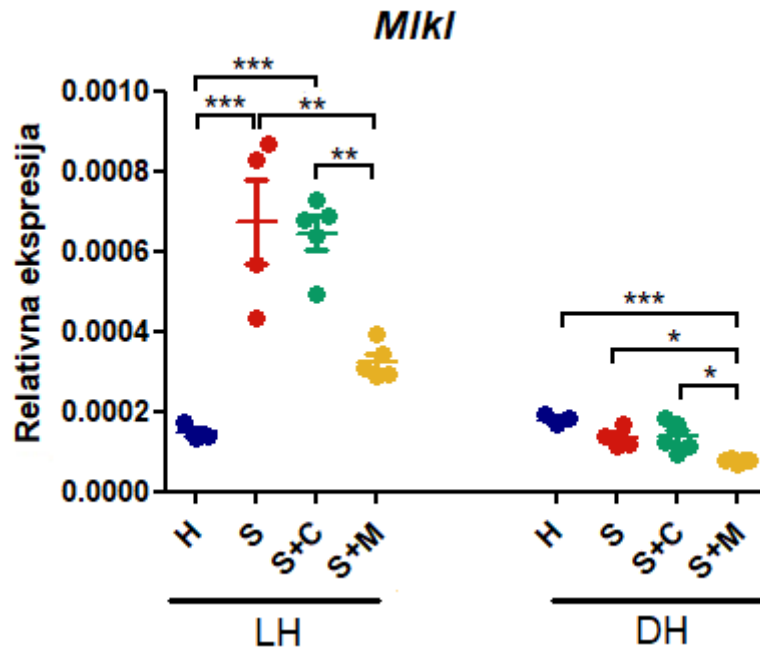
**Slika 7.** Relativna razina ekspresije gena *Ripk1* u ipsilateralnoj (lijevoj, LH) i kontralateralnoj (desnoj, DH) hemisferi. Uključene grupe: zdravi miševi [H, engl. *Healthy*], miševi zahvaćeni moždani udarom [S, engl. *Stroke*], miševi zahvaćeni moždanim udarom u čiji su striatum transplantirane živčane matične stanice [S+C, engl. *Stroke + Cells*] te miševi zahvaćeni moždanim udarom u čiji je striatum injiciran medij koji potiče proliferaciju te koji služi za uzgoj živčanih matičnih stanica [S+M, engl. *Stroke + Medium*]. Razine mRNA svakog gena pokazane su kao postotak beta-aktina (endogene kontrole). Razlike među grupama smatrane su značajnima uz  $P < 0,05$  (\*);  $P < 0,01$  (\*\*) i  $P < 0.001$  (\*\*\*)

Ekspresija gena *Ripk3* i *Mkl1* povećana je nakon moždanog udara, a njihova visoka ekspresija održana je i nakon transplantacije živčanih matičnih stanica

Geni *Ripk3* i *Mkl1* imali su isti obrazac ekspresije u ipsilateralnoj hemisferi: povećana razina ekspresije nakon moždanog udara koja je normalizirana injekcijom samog medija, ali ne i transplantacijom živčanih matičnih stanica (Slika 8. i 9.). U kontralateralnoj hemisferi, ekspresija gena *Mkl1* u životinja koje su pretrpjele moždani udar i u koje je transplantiran medij značajno je manja u usporedbi s ostale tri skupine životinja (Slika 9.), dok je u slučaju gena *Ripk3* ekspresija u životinja koje su pretrpjele moždani udar i u koje je transplantiran medij značajno manja u odnosu na skupinu životinja koje su pretrpjele moždani udar i u koje su transplantirane živčane matične stanice (Slika 8.).



Slika 8. Relativna razina ekspresije gena *Ripk3* u ipsilateralnoj (lijevoj, LH) i kontralateralnoj (desnoj, DH) hemisferi. Uključene grupe: zdravi miševi [H, engl. *Healthy*], miševi zahvaćeni moždani udarom [S, engl. *Stroke*], miševi zahvaćeni moždanim udarom u čiji su striatum transplantirane živčane matične stanice [S+C, engl. *Stroke + Cells*] te miševi zahvaćeni moždanim udarom u čiji je striatum injiciran medij koji potiče proliferaciju te koji služi za uzgoj živčanih matičnih stanica [S+M, engl. *Stroke + Medium*]. Razine mRNA svakog gena pokazane su kao postotak beta-aktina (endogene kontrole). Razlike među grupama smatrane su značajnima uz  $P < 0,05$  (\*);  $P < 0,01$  (\*\*) i  $P < 0,001$  (\*\*\*)

