

Utjecaj manoze i galaktoze na ekspresiju gena, kinetiku i proliferaciju mioblasta kod pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom

Ćužić, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2025

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:217:745783>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-17**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Lucija Čužić

**Utjecaj manoze i galaktoze na ekspresiju
gena, kinetiku i proliferaciju mioblasta od
pacijenata s kongenitalnom mišićnom
distrofijom**

Diplomski rad

Zagreb, 2025.

Ovaj rad je izrađen na Odjelu banka tkiva i stanica Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice pod mentorstvom doc. dr. sc. Marije Zekušić, mag. biol. mol., te komentorstvom prof. dr. sc. Inge Urlić, mag. biol. mol. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Iskreno i od srca zahvaljujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Mariji Zekušić, mag. biol. mol., na stručnom vodstvu, strpljenju i podršci tijekom izrade ovog diplomskog rada. Vaše savjete i ohrabrenje u stresnim trenucima cijenim neizmjereno i bez vaše pomoći ovaj uspjeh ne bi bio moguć.

Posebnu zahvalu upućujem i komentorici prof. dr. sc. Ingi Urlić, mag. biol. mol., na ljubaznosti te savjetima i suradnji koja je doprinijela kvaliteti ovog rada.

Zahvaljujem se i Maji Ledinski, mag. biol. mol. koja je bila podrška kroz proces izrade ovog rada. Vaše strpljenje i praktična pomoć olakšali su cijeli proces.

Zahvaljujem i svojim prijateljima koji su me podržavali kroz sve faze studiranja. Hvala vam na razumijevanju i motivaciji, ali i na trenucima opuštanja kad sam ih najviše trebala.

Topla zahvala mojim roditeljima i ostatku obitelji, na neizmjenoj ljubavi, podršci i vjeri u mene. Vaša prisutnost i ohrabrenje činili su proces studiranja lakšim.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj manoze i galaktoze na ekspresiju gena, kinetiku i proliferaciju mioblasta od pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom

Lucija Čužić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Distroglikanopatija je tip kongenitalne mišićne distrofije uzrokovan gubitkom funkcije α -distroglikana zbog nepravilne glikozilacije. Jedan od podtipova ove bolesti povezan je s mutacijama u genu za enzim POMT2, ključnom za prijenos manoze na glikanski lanac α -distroglikana. Prijašnja istraživanja pokazala su kako terapija određenim monosaharidima može obnoviti glikozilaciju kod nekih tipova distroglikanopatija. Ovo istraživanje fokusiralo se na učinke manoze i galaktoze na ekspresiju gena, kinetiku i proliferaciju mioblasta izoliranih iz pacijenata s mutacijama u genu *POMT2*. Cilj istraživanja bio je na staničnoj kulturi mioblasta izoliranih iz pacijenata s i bez mišićne distrofije provjeriti ima li tretman manozom i galaktozom utjecaj na poboljšanje genske ekspresije α -distroglikana i smanjenje upalnog procesa mišićnih vlakana te kinetiku, proliferaciju i vijabilnost mioblasta. Rezultati pokazuju kako su morfološke karakteristike mioblasta od pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom te obrasci ekspresije gena u njima značajno različite u usporedbi s kontrolnim mioblastima. Tretmani manozom i galaktozom nisu doveli do značajnih promjena u ekspresiji gena. Praćenjem kinetike i proliferacije mioblasta metodom fazno holografske mikroskopije utvrđen je smanjen proliferacijski kapacitet i veća brzina kretanja mioblasta od pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom u odnosu na kontrolne mioblaste, a tretmani šećerima djelomično su modificirali ovaj učinak. Ovo istraživanje pruža uvide u kompleksnu prirodu distroglikanopatija i potencijal monosaharida u budućim terapijskim pristupima. Ključne riječi: šećer, POMT2, miotube, oksidacijski stres, distroglikan

(60 stranica, 26 slika, 7 tablica, 88 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: doc. dr. sc. Marija Zekušić, mag. biol. mol.

Komentor: prof. dr. sc. Inga Urlić, mag. biol. mol.

Ocjenitelji:

prof. dr. sc. Inga Urlić

prof. dr. sc. Petra Korać

izv. prof. dr. sc. Tomislav Ivanković

Rad prihvaćen: 6. veljače 2025.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Effect of mannose and galactose on myoblast gene expression, kinetics and proliferation in congenital muscular dystrophy patients

Lucija Čužić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Dystroglycanopathy is a type of congenital muscular dystrophy caused by the loss of function of α -dystroglycan due to impaired glycosylation. One subtype of this disease is linked to mutations in the *POMT2* enzyme, which plays a crucial role in transferring mannose onto the glycan chain of α -dystroglycan. Previous studies have shown that monosaccharide-based therapies can restore glycosylation in certain types of dystroglycanopathies. This study evaluates effects of mannose and galactose on gene expression, kinetics, and proliferation of myoblasts derived from patients with *POMT2* mutations. The aim of this research is to examine whether treatment with mannose and galactose can enhance α -dystroglycan gene expression, reduce inflammation in muscle fibers, and improve the kinetics, proliferation, and viability of myoblasts in cell cultures from patients with and without muscular dystrophy. The results revealed significant morphological differences and altered gene expression patterns in myoblasts from patients with congenital muscular dystrophy compared to controls. Treatment with mannose and galactose did not significantly affect gene expression. Digital holographic microscopy analysis of cell kinetics and proliferation demonstrated reduced proliferation rates and increased cell motility in congenital muscular dystrophy derived myoblasts, with monosaccharide treatments partially modifying this effect. This research offers insights into the complex nature of dystroglycanopathies and highlights the potential role of monosaccharides in future therapeutic approaches.

Keywords: Sugar, *POMT2*, myotubes, oxidative stress, dystroglycan
(60 pages, 26 figures, 7 tables, 88 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Asst. Prof. Marija Zekušić, PhD

Co-mentor: Prof. Inga Urlić, PhD

Reviewers:

Prof. Inga Urlić, PhD

Prof. Petra Korać, PhD

Assoc. Prof. Tomislav Ivanković, PhD

Thesis accepted: 6th February, 2025.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Građa skeletnog mišića	1
1.2. Miogeneza	2
1.3. Proteinski kompleks na sarkolemi	3
1.4. Mišićna distrofija	4
1.5. Glikozilacija α -distroglikana	5
1.6. Patologija distroglikanopatije	7
1.6.1. Oksidacijski stres	9
1.6.2. Sustavi antioksidacijske zaštite	10
1.7. Dijetalna terapija šećerima	11
2. CILJEVI	13
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. Odmrzavanje stanica i uspostavljanje stanične kulture	15
3.2. Priprema tretmana manoze i galaktoze u mediju SMCGM	15
3.3. Određivanje vijabilnosti mioblasta	16
3.4. Zamrzavanje mioblasta u tekući dušik	17
3.5. Fazna holografska mikroskopija na mioblastima	18
3.6. Analiza ekspresije gena	19
3.6.1. Izolacija RNA	19
3.6.2. Tretman DNazom i reverzna transkripcija	20
3.6.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR)	21
3.7. Statistička obrada podataka	23
4. REZULTATI	24
4.1. Morfološke karakteristike mioblasta	24
4.2. Stvaranje miotuba	28
4.3. Vrijeme udvostručenja populacije mioblasta	30
4.4. Vijabilnost	30
4.5. Proliferacija	31

4.6.	Pokretljivost	32
4.7.	Vizualizacija kinetike stanica.....	33
4.8.	Promjena ekspresije gena.....	37
4.8.1.	Analiza ekspresije gena <i>DAG1</i> i <i>POMT2</i>	37
4.8.2.	Analiza ekspresije gena <i>PPARGC1A</i> , <i>SOD1</i> i <i>CAT</i>	42
5.	RASPRAVA	44
5.1.	Morfologija mioblasta	44
5.2.	Stvaranje miotuba	45
5.3.	Vrijeme udvostručenja populacije mioblasta i proliferacija	45
5.4.	Vijabilnost	46
5.5.	Pokretljivost	46
5.6.	Kinetika mioblasta.....	47
5.7.	Analiza ekspresije gena <i>DAG1</i> i <i>POMT2</i>	47
5.8.	Analiza ekspresije gena <i>PPARGC1A</i> , <i>SOD1</i> i <i>CAT</i>	49
6.	ZAKLJUČCI	51
7.	LITERATURA	52
	Životopis:	60

POPIS OZNAKA I KRATICA

CAT-katalaza (engl. *Catalase*)