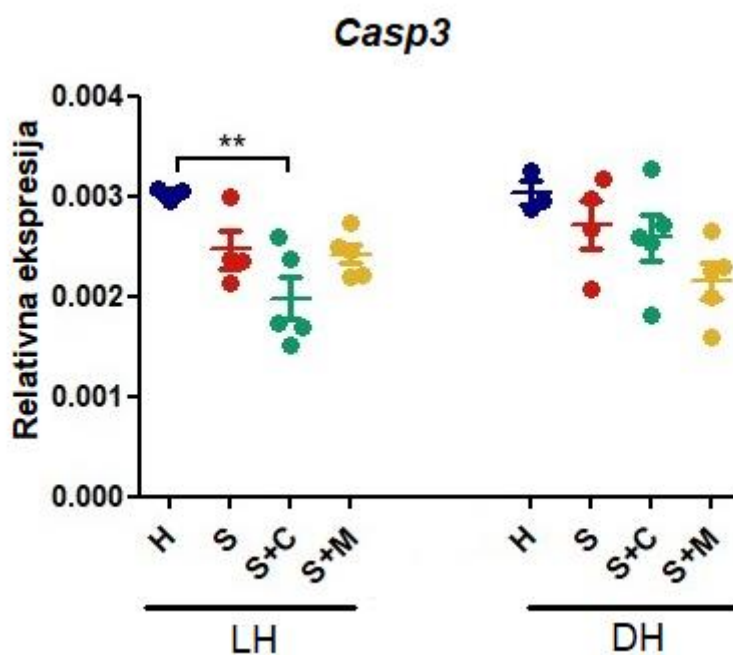


**Slika 9. Relativna razina ekspresije gena *Mki* u ipsilateralnoj (lijevoj, LH) i kontralateralnoj (desnoj, DH) hemisferi.** Uključene grupe: zdravi miševi [H, engl. *Healthy*], miševi zahvaćeni moždani udarom [S, engl. *Stroke*], miševi zahvaćeni moždanim udarom u čiji su striatum transplantirane živčane matične stanice [S+C, engl. *Stroke + Cells*] te miševi zahvaćeni moždanim udarom u čiji je striatum injiciran medij koji potiče proliferaciju te koji služi za uzgoj živčanih matičnih stanica [S+M, engl. *Stroke + Medium*]. Razine mRNA svakog gena pokazane su kao postotak beta-aktina (endogene kontrole). Razlike među grupama smatrane su značajnima uz  $P < 0,05$  (\*);  $P < 0,01$  (\*\*) i  $P < 0.001$  (\*\*\*).

## Ekspresijski obrazac gena uključenog u apoptozu (*Casp3*)

Transplantacija živčanih matičnih stanica nakon moždanog udara značajno je smanjila ekspresiju gena *Casp3* u odnosu na zdravu kontrolu

Iako je na prvi pogled u ipsilateralnoj hemisferi ekspresija gena *Casp3* niža u tri grupe uspoređujući sa zdravom kontrolom, statistički značajna razlika postoji samo uspoređujući zdravu kontrolu sa skupinom koja je pretrpjela moždani udar i u koju su transplantirane živčane matične stanice (Slika 10.). U kontralateralnoj hemisferi nema statistički značajne razlike među grupama.



**Slika 10.** Relativna razina ekspresije gena *Casp3* u ipsilateralnoj (lijevoj, LH) i kontralateralnoj (desnoj, DH) hemisferi. Uključene grupe: zdravi miševi [H, engl. *Healthy*], miševi zahvaćeni moždani udarom [S, engl. *Stroke*], miševi zahvaćeni moždanim udarom u čiji su striatum transplantirane živčane matične stanice [S+C, engl. *Stroke + Cells*] te miševi zahvaćeni moždanim udarom u čiji je striatum injiciran medij koji potiče proliferaciju te koji služi za uzgoj živčanih matičnih stanica [S+M, engl. *Stroke + Medium*]. Razine mRNA svakog gena pokazane su kao postotak beta-aktina (endogene kontrole). Razlike među grupama smatrane su značajnima uz  $P < 0,05$  (\*);  $P < 0,01$  (\*\*) i  $P < 0.001$  (\*\*\*).

## 5. RASPRAVA

U ovom radu analizirana je ekspresija gena uključenih u puteve programirane stanične smrti: staničnu smrt posredovanu proteinom AIF (*Aifm1*), nekroptozu (*Ripk1*, *Ripk3*, *Mlkl*) i apoptozu (*Casp3*), za koje je pokazano da imaju važnu ulogu u patologiji nakon ishemijskog moždanog udara (14–16). Očekivano, 15 dana nakon ishemijskog moždanog udara, ekspresija većine analiziranih gena (*Aifm1*, *Ripk1*, *Ripk3*, *Mlkl*), uključenih u propagaciju programirane stanične smrti je bila povećana u hemisferi zahvaćenoj moždanim udarom. S druge strane, značajna promjena ekspresije istraživanih gena nakon ishemijskog moždanog udara, nije zabilježena i u kontralateralnoj hemisferi.

Drugo pitanje na koje smo željeli odgovoriti ovim istraživanjem je potencijalni utjecaj transplantacije živčanih matičnih stanica na regeneraciju tkiva nakon ishemijskog moždanog udara. Kako se svakim danom usavršavaju protokoli za izolaciju i kultivaciju matičnih stanica iz različitih izvora, njihova transplantacija postala je jedan od najkorištenijih pristupa u istraživanju regeneracije mozga. Iako su neka istraživanja opisala mehanizme odgovorne za pozitivan efekt transplantacije matičnih stanica, uključujući utjecaj na transplantirane stanice (31,32), većina istraživanja navodi kako se pozitivan utjecaj očituje u smanjenju volumena tkiva zahvaćenog oštećenjem te ubrzanom funkcionalnom oporavku (33,34). Ipak, mehanizmi koji su u pozadini tih efekata su ostali nerazjašnjeni. Većina istraživanja koja se bavila analizom stanične smrti u moždanom tkivu nakon transplantacije matičnih stanica, fokusirala se uglavnom na klasični put apoptoze (35–37).

Kako se protein AIF (engl., *Apoptosis inducing factor*) pokazao kao jedna od ključnih molekula u staničnoj smrti nakon ishemijskog moždanog udara, analizirana je ekspresija gena *Aifm1* koji kodira za navedeni protein. AIF se povezuje sa toksičnošću uzrokovanom glutatomom. Naime, glutamat, čija je koncentracija u izvanstaničnom prostoru povećana nakon moždanog udara, ali i u mnogim drugim neurološkim oboljenjima, veže se na NMDA receptore, koji su ujedno i ionski kanali, te se otvaraju i kroz njih u stanicu ulaze  $Ca^{2+}$  ioni što uzrokuje tzv. ekscitotoksičnost. Uz to, glutamat može inhibirati cistein-glutamat antiporter ( $Xc^-$ ) te time smanjuje razinu unutarstaničnog glutationa što dovodi do oksidativne toksičnosti koja se u literaturi još naziva i oksitoza. Ekscitotoksičnost i oksitoza uzrokuju oslobađanje proteina AIF iz vanjske membrane mitohondrija te njegovu translokaciju u jezgru što dovodi do stanične smrti. Čini se kako je gen koji kodira za protein AIF jedan od gena za generalnu

kontrolu programirane stanične smrti jer njegova razina ekspresije može biti smanjena, što dovodi do povećanog preživljenja stanica koje je zabilježeno u nekim ljudskim tumorima (14), ili njegova ekspresija može biti povećana nakon hipoksije što smo ovdje pokazali. Naši rezultati koji pokazuju da je razina ekspresije gena *Aifm1* u ipsilateralnoj hemisferi nakon moždanog udara povećana, dok transplantacija živčanih stanica značajno smanjuje njegovu ekspresiju, ukazuju na protektivan efekt transplantacije živčanih matičnih stanica koji se očituje i u smanjenju ekspresije gena *Casp3* u odnosu na zdravu kontrolu. Međutim, neobičan nalaz koji treba dodatno istražiti je značajno povećanje ekspresije gena *Aifm1* uzrokovano injekcijom samog medija nakon ishemijskog moždanog udara.