CDP-Rbo-citidin difosfat ribitol (engl. *Cytidine diphosphate ribitol*)

DAG1-distroglikan (engl. *Dystroglycan*)

DGC-distrofin glikoproteinski kompleks (engl. *Dystrophin glycoprotein complex*)

DMD-Duchenneova mišićna distrofija (engl. *Duchenne muscular dystrophy*)

FKRP-protein povezan s fukutinom (engl. *Fukutin-related protein*)

Gal-galaktoza

Man-manoza

NF- κ B-nuklearni transkripcijski faktor-kappa B (engl. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NO-dušikov monoksid

NOX2-NADPH okidaza 2 (engl. *NADPH oxidase 2*)

nNOS-neuronska sintaza dušikovog oksida (engl. *Neuronal nitric synthase*)

PGC-1 α -koaktivator 1 alfa receptora gama za aktivaciju proliferacije peroksisoma (engl. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*)

PPARGC1A-gen za PGC-1 α

POMT2-protein O-manozil-transferaza 2 (engl. *Protein O-mannosyltransferase 2*)

qPCR-lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *Real-time polymerase chain reaction*)

RNS-reaktivne vodikove vrste (engl. *Reactive nitrogen species*)

ROS-reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive oxygen species*)

SMCGM-medij za mioblaste (engl. *Skeletal Muscle Cell Growth Medium*)

SOD1-superoksid dismutaza

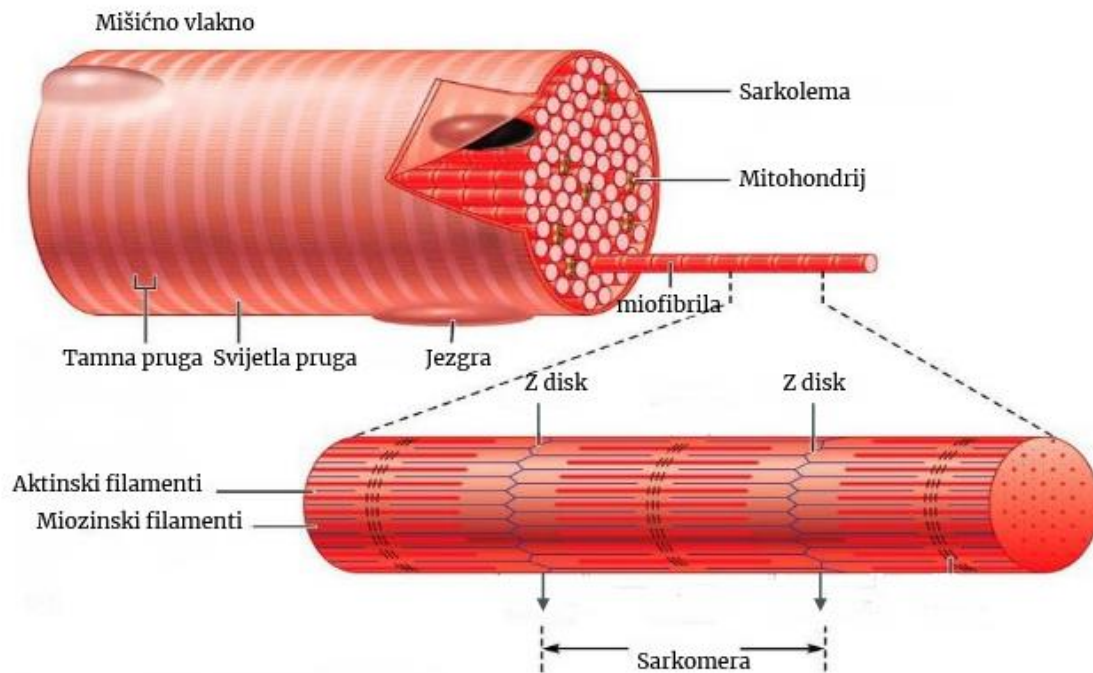
1. UVOD

1.1. Građa skeletnog mišića

Poprečno prugasti mišić ili skeletni mišić, tip je mišića koji je pod voljnom kontrolom somatskog živčanog sustava i vezan je uz skelet. Osnovna jedinica zrelog skeletnog mišića jest mišićno vlakno. Svako mišićno vlakno individualna je, ali višejezgrema mišićna stanica, koja sadrži kontraktilne proteine organizirane u miofibrile (Frontera i Ochala 2015). Miofibrile sadrže ponavljajuće jedinice koje nazivamo sarkomere, a njihovo skraćivanje rezultira kontrakcijom mišićnog vlakna (Slika 1). Sarkomere sadrže aktinske i miozinske filamente. Aktinski filamenti organizirani u sarkomerama vide se na mišićnom vlaknu kao svijetla pruga, dok tamnu prugu čine osim aktinskih i miozinski filamenti (Lieber 2009). Za izgradnju jednog skeletnog mišića potrebno je nekoliko stotina udruženih mišićnih vlakana (Davies i Nowak 2006).

Sarkolema je stanična membrana koja okružuje mišićno vlakno. Miofibrile su povezane sa sarkolemom dužinom Z-diska uz pomoć kompleksa proteina na sarkolemi koji se nazivaju kostameri (Rahimov i Kunkel 2013). Kostameri prenose kontraktilne sile s jednog mišićnog vlakna na drugo te tako sinkroniziraju kontrakciju mišićnih vlakana unutar mišića i sprečavaju puknuće sarkoleme (Rahimov i Kunkel 2013). Transverzalni (T)-tubuli invaginiraju sarkolemu, što omogućuje prijenos iona Ca^{2+} , važnih za kontrakciju do sarkoplazmatskog retikuluma unutar sarkoplazme mišićnog vlakna. Sarkolema je pričvršćena za bazalnu laminu, koja je izgrađena od ekstracelularnog matriksa (Rahimov i Kunkel 2013).

Proteinski kompleksi na sarkolemi zaslužni su za vezanje mišićnog vlakna s ekstracelularnim matriksom, a uključuju integrine i distrofin glikoproteinski kompleks (DGC od engl. *Dystrophin glycoprotein complex*) (Demonbreun i sur. 2015). Ekstracelularna komponenta kompleksa $\alpha7\beta1$ integrina veže se direktno na laminin (Crawley i sur. 1997), dok se intracelularna komponenta veže za proteine poput vinkulina i talina, što omogućava vezanje za aktinski citoskelet (Kadry i Calderwood 2020).

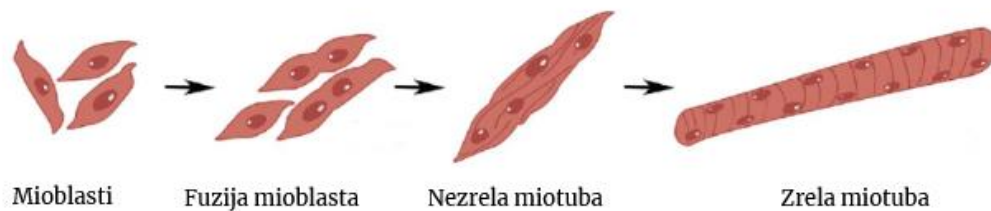


Slika 1. Građa mišićnog vlakna. Mišićno vlakno je višejezgreana stanica koja se sastoji od nekoliko stotina miofibrila. Miofibrile su povezane sa staničnom membranom, koja okružuje mišićno vlakno (sarkolema), dužinom Z diska na sarkomeri. Slika preuzeta i prilagođena s <http://geneticengineeringinfo.blogspot.com/2013/06/terminology-of-myocyte.html>.

1.2. Miogeneza

U miogenezi, tijekom nastanka mišićnog vlakna, dolazi do fuzije mioblasta u miotube te kasnijeg sazrijevanja miotuba u mišićno vlakno (Fiorotto 2012). Proces fuzije mioblasta tijekom sazrijevanja u nezrela mišićna vlakna, odnosno miotube, prikazan je na Slici 2. Proces proliferacije mioblasta, njihove fuzije te diferencijacije i sazrijevanja u miotube može se promatrati i *in vitro* (Chal i Pourquié 2017).

Svako mišićno vlakno je proizvod fuzije nekoliko stotina ili tisuća mioblasta. Osim što je ključna za razvoj mišića tijekom embriogeneze, fuzija je kritičan događaj za regeneraciju mišića adultnog organizma, a odvija se uz pomoć mišićnih satelitnih stanica (mišićne matične stanice) (Kim i sur. 2015). U procesu regeneracije tijekom ozljede mišića dolazi do aktivacije mišićnih satelitnih stanica, koje diferenciraju u mioblaste (Fu i sur. 2015). Diferencirani mioblasti zatim sudjeluju u procesu popravka ozljede kroz proces fuzije na oštećeno mišićno vlakno (Fu i sur. 2015).



Slika 2. Proces sazrijevanja mioblasta u miotube koji uključuje fuziju mioblasta. Slika preuzeta od Velasco-Mallorquí i sur. (2020) i prilagođena.

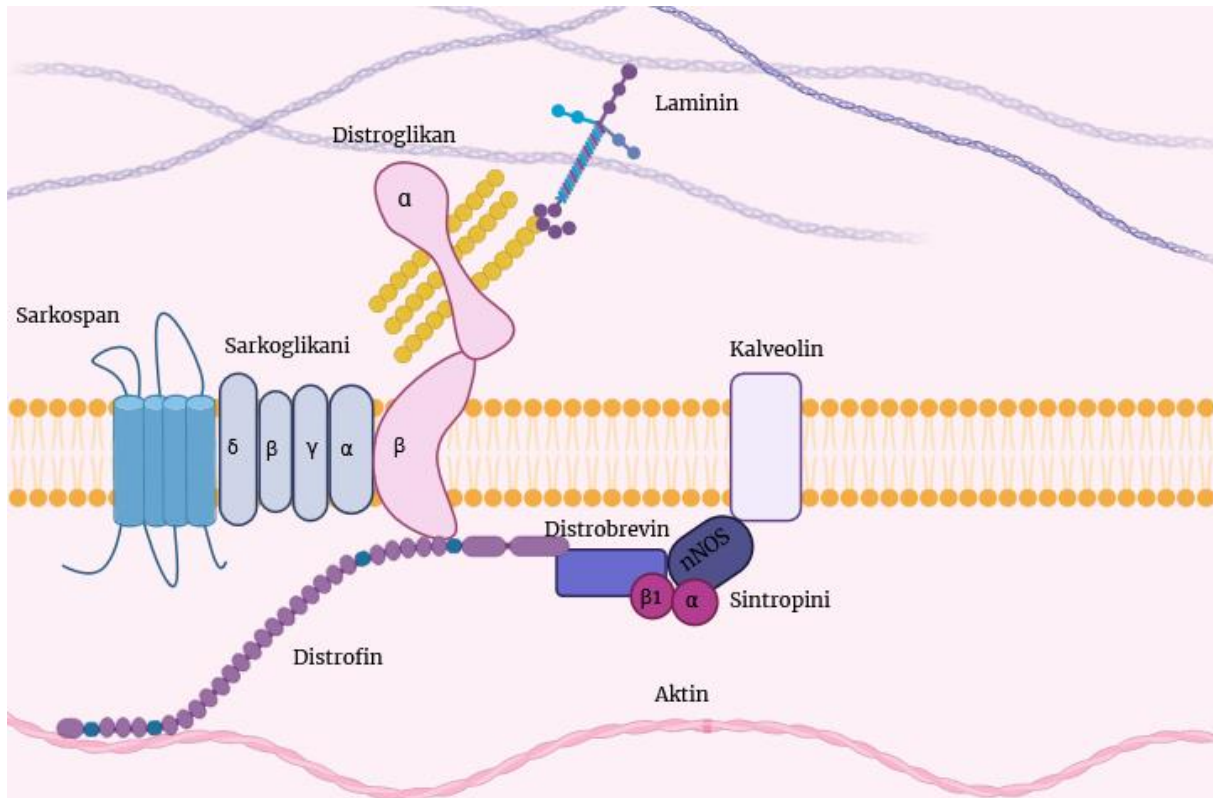
1.3. Proteinski kompleks na sarkolemi

Proteini koji su dio DGC-a na sarkolemi mišićnog vlakna mogu se podijeliti u izvanstanične, transmembranske i unutarstanične, ovisno o njihovoj lokalizaciji u odnosu na stanicu (Slika 3) (Davies i Nowak 2006). S vanjske strane sarkoleme nalazi se α -distroglikan, koji je nekovalentno vezan za transmembranski β -distroglikan te tako pričvršćen za ekstracelularni membranski prostor. Spomenute podjedinice distroglikana prevode se s iste prekursorske molekule mRNA, ali su posttranslacijski obrađene u α - i β -distroglikan (Ibraghimov-Beskrovnaya i sur. 1992).

Nadalje, β -distroglikan dolazi u interakciju s proteinom distrofinom s unutarnje strane sarkoleme (Ervasti i Campbell 1993). Distrofin je vezan na citoplazmatsku mrežu aktina kako bi povezoao citoskelet s distrofin glikoproteinskim kompleksom (Ervasti i Campbell 1993). Prisustvo glikanskih nastavaka na N-kraju α -distroglikana omogućava njegovo vezanje za izvanstanične ligande poput laminina, agrina i perlekana (Davies i Nowak 2006). Takve interakcije pridonose ulozi DGC-a, koji povezuje proteine citoskeleta s ekstracelularnim matriksom, odnosno ima funkciju u adheziji mišićnih vlakana na bazalnu laminu (Live i sur. 2013).

S β -distroglikanom je povezan još kompleks sarkoglikana. Ovaj kompleks se nalazi na sarkolemi i čine ga 4 različita proteina (Gao i McNally 2015). Sarkospan je transmembranski protein koji je povezan s kompleksom sarkoglikana (Gao i McNally 2015). Ostale citoplazmatske komponente DGC-a su distrobrevin, sintrofini i neuronska sintaza dušikovog oksida (nNOS od engl. *Neuronal nitric synthase*). Distrobrevin i sintrofini povezani su s distrofinom te povezuju nNOS s kalveolinom. nNOS proizvodi dušikov monoksid (NO) iz L-arginina, a NO aktivira gvaninil ciklazu, koja sintetizira ciklički gvanozin-monofosfat (cGMP

od engl. *Cyclic guanosine monophosphate*) (Kobzik i sur. 1994). cGMP djeluje kao vazodilatator, šireći krvne žile kako bi poboljšao protok krvi i osigurao mišićnim stanicama dovoljno kisika i hranjivih tvari (Kobzik i sur. 1994).



Slika 3. Distrofin glikoproteinski kompleks na sarkolemi mišićnih vlakana. α -distroglikan je na svojem N-kraju glikozilirani što mu omogućava vezanje za proteine ekstracelularnog matriksa poput laminina. Slika napravljena uz pomoć programa BioRender.com.

1.4. Mišićna distrofija

Mišićna distrofija je grupa heterogenih genetskih poremećaja koje karakterizira opća slabost skeletnih mišića te njihova degeneracija. Kongenitalna mišićna distrofija obuhvaća sve tipove mišićne distrofije koji se pojavljuju tijekom rođenja ili ubrzo nakon njega. Postoji nekoliko tipova kongenitalnih mišićnih distrofija, a većina njih predstavlja višesustavni poremećaj koji zahvaća srce, gastrointestinalni sustav, živčani sustav, endokrine žlijezde, oči i mozak (Waite i sur. 2012). Većina tipova kongenitalnih mišićnih distrofija uključuju gubitak funkcije proteina uključenih u održavanje integriteta sarkoleme (Live i sur. 2013). Duchenneova mišićna distrofija (DMD od engl. *Duchenne muscular dystrophy*) najčešća je i najstraženija mišićna distrofija, a uključuje gubitak funkcije proteina distrofina zbog mutacije u genu za distrofin.

Distroglikanopatija je tip kongenitalne mišićne distrofije koji uključuje gubitak funkcije α -distroglikana u DGC-u (Kanagawa 2021). Funkcija α -distroglikana sadržana je u njegovom velikom broju glikanskih nastavaka, koji omogućuju pravilno vezanje na proteine ekstracelularnog matriksa (Kanagawa i Toda 2018). Za pravilnu glikozilaciju α -distroglikana potreban je velik broj enzima, a mutacija samo jednog od njih dovoljna je da dođe do nepravilnosti koje uzrokuju distroglikanopatiju (Live i sur. 2013). Istraživanja s početka 21. stoljeća pokazala su da nepravilna glikozilacija α -distroglikana onemogućuje njegovo vezanje za proteine koji sadrže laminin G-domenu, poput laminina (Kanagawa i Toda 2018). Ova patologija tada je uočena kod pacijenata s različitim kliničkim značajkama, koje su se kretale od težih do blažih oblika kongenitalnih mišićnih distrofija (Kanagawa 2021). Široki klinički spektar vjerojatno proizlazi iz velikog broja različitih enzima uključenih u put glikozilacije α -distroglikana te različitih učinaka koje mutacije imaju na enzimsku aktivnost istih (Kanagawa 2021).