Odabravši 15. dan nakon indukcije ishemijskog moždanog udara za analizu rezultata, ciljan je period prijelaza iz sub-akutne u kroničnu fazu moždanog udara koji uključuje procese regeneracije, ali i uklanjanja oštećenog tkiva. Prema tome, moramo si postaviti pitanje: je li razlog povećanja ili smanjenja ekspresije određenog gena posljedica patološkog stanja, tj., je li ona negativna, ili je upravo suprotno, promjena ekspresije određenog gena posljedica procesa regeneracije? Uzimajući u obzir prirodnu ulogu i mogućnosti matičnih stanica, pretpostavljamo da promjene ekspresije gena nakon transplantacije živčanih matičnih stanica ukazuju na prisutnost procesa važnih za regeneraciju tkiva što je pokazano brojnim publikacijama (33,34,38). Uzimajući to u obzir, zanimljivi su obrasci ekspresije gena, u ipsilateralnoj hemisferi, uključenih u put nekroptoze: *Ripk1*, *Ripk3*, *Mkl1*. Dok transplantacija živčanih matičnih stanica i injekcija samog medija smanjuju ekspresiju gena *Ripk1*, opaženi efekt za gene *Ripk3* i *Mkl1* je drukčiji. Naime, injekcija medija smanjuje ekspresiju gena *Ripk3* i *Mkl1*, dok s druge strane, transplantacija živčanih matičnih stanica podržava visoku ekspresiju tih dvaju gena. Prijašnji radovi pokazali su da administracija molekula koje inhibiraju pojedine komponente nekroptičkog puta, djeluje protektivno u slučaju ishemijskog moždanog udara. Naime, Degterev i sur. pokazali su da administracija nekrostatina-1, male molekule koja inhibira RIPK1 (39), netom prije ili netom nakon indukcije moždanog udara u miša, smanjuje volumen oštećenog tkiva nakon 2, 4 i 6 sati (40). Zhou i sur. pokazali da administracija Nekrosulfonamida (NSA), molekule koja potiče degradaciju proteina MLKL, 4h nakon indukcije moždanog udara smanjuje volumen oštećenog tkiva dok administracija nakon 6h nema neuroprotektivan efekt što upućuje na ograničeni vremenski okvir djelovanja navedene molekule (41). S druge strane, zanimljivo je kako RIPK3 deficijentni miševi nisu imali manje

lezije u usporedbi s divljim tipom istog soja 24 h nakon ishemijskog moždanog udara (42). Iako je nedvojbeno pokazano da RIPK1, RIPK3 i MLKL sudjeluju u putu programirane stanične smrti nazvanom nekroptozu te se blokiranje nekih komponenti tog puta u ranim fazama ili neposredno prije moždanog udara u pretkliničkim studijama pokazalo protektivnim, nedavna istraživanja pokazala su kako RIPK3 i MLKL sudjeluju u drugim procesima nevezanim uz staničnu smrt. Naime, Yoon i sur. pokazali su da MLKL regulira endosomalni transport dok RIPK3 potiče oslobađanje vezikula, što zajedno zadržava staničnu smrt (43). S druge strane, Zargarian i sur. pokazali su da se MLKL nalazi u takozvanim nekroptotičkim tjelešcima (engl., *necroptotic bodies*) koja mogu biti fagocitirana (44), čime se sprječava istjecanje staničnog sadržaja u izvanstanični prostor, a time i upala. Prema tome, čini se da povećana ekspresija *Ripk3* i *Mkl* ne mora nužno biti štetna kako se prije mislilo. Moguće je da je u ranim fazama ishemijskog moždanog udara aktivan put nekroptoze s nekrotičkom morfologijom stanične smrti koji potiče upalu, a u kasnijim fazama RIPK3 i MLKL možda su uključeni u druge procese koji su bitni u odstranjivanju oštećenih stanica te regeneraciji tkiva. Međutim, potrebna su istraživanja koja bi potvrdila navedenu hipotezu.

Iako u kontralateralnoj hemisferi nakon moždanog udara nije zabilježena promijenjena ekspresija istraživanih gena, za neke gene promjene su zabilježene nakon transplantacije/injeksijske živčanih matičnih stanica i/ili samog medija, a zanimljivo je kako su te promjene slične onima zabilježenim i u ipsilateralnoj hemisferi. Naime, zabilježeno je značajno povećanje ekspresije gena *Aifm1* uzrokovano injekcijom samog medija nakon ishemijskog moždanog udara, dok je transplantacija živčanih matičnih stanica nakon ishemijskog moždanog udara uzrokovala značajno smanjenje ekspresije u usporedbi s ostalim grupama. Nadalje, injekcija medija nakon moždanog udara smanjila je ekspresiju gena *Ripk3* i *Mkl*: u slučaju *Ripk3* samo u usporedbi sa skupinom u koju su transplantirane živčane matične stanice, a u slučaju *Mkl* u usporedbi sa sve tri preostale skupine.

U ovom istraživanju, analizirana je ekspresija gena u cijeloj hemisferi što predstavlja ograničenje jer ne možemo reći u kojem staničnom tipu ili regiji mozga dolazi do najznačajnije promjene u ekspresiji određenog gena. Iako je uspoređujući neke grupe za pojedine gene razina ekspresije otprilike jednaka, npr. transplantacija živčanih matičnih stanica i samog medija smanjuju ekspresiju *Ripk1* na otprilike jednaku razinu, ne može se isključiti mogućnost postojanja razlika u pojedinim regijama mozga ili vrstama stanica, a one nisu uočljive upravo

zbog toga jer je analiza ekspresije gena rađena na cijeloj hemisferi. Drugo ograničenje ovog istraživanja je činjenica da je analiza rađena na razini mRNA što znači da ne možemo sa sigurnošću reći da su promjene u razini mRNA praćene promjenama na proteinskoj razini. Prema tome, potrebno je napraviti dodatna istraživanja kako bi se utvrdilo u kojoj regiji mozga, tj., u kojoj vrsti stanica dolazi do značajne promjene ekspresije istraživanih gena te je li promjena razine ekspresije mRNA praćena i promjenom razine odgovarajućeg proteina.