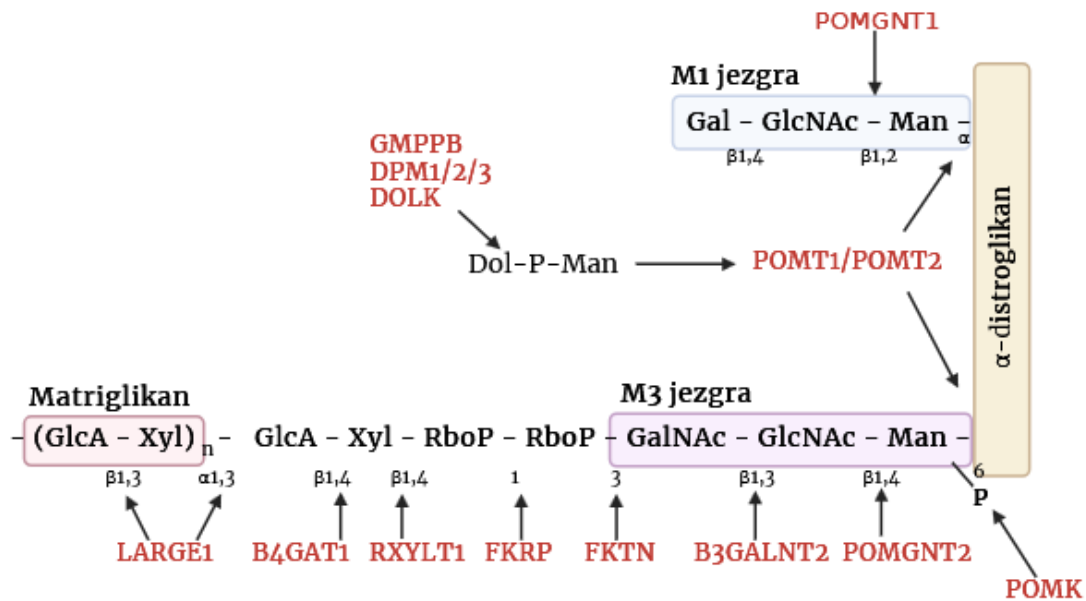
1.5. Glikozilacija α -distroglikana

Gotovo sve glikozilacije proteina u prirodi mogu se podijeliti na O-glikozilaciju ili N-glikozilaciju. Kod O-glikozilacije, inicijalni monosaharid N-acetil galaktozamin (galNAc) povezan je na treoninski ili serinski aminokiselinski nastavak proteina preko njihove hidroksilne skupine, dok je kod N-glikozilacije N-acetil glukozamin (GlcNAc) povezan na asparaginski aminokiselinski nastavak proteina preko amidne skupine (He i sur. 2024). α -distroglikan sadrži tri potencijalna mjesta N-glikozilacije te domenu, koja uz već spomenute O-galNAc inicirajuće glikane, sadrži i mjesto neobične O-glikozilacije (Barresi i Campbell 2006). Kod spomenute O-glikozilacije, inicijalni monosaharid manoza povezan je na treoninski ili serinski aminokiselinski nastavak na α -distroglikanu (Barresi i Campbell 2006). Lanac glikana koji se proteže iz ovog tipa glikozilacije ima svojstvo poznato i kod α -distroglikana, a to je vezanje za laminin G-domenu, koja je prisutna u nekim proteinima ekstracelularnog matriksa (Live i sur. 2013).

Struktura jezgara M1 i M3 glikanskih lanaca, odgovornih za funkciju vezanja α -distroglikana s proteinima ekstracelularnog matriksa, kao i enzimi uključeni u biosintezu tih jezgara, prikazani su na Slici 4. Kompleks protein O-manozil-transferaza (POMT1/2 od engl. *Protein-O-mannosyltransferase 1/2*) sudjeluje u transferu manoze na serinske ili treoninske aminokiselinske nastavke na α -distroglikanu (Manya i sur. 2003). Ovaj kompleks kao supstrat koristi dolikol fosfat manozu (Dol-P-Man), a poznata su tri enzima koja ju biosintetiziraju, a čija mutacija rezultira distroglikanopatijom: GDP-D-manoza pirofosforilaza (GMPPB od engl.

GDP-mannose pyrophosphorylase), dolikol fosfat manoziltransferaza (DPM1/2/3 od engl. *Dolichyl-phosphate mannosyltransferase 1/2/3*) i dolikol kinaza (DOLK od engl. *Dolichol kinase*) (Kanagawa 2021). Lanac glikana na jezgri M1 produžuje enzim O-manoza N-acetilglukozaminiltransferaza 1 (POMGNT1 od engl. *Protein O-linked mannose N-acetylglucosaminyltransferase 1*) (Manya i sur. 2003), dok lanac glikana na jezgri M3 produžuje POMGNT2 te β 1,3-N-acetilgalaktozaminiltransferaza 2 (B3GALNT2 od engl. *Beta-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 2*) (Halmo i sur. 2017). Nakon što je jezgra M3 sintetizirana u trisaharid, manozu fosforilira O-manoza kinaza (POMK od engl. *Protein O-mannose kinase*), što je potrebno kako bi se lanac mogao dalje produžiti uz pomoć idućih enzima (Collart i sur. 2013). Nakon toga, jezgri M3 produžuju ribitol-fosfat transferaze, tj. enzimi fukutin (FKTN od engl. *Fukutin*) i protein povezan s fukutinom (FKRP od engl. *Fukutin-related protein*) (Gerin i sur. 2016). Supstrat za ove enzime je citidin difosfat ribitol (CDP-Rbo) (Gerin i sur. 2016). Nakon dodavanja ribitol-fosfata slijedi dodatak ksiloze i glukuronske kiseline uz pomoć enzima ribitol-5-fosfat ksiloziltransferaza 1 (RXYL1 od engl. *Ribitol xylosyltransferase 1*) i β 1,4-glukuroniltransferaza 1 (B4GAT1 od engl. *Beta-1,4-glucuronyltransferase 1*) (Willer i sur. 2014), (Manya i sur. 2016).

Lanac se dalje produžuje ponavljajućim jedinicama disaharida koji sadrže ksilozu i glukuronsku kiselinu, uz pomoć enzima protein sličan glikotransferazi 1 (LARGE1 od engl. *Xylosyl- and glucuronyltransferase 1*) (Inamori i sur. 2012). Ova ponavljajuća jedinica disaharida naziva se matriglikan, a upravo ona ima ulogu vezanja za ligande ekstracelularnog matriksa (Goddeeris i sur. 2013). Ako lanac nije u potpunosti sintetiziran do ponavljajuće jedinice disaharida, sposobnost vezanja za ligande se gubi. Iako je POMGNT1 enzim koji modificira jezgri M1, smatra se da sudjeluje i u modifikaciji matriglikana, jer se veže na jezgri M3 i fukutin, pa je tako i sam potreban za pravilnu sintezu (Kuwabara i sur. 2016).



Slika 4. Struktura jezgara M1 i M3 glikanskih lanaca na α -distroglikanu. Slika preuzeta i prilagođena iz Kanagawa (2021)

1.6. Patologija distroglikanopatije

Poremećena poveznica između citoskeleta i ekstracelularnog matriksa, zbog gubitka funkcije DGC-a, rezultira fragilnom sarkolemom (Wallace i McNally 2009). Kompleksi DGC-a i integrina su lokalizirani na sarkolemi u rešetki kostamera (Wallace i McNally 2009). Povezivanjem citoskeleta s ekstracelularnim matriksom, kostameri omogućuju pravilnu organizaciju sarkoleme i prijenos kontrakcija prema bazalnoj lamini (Rybakova i sur. 2000). Ako je funkcija DGC-a narušena, kostameri nisu pravilno organizirani, što povećava mogućnost puknuća sarkoleme i osjetljivost mišića na ozljede tijekom kontrakcije (Rybakova i sur. 2000). Zbog puknuća dolazi do stvaranja rupa u sarkolemi, što povećava njezinu propusnost i rezultira staničnom smrću (Rahimov i Kunkel 2013). Ovo je dokazano u *mdx* miševima, koji se koriste kao modelni organizmi za proučavanje DMD-a (Matsuda i sur. 1995). Ovi miševi imaju null mutaciju u genu za distrofin, što dovodi do istih, ali slabije izraženih kliničkih značajki kao kod pacijenata s DMD-om (Gumerson i Michele 2011). Budući da je nekroza mišićnih vlakana zbog osjetljivosti sarkoleme dokazana kod DMD-a, smatra se da distroglikanopatija pokazuje isti patološki mehanizam. To se događa zbog nepravilne glikozilacije α -distroglikana, koja onemogućuje vezanje DGC-a za ligande u ekstracelularnom matriksu (Taniguchi-Ikeda i sur. 2016).

Mehanička oštećenja u sarkolemi rezultiraju povećanim unosom iona kalcija (Ca^{2+}) u mišićna vlakna (Gissel 2006). Dugotrajno visoke razine kalcija u stanici aktiviraju kalcij-ovisne proteaze, poput kalpaina i fosfolipaze A2 (Duan i sur. 2021). Aktivnost kalpaina povećana je u *mdx* mišu, a proteaze poput kalpaina mogu degradirati mnoge membranske proteine pridonoseći nekrozi mišićnog vlakna (Alderton i Steinhardt 2000). Povećan unos kalcija također može narušiti funkciju mitohondrija, što rezultira staničnom nekrozom (Robert i sur. 2001). Osim što povećan unos kalcija utječe na razvoj bolesti poticanjem nekroze, poznato je da ima ulogu i u aktivaciji staničnog membranskog popravka putem proteina disferlina (Wallace i McNally 2009). Aktivacijom staničnog proteinskog kompleksa za popravak membrane, rupe u sarkolemi se zatvaraju, koncentracije kalcija se normaliziraju, a kompleks za popravak se deaktivira (Wallace i McNally 2009). Poznato je da su mišići, čak i kod zdravih osoba, podložni mehaničkim oštećenjima tijekom produženih kontrakcija (Gumerson i Michele 2011). Kada dođe do mehaničkog oštećenja sarkoleme, povećava se koncentracija kalcija u citosolu mišićnog vlakna, što pokreće proces za popravak membrane (Wallace i McNally 2009). Ako se tijekom ponavljanih kontrakcija mišićna vlakna ne poprave brzo uz pomoć ovog kompleksa, dugotrajno oštećenje rezultira nekrozom (Michele 2022).

Nekroza dovodi do disfunkcije i degeneracije mišića te aktivira upalni odgovor kojim se pokušavaju ukloniti oštećene stanice (Clarkson i Hubal 2001). U većini slučajeva, mišićna degeneracija uzrokovana dugotrajnom ozljedom može se u potpunosti popraviti uz pomoć procesa regeneracije, koji uključuje mišićne satelitne stanice (Gumerson i Michele 2011). To znači da su povremena oštećenja sarkoleme, koja se ne mogu popraviti brzim staničnim kompleksima za popravak membrane, te degeneracija mišićnih vlakana, čija funkcija se vraća regeneracijom matičnim stanicama, dio normalne homeostaze mišića.

Iako mišićne satelitne stanice imaju sposobnost samoobnavljanja, konstantni ciklus oštećenja mišićnih vlakana, nekroze, degeneracije i pokušaja regeneracije mišića kod mišićnih distrofija iscrpljuje zalihi matičnih stanica, čime se onemogućava daljnja regeneracija (Matsuda i sur. 1995) (Matsuda i sur. 1995). Kako bolest napreduje, regeneracija mišića više ne može nadomjestiti gubitak mišićnih vlakana nastao tijekom degeneracije, pa se oštećeno tkivo postupno zamjenjuje fibroznim tkivom (Wallace i McNally 2009). Ovaj ciklus, koji je prisutan i kod pacijenata s distroglukanopatijom, dovodi do progresivnog gubitka mišićne mase.

1.6.1. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres ima značajnu ulogu u patofiziologiji mišićne distrofije. Ravnoteža između proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS od engl. *Reactive oxygen species*) i aktivacije antioksidacijskih obrambenih mehanizama ključna je za održavanje homeostaze u zdravom mišiću (Lian i sur. 2022). Ako dođe do prekomjerne proizvodnje ROS-ova, stanica ulazi u stanje oksidacijskog stresa, koje ima utjecaj na funkciju proteina, strukturu membrane, stabilnost DNA i metabolizam lipida te ometa homeostazu i funkciju samih mišićnih vlakana (Lian i sur. 2022). Glavni izvori ROS-ova tijekom kontrakcije mišićnih vlakana su NADPH oksidaza 2 (NOX2 od engl. *NADPH oxidase 2*) i 4 (NOX4 od engl. *NADPH oxidase 4*) (Mosca i sur. 2021). NOX2 se aktivira putem proteina Ras-srodni C3 supstrat botulinum toksina 1 (Rac1 od engl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*), koji je povezan s mikrotubulima, a djeluje kao element osjetljiv na mehanotransdukciju (Khairallah i sur. 2012). Povećana aktivnost NOX2 zabilježena je kod *mdx* miševa i pacijenata s DMD-om (Duan i sur. 2021). Kod DMD-a, mreža mikrotubula postaje gusta i neorganizirana zbog izostanka interakcije između distrofina i mikrotubula, što povećava osjetljivost proteina Rac1 i time aktivnost NOX2 (Khairallah i sur. 2012).

Drugi važni izvor ROS-ova u mišićnim vlaknima su mitohondriji. ROS-ovi koji nastaju u mitohondrijima tijekom oksidativne fosforilacije, značajno doprinose oštećenju mišićnih vlakana zbog visoke razine potrošnje kisika u mišićima (Lian i sur. 2022). Povećane razine citosolnog kalcija kod mišićne distrofije destabiliziraju mitohondrije, povećavaju oksidativnu fosforilaciju i sintezu ATP-a, što dodatno pojačava proizvodnju ROS-ova (Feissner 2009).

Osim ROS-ova, izvor slobodnih radikala u stanicama su i reaktivne vodikove vrste (RNS od engl. *Reactive nitrogen species*). Tijekom mišićnih kontrakcija, nNOS se aktivira te proizvodi NO koji povećava lokalni protok krvi, kako bi mišić u kontrakciji dobio dovoljno energije i hranjivih stvari (Rahimov i Kunkel 2013). Lokalizacija nNOS uz sarkolemu mišićnog vlakna omogućuje brzu difuziju NO u krvne žile (Rahimov i Kunkel 2013). Osim što djeluje kao vazodilatator, NO je slobodni radikal koji u prevelikoj koncentraciji može pridonijeti oksidacijskom stresu u stanici (Wallace i McNally 2009). Poznato je da gubitak distrofina kod DMD-a delokalizira nNOS sa sarkoleme (Brenman i sur. 1995). nNOS se u tom slučaju akumulira u citosolu, gdje nastavlja svoju enzimsku aktivnost (Kim i sur. 2013). U mišićima *mdx* miševa, gubitak enzima nNOS asociranog sa sarkolemom, rezultira smanjenjem NO potrebnog za vazodilataciju te može dovesti do istovremene neregulirane proizvodnje NO u citosolu (Li i sur. 2011). Zbog neregulirane proizvodnje NO u citosolu, on može reagirati s

kisikovim slobodnim radikalima te stvarati RNS (Duan i sur. 2021). Gubitak distrofina nije jedini uzrok delokalizacije nNOS-a, slični procesi javljaju se i kod distrofije uzrokovane gubitkom funkcije α -sarkoglikana u DGC-u (Kobayashi i sur. 2008).