## 6. ZAKLJUČAK

Ovim istraživanjem pokazano je kako je ekspresija gena *Aifm1*, *Ripk1*, *Ripk3* i *Mkl1*, povećana u ipsilateralnoj hemisferi 15 dana nakon indukcije moždanog udara u miševa. Pozitivan utjecaj transplantacije živčanih matičnih stanica očituje se u smanjenju ekspresije gena *Aifm1*, koja se spušta na razinu sličnu zabilježenoj u zdravoj kontroli, te u smanjenju ekspresije gena *Casp3*, što upućuje na smanjenje programirane stanične smrti nakon transplantacije. Transplantacija živčanih matičnih stanica i injekcija samog medija koji je služio za uzgoj stanica, smanjila je ekspresiju gena *Ripk1*, što upućuje na to da i samo medij obogaćen faktorima rasta može imati pozitivan utjecaj na smanjenje nekroptoze. Injekcija medija smanjila je ekspresiju gena *Ripk3* i *Mkl1*, dok je transplantacija živčanih matičnih stanica održala ekspresiju navedenih gena na visokoj razini. Ipak, nedavno objavljeni radovi pokazali su da protein MLKL sudjeluje u stvaranju vezikula, dok RIPK3 potiče njihovo oslobađanje, te da se MLKL može naći i u vezikulama koje se mogu fagocitirati. Stoga zaključujemo kako RIPK3 i MLKL ne moraju nužno sudjelovati samo u staničnoj smrti nekrotičke morfologije, te pretpostavljamo kako je održanje visoke ekspresije gena *Ripk3* i *Mkl1* nakon transplantacije živčanih matičnih stanica jedan od mehanizama uključenih u regeneraciju tkiva. Iduće studije će pokazati u kojim točno regijama ili stanicama dolazi do promjene u ekspresiji promatranih gena, jesu li te promjene praćene i na proteinskoj razini, te jesu li RIPK3 i MLKL u tranziciji iz sub-akutne u kroničnu fazu moždanog udara važni za regeneraciju tkiva.

## 7. LITERATURA

- 1.Y. Béjot, H. Bailly, J. Durier i M. Giroud, Epidemiology of stroke in Europe and trends for the 21st century, *Presse Med.* **45** (2016) e391–e398.; DOI:10.1016/J.LPM.2016.10.003
- 2.T. Truelsen, B. Piechowski-Jozwiak, R. Bonita, C. Mathers, J. Bogousslavsky i G. Boysen, Stroke incidence and prevalence in Europe: a review of available data, *Eur. J. Neurol.* **13** (2006) 581–598.; DOI:10.1111/j.1468-1331.2006.01138.x
- 3.M. Paciaroni, V. Caso i G. Agnelli, The concept of ischemic penumbra in acute stroke and therapeutic opportunities., *Eur. Neurol.* **61** (2009) 321–30.; DOI:10.1159/000210544
- 4.I. Dela Peña, C. Borlongan, G. Shen i W. Davis, Strategies to Extend Thrombolytic Time Window for Ischemic Stroke Treatment: An Unmet Clinical Need., *J. stroke* **19** (2017) 50–60.; DOI:10.5853/jos.2016.01515
- 5.R. Hass, C. Kasper, S. Böhm i R. Jacobs, Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC., *Cell Commun. Signal.* **9** (2011) 12.; DOI:10.1186/1478-811X-9-12
- 6.K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda i S. Yamanaka, Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors, *Cell* **131** (2007) 861–872.; DOI:10.1016/j.cell.2007.11.019
- 7.H. E. Marei, A. Hasan, R. Rizzi, A. Althani, N. Afifi, C. Cenciarelli, T. Caceci i A. Shuaib, Potential of Stem Cell-Based Therapy for Ischemic Stroke., *Front. Neurol.* **9** (2018) 34.; DOI:10.3389/fneur.2018.00034
- 8.D. Kalladka, J. Sinden, K. Pollock, C. Haig, J. McLean, W. Smith, A. McConnachie, C. Santosh, P. M. Bath, L. Dunn i K. W. Muir, Human neural stem cells in patients with chronic ischaemic stroke (PISCES): a phase 1, first-in-man study, *Lancet* **388** (2016) 787–796.; DOI:10.1016/S0140-6736(16)30513-X
- 9.L. Chen, G. Zhang, A. A. Khan, X. Guo i Y. Gu, Clinical Efficacy and Meta-Analysis of Stem Cell Therapies for Patients with Brain Ischemia., *Stem Cells Int.* **2016** (2016) 6129579.; DOI:10.1155/2016/6129579
- 10.D. Hanahan i R. A. Weinberg, Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell* **144** (2011) 646–674.; DOI:10.1016/j.cell.2011.02.013
- 11.G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nuñez, M. E. Peter, J. Tschopp, i sur., Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009., *Cell Death Differ.* **16** (2009) 3–11.; DOI:10.1038/cdd.2008.150
- 12.T. Vanden Berghe, A. Linkermann, S. Jouan-Lanhouet, H. Walczak i P. Vandenabeele, Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15** (2014) 135–147.; DOI:10.1038/nrm3737
- 13.Y. Tsujimoto i S. Shimizu, Another way to die: autophagic programmed cell death, *Cell Death Differ.* **12** (2005) 1528–1534.; DOI:10.1038/sj.cdd.4401777
- 14.I. F. Sevrioukova, Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation., *Antioxid. Redox Signal.* **14** (2011) 2545–79.; DOI:10.1089/ars.2010.3445
- 15.C. Liu, K. Zhang, H. Shen, X. Yao, Q. Sun i G. Chen, Necroptosis: A novel manner of cell death,