Oštećenja mišićnih vlakana uzrokovana nefunkcionalnim DGC-om, uključujući rane na sarkolemi i aktivaciju kalcij-ovisnih proteaza, dovode do stvaranja neispravnih organela i neispravno raspoređenih staničnih komponenata (Sandri i sur. 2013). U zdravom mišićnom vlaknu neispravni organeli i nakupine proteina uklanjaju se autofagijom (Sandri i sur. 2013). Međutim, kod DMD-a proces autofagije je slab i nepravilan, što dovodi do nakupljanja neispravnih proteina i organela te na kraju degeneracije mišićnog vlakna (De Palma i sur. 2014). Mišićna vlakna oštećena kroz proces degeneracije prepoznaju upalne stanice (Tidball i sur. 2018). U prvoj fazi upale, M1 makrofagi potiču proces lize mišićnih vlakana putem sintaze dušikovog oksida (NOS od engl. *Nitric oxide synthase*), koja sintetizira NO dodatno povećavajući oksidacijski stres (Tidball i sur. 2018). Zbog toga je upala još jedan od izvora slobodnih radikala koji pridonose stvaranju RNS-a. Osim što proces upale potiče proizvodnju slobodnih radikala koji doprinose oksidacijskom stresu, stanje oksidacijskog stresa također je jedan od okidača koji pojačava upalu u mišićnim vlaknima. Kada mišićne stanice nisu više u redoks ravnoteži, dolazi do aktivacije nuklearnog transkripcijskog faktora-kappa B (NF- κ B od engl. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (Mosca i sur. 2021). Kao odgovor na aktivaciju NF- κ B, aktivirani makrofagi proizvode upalne citokine kao što su tumorski faktor nekroze alfa (TNF- α), interleukin-1 beta (IL-1 β) i interleukin 6 (IL-6) (Luo i sur. 2003). Visoke razine upalnih citokina negativno utječu na mitohondrijsku funkciju i povećavaju proizvodnju ROS-ova (Mosca i sur. 2021). Koaktivator 1 alfa receptora gamma za aktivaciju proliferacije peroksisoma (PGC-1 α od engl. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) ima ulogu u regulaciji metaboličkih procesa u mitohondriju te u biogenezi mitohondrija, a smatra se da u mišićnom vlaknu djeluje protuupalno te smanjuje stvaranje upalnih citokina (Kang i Ji 2012).

1.6.2. Sustavi antioksidacijske zaštite

ROS-ovi nisu nužno štetni za stanicu. Pokazano je da antioksidansi mogu održavati optimalnu koncentraciju ROS-ova i RNS-ova kako bi sudjelovali u prijenosu signala unutar stanice (Lian i sur. 2022). Niska razina oksidacije u mišićima tijekom mirovanja osigurava normalnu proizvodnju sile za kontrakciju, dok se tijekom vježbanja pojačava sposobnost mišićnih vlakana da se odupiru oštećenjima (Lian i sur. 2022). Mišićna vlakna eksprimiraju antioksidacijske enzime kao što su hem oksigenaza-1 (HO-1 od engl. *Heme Oxygenase 1*), katalaza (CAT od

engl. *Catalase*), glutation peroksidaza (GPX od engl. *Glutathione peroxidase*) te superoksid dismutaza (SOD od engl. *Superoxide dismutase*) (Kozakowska i sur. 2015). Ovi enzimi neutraliziraju koncentraciju ROS-ova i RNS-ova na optimalnu te imaju važnu ulogu u regeneraciji mišićnih vlakana. Ključni su u regulaciji upale nakon oštećenja te poboljšavaju vijabilnost i proliferativnu sposobnost mišićnih satelitnih stanica (Kozakowska i sur. 2015).

PGC-1 α jedan je od regulatornih mehanizama odgovornih za endogenu ekspresiju antioksidacijskih enzima u mitohondriju (Kang i Ji 2012). Ovaj transkripcijski koaktivator smanjuje koncentraciju ROS-ova u mišićnim vlaknima tako da povećava ekspresiju superoksid dismutaze 1 (SOD1 ili CuZn-SOD), superoksid dismutaze 2 (SOD2 ili Mn-SOD), CAT te GPX (Wenz i sur. 2009), (St-Pierre i sur. 2006). Već je spomenuto kako PGC-1 α regulira upalu tako da smanjuje stvaranje upalnih citokina poput TNF- α i IL-6 (Kang i Ji 2012). Iako točan mehanizam smanjenja razine upalnih citokina nije u potpunosti poznat, smatra se da ključnu ulogu ima zaštita mišićnih vlakana od oksidacijskog stresa putem PGC-1 α posredovane ekspresije antioksidacijskih enzima (Kang i Ji 2012). Budući da PGC-1 α regulira optimalnu koncentraciju ROS-ova, također smanjuje ukupni oksidacijski stres u mišićnim vlaknima. Posljedično, smanjenje oksidacijskog stresa dovodi do smanjene aktivacije NF- κ B te time i smanjene proizvodnje upalnih citokina.

1.7. Dijetalna terapija šećerima

Trenutačni klinički pristup u liječenju distroglikanopatije prvenstveno se fokusira na ublažavanje simptoma i usporavanje mišićne degeneracije putem fizioterapije (Gawlik 2018). Dijetalna terapija šećerima dostupna je za nekoliko kongenitalnih poremećaje glikozilacije (CGD engl. *Congenital disorders of glycosylation*), ali nije dostupna terapija u liječenju distroglikanopatija (Boyer i sur. 2022). Primjer dijetalne terapije je manozu u obliku oralnog suplementa u liječenju CGD-a uzrokovanog mutacijom u enzimu manozu-6 fosfat izomeraza (MPI-CDG od eng. *Mannose-6 phosphate isomerase -CDG*) ili galaktozu koja se koristi u liječenju CDG-a zbog mutacije u enzimu fosfoglukomutazu-1 (PGM1-CDG od engl. *Phosphoglucomutase-1-CDG*) (Boyer i sur. 2022).

Dijetalne terapije u kliničkoj primjeni financijski su pristupačne, jednostavne za korištenje te lako dostupne, zbog čega postaju sve zanimljivija tema istraživanja u kontekstu distroglikanopatija. U novije vrijeme sve veća tema istraživanja u liječenju distroglikanopatije je dopunska terapija šećerom ribitolom. CDP-rbo je supstrat za enzime FKTN i FKRP (Gerin i sur. 2016). Enzim 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfat citidiltransferaza (ISPD od engl. *2-C-Methy-*

derythritol-4-phosphate cytidyltransferase) ima ulogu u proizvodnji CDP-rbo iz CTP-a i ribitol-5-fosfata (Gerin i sur. 2016). Iako mehanizam sinteze CDP-rbo još nije u potpunosti razjašnjen, primijećeno je da dodatak riboze i ribitola kao suplementa divljem tipu miša rezultira povećanom koncentracijom CDP-rbo u stanicama (Kanagawa 2021). Stoga se pretpostavlja da je u njegovu sintezu uključen put pentoza fosfata (Kanagawa 2021). Nadalje, primijećeno je da je kod *FKRP*-mutantnih (P448L) miševa dodatak ribitola kao suplementa povratio normalnu glikozilaciju α -distroglkana i imao pozitivan učinak na kliničku sliku (Cataldi i sur. 2018). Ribitol je vjerojatno povećao koncentraciju CDP-rbo u mišićnim vlaknima miša te time pojačao aktivnost mutiranog enzima FKRP (Cataldi i sur. 2018). Dodatak riboze kao oralnog suplementa primijenjen je kod jednog pacijenta koji boluje od distroglikanopatije uzrokovane mutacijom u genu *FKRP* (Thewissen i sur. 2024). Iako nisu primijećena objektivna poboljšanja u kliničkoj slici, pacijent je prijavio subjektivno smanjenje osjećaja boli i poboljšanje snage (Thewissen i sur. 2024).

2. CILJEVI

Cilj ovog rada je na staničnoj kulturi mioblasta izoliranih iz pacijenata sa i bez mišićne distrofije provjeriti ima li tretman manozom i galaktozom utjecaj na poboljšanje genske ekspresije α -distroglikana, smanjenje upalnog procesa mišićnih vlakana te kinetiku, proliferaciju i vijabilnost mioblasta.

Specifični ciljevi istraživanja su:

- Uspostaviti staničnu kulturu mioblasta te metodom mikroskopiranja evaluirati postoje li razlike u morfološkim karakteristikama mioblasta od pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom u odnosu na kontrolne mioblaste
- Odrediti vrijeme udvostručenja populacije (PDT od eng. *Population doubling time*) te vijabilnost tretiranih i netretiranih mioblasta.
- Procijeniti kinetiku i proliferaciju tretiranih i netretiranih mioblasta u kulturi s ciljem neinvazivnog praćenja živih stanica u stvarnom vremenu metodom fazno holografskog mikroskopa (HoloMonitor® M4).
- Utvrditi promjenu ekspresije gena *DAG1* i *POMT2* u tretiranim i netretiranim mioblastima metodom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (RT- qPCR)
- Utvrditi promjenu ekspresije gena *PPARGCIA* te gena za antioksidacijske enzime (*CAT* i *SOD1*) u tretiranim i netretiranim mioblastima metodom RT- qPCR

Pretpostavlja se da će mioblasti od pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom pokazati promjene u morfologiji, proliferaciji, kinetici i ekspresiji gena u odnosu na kontrolne mioblaste te da će tretman manozom i galaktozom imati pozitivan učinak na ove parametre.

3. MATERIJALI I METODE

U ovom istraživanju, uz odobrenje etičkog povjerenstva, koristila sam mioblaste izolirane iz skeletnog mišića tri maloljetna pacijenta uz informirani pristanak staratelja/roditelja. Radi lakšeg snalaženja i zaštite podataka pacijenata, uzorke sam označila slovima "A", "B" i "C".

Mioblasti pacijenta A potječu od osobe s kongenitalnom mišićnom distrofijom uzrokovanom mutacijama c.786G>A i c.1763G>A u genu *POMT2*. Mutacija c.786G>A klasificira se kao besmislena (engl. *Nonsense*) mutacija koja dovodi do nastanka preuranjenog stop kodona (p.Trp262Ter), što vjerojatno rezultira nefunkcionalnim proteinom. Prema bazi podataka ClinVar (VCV002429238.6), ova mutacija povezana je s teškim fenotipovima mišićne distrofije. Trenutno nisu poznate posljedice mutacije c.1763G>A.

Mioblasti pacijenta B također potječu od osobe s kongenitalnom mišićnom distrofijom, uzrokovanom mutacijama c.248+1G>C i c.1958C>T u genu *POMT2*. Mutacija c.248+1G>C nalazi se na donorskom mjestu spajanja introna te vjerojatno narušava ispravno cijepanje mRNA tijekom procesa prekrajanja, što može rezultirati stvaranjem neispravnog transkripta i nefunkcionalnog proteina. Prema bazi ClinVar (VCV000579369.10), ova mutacija povezana je s teškim fenotipovima mišićne distrofije. Mutacija c.1958C>T uzrokuje zamjenu aminokiseline prolina leucinom (p.Pro653Leu). Iako se radi o pogrešnoj (engl. *Missense*) mutaciji, njezine precizne posljedice na funkciju proteina još uvijek nisu u potpunosti razjašnjene (ClinVar, VCV000194966.30).

Mioblasti pacijenta C potječu od osobe koja ne boluje od kongenitalne mišićne distrofije i služe kao kontrolna skupina u ovom istraživanju. Popis uzoraka je prikazan u *Tablici 1*.

Tablica 1. Mioblasti korišteni kao uzorci tijekom istraživanja.

Uzorci	Vrsta uzoraka	Mutacija
Mioblasti od pacijenta A	Kongenitalna mišićna distrofija	c.786G>A, c.1763G>A
Mioblasti od pacijenta B	Kongenitalna mišićna distrofija	c.248+1G>C, c.1958C>T
Mioblasti od pacijenta C	Kontrolni uzorci	/

Mioblasti su nakon nasađivanja u kultivacijske posude i uzgajanja u staničnoj kulturi (pasaža 1) zamrznuti te pohranjeni u odjelu Banka tkiva i stanica na -80 °C.

3.1. Odmrzavanje stanica i uspostavljanje stanične kulture

Jedan dio zamrznutih mioblasta od sva tri pacijenta u pasaži 1 odmrznula sam iz tekućeg dušika. U mikrobiološkom kabinetu klase II (KTB-NS III, Klimaoprema, Hrvatska), kriotube sa zamrznutim stanicama, uronila sam u staklenu čašu s zagrijanom sterilnom vodom na otprilike dvije minute. Kada se stanična suspenzija potpuno otopila, serološkom pipetom prebacila sam je u Falcon tubu od 15 mL te dodala 7 mL medija za mioblaste (SMCGM od engl. *Skeletal Muscle Cell Growth Medium*). Nakon toga, staničnu suspenziju centrifugirala sam na 1100 rpm, četiri minute pri +4 °C (Eppendorf SE, 5810R, Njemačka). Po završetku centrifugiranja uklonila sam supernatant, a stanični talog resuspendirala u 5 mL medija SMCGM. Stanice, koje su sada bile u pasaži 2, nasadila sam u prethodno pripremljene kultivacijske posude te ih uzgajala u CO₂ inkubatoru (5 % CO₂, 37 °C) (Eppendorf, C170).

3.2. Priprema tretmana manoze i galaktoze u mediju SMCGM

Kako bih pripremila početnu otopinu šećera u vodi, prvo sam izračunala potrebnu količinu monosaharida. Utvrdila sam da je za pripremu otopine manoze i galaktoze koncentracije 55,5 mM potrebno otopiti 50 mg monosaharida u 5 mL vode. Budući da oba monosaharida imaju istu molekularnu masu ($M_r = 180,156 \text{ g/mol}$), isti izračun vrijedi za obje otopine. Vaganje sam provela analitičkoj vagi Practum®, a volumene vode sam prilagodila točnoj masi odvage, kako je prikazano u *Tablici 2*.

Tablica 2. Mase manoze i galaktoze te pripadajući volumeni vode potrebni za pripremu otopina šećera koncentracija 55,5 mM.

Tip monosaharida	Masa odvage (mg)	Volumen vode (mL)
Galaktoza	56,5	5,65
Manoza	47,7	4,77

Nakon što sam šećere otopila u vodi, filtrirala sam dobivene otopine manoze i galaktoze preko 0,22 µm Millex® PVDF syringe filtera u Falcon tube od 50 mL, čime sam smanjila mogućnost kontaminacije otopina. Dobivene otopine šećera u vodi, koncentracija 55,5 mM, koristila sam za pripremu tretmana manoze i galaktoze (1300/140 µM) u mediju SMCGM. Ukupni potrebni volumen tretmana u mediju SMCGM iznosio je 30 mL, a točni volumeni otopina šećera korištenih za pripremu prikazani su u *Tablici 3*. Pripremljeni tretman u mediju SMCGM pohranila sam na +4 °C do početka eksperimenta na uređaju HoloMonitor® M4.

Tablica 3. Volumeni otopina šećera te medija SMCGM potrebni za pripremu tretmana.

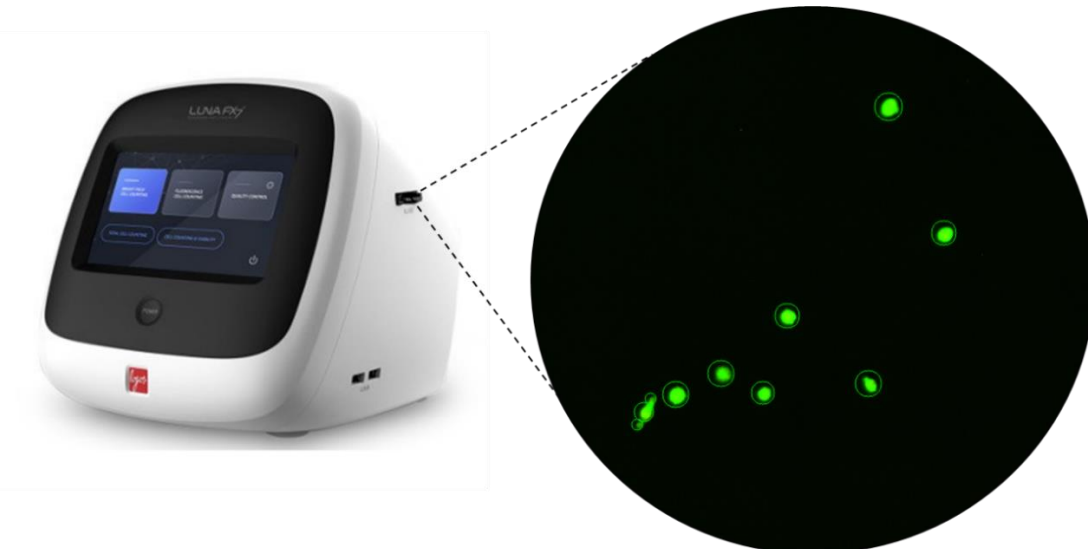
Otopine	Volumen za pripremu tretmana (1300/140 μ M)
55,5 mM galaktoza	75,7 μ L
55,5 mM manoza	703 μ L
SMCGM medij	29.220 mL

Pripremljeni tretman u mediju SMCGM sam pohranila na +4 °C do početka eksperimenta na uređaju HoloMonitor® M4.