- associated with stroke (Review), *Int. J. Mol. Med.* **41** (2017) 624–630.; DOI:10.3892/ijmm.2017.3279
- 16.Y. Gao, W. Liang, X. Hu, W. Zhang, R. A. Stetler, P. Vosler, G. Cao i J. Chen, Neuroprotection against hypoxic-ischemic brain injury by inhibiting the apoptotic protease activating factor-1 pathway., *Stroke* **41** (2010) 166–72.; DOI:10.1161/STROKEAHA.109.561852
- 17.S. Nagata, Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells, *Annu. Rev. Immunol* **36** (2018) 1–18.; DOI:10.1146/annurev-immunol
- 18.C. Loreto, G. La Rocca, R. Anzalone, R. Caltabiano, G. Vespasiani, S. Castorina, D. J. Ralph, S. Cellek, G. Musumeci, S. Giunta, R. DjinoVIC, D. Basic i S. Sansalone, The role of intrinsic pathway in apoptosis activation and progression in Peyronie’s disease., *Biomed Res. Int.* **2014** (2014) 616149.; DOI:10.1155/2014/616149
- 19.S. A. Susin, H. K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B. E. Snow, G. M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D. R. Goodlett, R. Aebersold, D. P. Siderovski, J. M. Penninger i G. Kroemer, Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor, *Nature* **397** (1999) 441–446.; DOI:10.1038/17135
- 20.S.-W. Yu, S. A. Andrabi, H. Wang, N. S. Kim, G. G. Poirier, T. M. Dawson i V. L. Dawson, Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103** (2006) 18314–9.; DOI:10.1073/pnas.0606528103
- 21.J. Lewerenz, S. J. Hewett, Y. Huang, M. Lambros, P. W. Gout, P. W. Kalivas, A. Massie, I. Smolders, A. Methner, M. Pergande, S. B. Smith, V. Ganapathy i P. Maher, The cystine/glutamate antiporter system x(c)(-) in health and disease: from molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities., *Antioxid. Redox Signal.* **18** (2013) 522–55.; DOI:10.1089/ars.2011.4391
- 22.X. Yang, J. Cheng, Y. Gao, J. Ding i X. Ni, Downregulation of Iduna is associated with AIF nuclear translocation in neonatal brain after hypoxia-ischemia., *Neuroscience* **346** (2017) 74–80.; DOI:10.1016/j.neuroscience.2017.01.010
- 23.N. Doti, C. Reuther, P. L. Scognamiglio, A. M. Dolga, N. Plesnila, M. Ruvo i C. Culmsee, Inhibition of the AIF/CypA complex protects against intrinsic death pathways induced by oxidative stress, *Cell Death Dis.* **5** (2014) e993–e993.; DOI:10.1038/cddis.2013.518
- 24.Y. Wang, R. An, G. K. Umanah, H. Park, K. Nambiar, S. M. Eacker, B. Kim, L. Bao, M. M. Harraz, C. Chang, R. Chen, J. E. Wang, T.-I. Kam, J. S. Jeong, Z. Xie, S. Neifert, J. Qian, S. A. Andrabi, i sur., A nuclease that mediates cell death induced by DNA damage and poly(ADP-ribose) polymerase-1., *Science* **354** (2016).; DOI:10.1126/science.aad6872
- 25.L. Galluzzi, O. Kepp, F. K.-M. Chan i G. Kroemer, Necroptosis: Mechanisms and Relevance to Disease., *Annu. Rev. Pathol.* **12** (2017) 103–130.; DOI:10.1146/annurev-pathol-052016-100247
- 26.J. Li, T. McQuade, A. B. Siemer, J. Napetschnig, K. Moriwaki, Y.-S. Hsiao, E. Damko, D. Moquin, T. Walz, A. McDermott, F. K.-M. Chan i H. Wu, The RIP1/RIP3 Necrosome Forms a Functional Amyloid Signaling Complex Required for Programmed Necrosis, *Cell* **150** (2012) 339–350.; DOI:10.1016/j.cell.2012.06.019
- 27.B. Xia, S. Fang, X. Chen, H. Hu, P. Chen, H. Wang i Z. Gao, MLKL forms cation channels, *Cell Res.* **26** (2016) 517–528.; DOI:10.1038/cr.2016.26
- 28.T. Vanden Berghe, W. J. Kaiser, M. J. Bertrand i P. Vandenabeele, Molecular crosstalk between apoptosis, necroptosis, and survival signaling, *Mol. Cell. Oncol.* **2** (2015) e975093.; DOI:10.4161/23723556.2014.975093

- 29.D. Mitrečić, S. Mavrić, B. V. Branica i S. Gajović, Mice Genotyping Using Buccal Swab Samples: An Improved Method, *Biochem. Genet.* **46** (2008) 105–112.; DOI:10.1007/s10528-007-9133-7
- 30.I. Alić, N. Kosi, K. Kapuralin, D. Gorup, S. Gajović, R. Pochet i D. Mitrečić, Neural stem cells from mouse strain Thy1 YFP-16 are a valuable tool to monitor and evaluate neuronal differentiation and morphology, *Neurosci. Lett.* **634** (2016) 32–41.; DOI:10.1016/j.neulet.2016.10.001
- 31.C. Nicaise, D. Mitrečić i R. Pochet, Brain and spinal cord affected by amyotrophic lateral sclerosis induce differential growth factors expression in rat mesenchymal and neural stem cells, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **37** (2011) 179–188.; DOI:10.1111/j.1365-2990.2010.01124.x
- 32.N. Kosi, I. Alić, I. Salamon i D. Mitrečić, Stroke promotes survival of nearby transplanted neural stem cells by decreasing their activation of caspase 3 while not affecting their differentiation, *Neurosci. Lett.* **666** (2018) 111–119.; DOI:10.1016/j.neulet.2017.12.040
- 33.C. T. van Velthoven, M. Dzierżko, M. F. Wendland, N. Derugin, J. Faustino, C. J. Heijnen, D. M. Ferriero i Z. S. Vexler, Mesenchymal stem cells attenuate MRI-identifiable injury, protect white matter, and improve long-term functional outcomes after neonatal focal stroke in rats, *J. Neurosci. Res.* **95** (2017) 1225–1236.; DOI:10.1002/jnr.23954
- 34.K. Zhao, R. Li, C. Gu, L. Liu, Y. Jia, X. Guo, W. Zhang, C. Pei, L. Tian, B. Li, J. Jia, H. Cheng, H. Xu i L. Li, Intravenous Administration of Adipose-Derived Stem Cell Protein Extracts Improves Neurological Deficits in a Rat Model of Stroke, *Stem Cells Int.* **2017** (2017) 1–11.; DOI:10.1155/2017/2153629
- 35.B. Chelluboina, J. D. Klopfenstein, D. M. Pinson, D. Z. Wang i K. K. Veeravalli, Stem Cell Treatment After Cerebral Ischemia Regulates the Gene Expression of Apoptotic Molecules, *Neurochem. Res.* **39** (2014) 1511–1521.; DOI:10.1007/s11064-014-1341-z
- 36.J. Qin, X. Ma, H. Qi, B. Song, Y. Wang, X. Wen, Q. M. Wang, S. Sun, Y. Li, R. Zhang, X. Liu, H. Hou, G. Gong i Y. Xu, Transplantation of Induced Pluripotent Stem Cells Alleviates Cerebral Inflammation and Neural Damage in Hemorrhagic Stroke, (T. V. Arumugam, Ed.) *PLoS One* **10** (2015) e0129881.; DOI:10.1371/journal.pone.0129881
- 37.C.-C. Shen, C.-H. Lin, Y.-C. Yang, M.-T. Chiao, W.-Y. Cheng i J.-L. Ko, Intravenous implanted neural stem cells migrate to injury site, reduce infarct volume, and improve behavior after cerebral ischemia., *Curr. Neurovasc. Res.* **7** (2010) 167–79.; Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20560882>
- 38.G. K. Steinberg, D. Kondziolka, L. R. Wechsler, L. D. Lunsford, M. L. Coburn, J. B. Billigen, A. S. Kim, J. N. Johnson, D. Bates, B. King, C. Case, M. McGrogan, E. W. Yankee i N. E. Schwartz, Clinical Outcomes of Transplanted Modified Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Stroke: A Phase 1/2a Study., *Stroke* **47** (2016) 1817–24.; DOI:10.1161/STROKEAHA.116.012995
- 39.A. Degterev, J. Hitomi, M. Germscheid, I. L. Ch'en, O. Korkina, X. Teng, D. Abbott, G. D. Cuny, C. Yuan, G. Wagner, S. M. Hedrick, S. A. Gerber, A. Lugovskoy i J. Yuan, Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins, *Nat. Chem. Biol.* **4** (2008) 313–321.; DOI:10.1038/nchembio.83
- 40.A. Degterev, Z. Huang, M. Boyce, Y. Li, P. Jagtap, N. Mizushima, G. D. Cuny, T. J. Mitchison, M. A. Moskowitz i J. Yuan, Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury, *Nat. Chem. Biol.* **1** (2005) 112–119.; DOI:10.1038/nchembio711
- 41.Y. Zhou, B. Zhou, H. Tu, Y. Tang, C. Xu, Y. Chen, Z. Zhao i Z. Miao, The degradation of mixed lineage kinase domain-like protein promotes neuroprotection after ischemic brain injury., *Oncotarget* **8** (2017) 68393–68401.; DOI:10.18632/oncotarget.19416

42. K. Newton, D. L. Dugger, A. Maltzman, J. M. Greve, M. Hedehus, B. Martin-McNulty, R. A. D. Carano, T. C. Cao, N. van Bruggen, L. Bernstein, W. P. Lee, X. Wu, J. DeVoss, J. Zhang, S. Jeet, I. Peng, B. S. McKenzie, M. Roose-Girma, i sur., RIPK3 deficiency or catalytically inactive RIPK1 provides greater benefit than MLKL deficiency in mouse models of inflammation and tissue injury., *Cell Death Differ.* **23** (2016) 1565–76.; DOI:10.1038/cdd.2016.46
43. S. Yoon, A. Kovalenko, K. Bogdanov i D. Wallach, MLKL, the Protein that Mediates Necroptosis, Also Regulates Endosomal Trafficking and Extracellular Vesicle Generation, *Immunity* **47** (2017) 51–65.e7.; DOI:10.1016/j.immuni.2017.06.001
44. S. Zargarian, I. Shlomovitz, Z. Erlich, A. Hourizadeh, Y. Ofir-Birin, B. A. Croker, N. Regev-Rudzki, L. Edry-Botzer i M. Gerlic, Phosphatidylserine externalization, “necroptotic bodies” release, and phagocytosis during necroptosis, (H. Walczak, Ed.) *PLOS Biol.* **15** (2017) e2002711.; DOI:10.1371/journal.pbio.2002711

Web: <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html>

## 8. ŽIVOTOPIS

### Curriculum Vitae

#### Osobne informacije

Ime i prezime

**Valentina Hribljan**

Datum rođenja

14.05.1994

#### Radno iskustvo

Srpanj 2017.-Svibanj 2018.

Laboratorij za matične stanice, Hrvatski institut za istraživanje mozga, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet

Istraživački projekt: Utjecaj ishemije I hipoksije na proliferaciju, diferencijaciju i preživljenje živčanih matičnih stanica

#### Obrazovanje

2012-2016

Gimnazija Karlovac

Sudjelovanje na natjecanjima iz biologije od kojih je najznačajniji rezultat 3. mjesto na državnom natjecanju (2. razred)

2013-2016

Preddiplomski studij biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2016-2018

Diplomski studij molekularne biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

#### Laboratorijske metode

Izolacija, kultivacija i manipulacija sa živčanim matičnim stanicama,  
Izolacija RNA iz staničnih kultura  
qRT-PCR

#### Materinski jezik

Hrvatski

#### Poznavanje ostalih jezika

Engleski (vrlo dobro)

Njemački (osnovno)

Slovenski (dobro)

Španjolski (osnovno)

#### Ostale aktivnosti

Ronilac s jednom zvjezdicom (CMAS)

Član BIOM-a od 2016., član BIUS-a od 2015.

#### Vozačka dozvola

Kategorija B