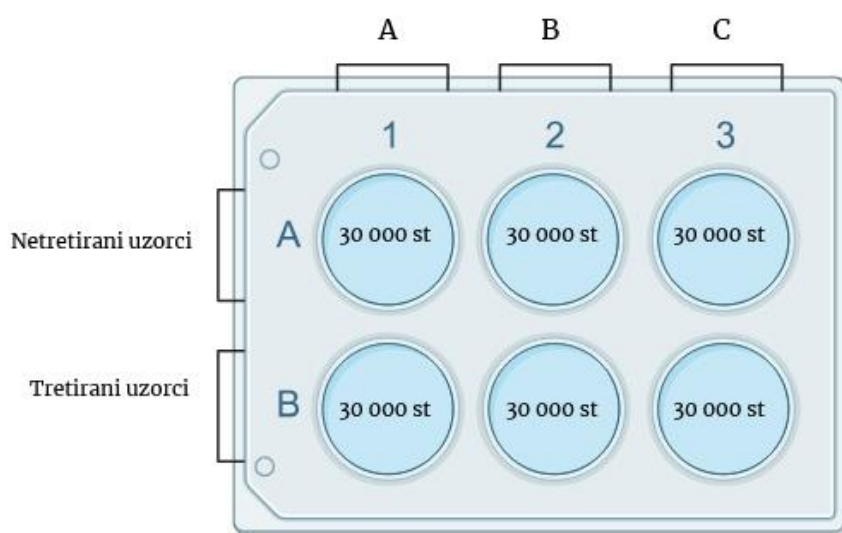
3.3. Određivanje vijabilnosti mioblasta

Kada su stanice u kultivacijskim posudama dosegle približno 70 % konfluencije, uklonila sam medij iz mioblasta od pacijenta A i dodala 5 mL Dulbeccovog fosfatnog pufera (DPBS od engl. *Dulbecco's Phosphate Buffer Saline*) (*Gibco*™, SAD) kako bih isprala stanice. Puffer DPBS sam uklonila, a u kultivacijsku posudu dodala 3 mL 0,25 % tripsina (*Sigma-Aldrich*, SAD). Stanice s tripsinom sam inkubirala 5 minuta na 37 °C. Djelovanje tripsina provjerila sam na mikroskopu. Nakon što sam potvrdila da je tripsin djelovao, u kultivacijske posude sa stanicama dodala sam 4 mL medija SMCGM kako bi zaustavila enzimsku reakciju. Stanice sam zatim prebacila u Falcon tube od 15 mL i centrifugirala ih na 1400 rpm pri +4 °C. Nakon uklanjanja supernatanta, stanični talog sam resuspendirala u 3 mL medija SMCGM. Stanice sam prebrojala uz pomoć automatiziranog brojača stanica (*LUNA-FX7*™), prikazanog na Slici 5. Kako bih stanice prebrojila koristila sam 18 μ L stanične suspenzije te pomiješala s 2 μ L propidij jodida. Koristila sam 18 μ L stanične suspenzije pomiješane s 2 μ L propidij jodida, a zatim nanijela 10 μ L suspenzije na *LUNA*™ *PhotonSlide*™ te analizirala stanice u fluorescencijskom načinu rada. Isti postupak ponovila sam i za mioblaste pacijenata B i C.

Prethodno pripremljene tretmane šećera u mediju SMCGM zagrijala sam na 37 °C. Mioblaste sam nasadila u pločice sa 6 jažica (*Sarstedt*®), u broju od 30000 stanica po jažici, u pasaži 3. Netretirane mioblaste od sva tri pacijenta nasadila sam u prvi red jažica, dok su tretirane skupine bile u drugom redu jažica s otopinama manoze i galaktoze (1300/140 μ M). Netretirane mioblaste nasadila sam u mediju SMCGM, dok su tretirane skupine bile uzgajane u tretmanu šećera u istom mediju. Radi lakšeg razumijevanja, raspored mioblasta različitih pacijenata na pločici *Sarstedt*® prikazan je na Slici 6. Pločicu sam pohranila u CO₂ inkubator (5 % CO₂, 37 °C).



Slika 5. Prikaz živih mioblasta na ekranu automatiziranog brojača stanica LUNA-FX7™ tijekom brojanja i određivanja vijabilnosti stanica.



Slika 6. Shematski prikaz rasporeda uzoraka mioblasta od tri različita pacijenta (A, B, C) nasađenih u broju od 30000 stanica po jažici u pločicu Sarstedt® za postavljanje na uređaj HoloMonitor® M4. U prvom redu A1, B1, C1 predstavljaju mioblasti nasađeni u mediju SMCGM, a u drugom redu A5, B5, C5 mioblasti nasađeni u tretmanu manoze i galaktoze (1300/140 μ M) u istom mediju.

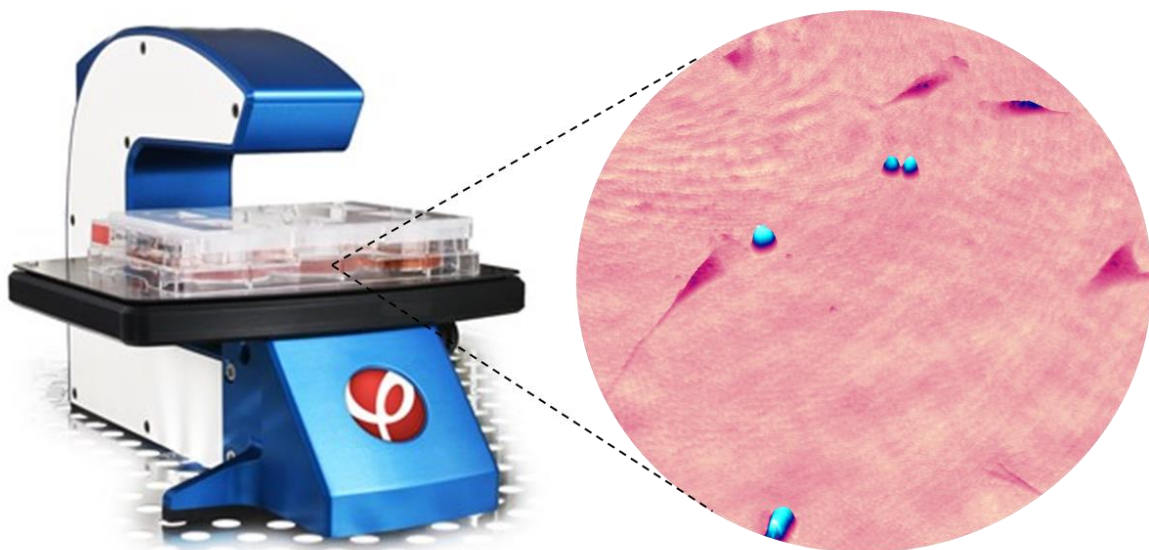
3.4. Zamrzavanje mioblasta u tekući dušik

Kako bih pohranila preostale mioblaste, koji su tada bili u pasaži 3, pripremila sam 20 mL medija za zamrzavanje. Medij sam pripremila miješanjem 10 mL medija SMCGM, 8 mL fetalnog govedeg seruma (FBS od engl. *Fetal Bovine Serum*) (Life Technologies, SAD) i 2 mL dimetil sulfoksida (DMSO). Stanice sam ponovo centrifugirala na 1400 rpm pri +4 °C.

Supernatant sam uklonila, a na stanice dodala pripremljeni medij za zamrzavanje. Staničnu suspenziju rasporedila sam u krioeprovete, pri čemu sam u svaku dodala točno 1,7 mL suspenzije. Krioeprovete sam pohranila na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, a kasnije ih premjestila u tekući dušik na $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ radi dugotrajnog skladištenja.

3.5. Fazna holografška mikroskopija na mioblastima

Nakon 24 sata pripremila sam HoloLid™ kako bih ga postavila na pločicu sa nasadenim mioblastima uz pomoć protokola proizvođača (Phase Holographic Imaging PHI, Švedska). Nakon što sam pažljivo provjerila da se u potpunosti osušio nakon sterilizacije, HoloLid™ sam postavila na pločicu s mioblastima, a pločicu smjestila na HoloMonitor® M4. Uređaj HoloMonitor® M4 koristila sam za neinvazivno praćenje stanica u stvarnom vremenu (Slika 7). Ovaj uređaj omogućuje holografšku mikroskopiju, odnosno 2D i 3D analizu mioblasta, uključujući promjene u obliku i površini stanica, njihovu diobu, migraciju i formiranje miotuba. HoloMonitor® M4 generirao je slike svakih 30 minuta na 10 različitih pozicija unutar svake jažice tijekom 72 h unutar CO_2 inkubatora ($5\text{ }\%\text{ CO}_2$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nakon završetka snimanja, pločicu sa stanicama uklonila sam s uređaja i ostavila u CO_2 inkubatoru ($5\text{ }\%\text{ CO}_2$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$).



Slika 7. 3D prikaz stanica mioblasta dobiven uz pomoć fazno holografškog mikroskopa HoloMonitor® M4.

Dio mioblasta iz pasaže 2 ponovo sam otopila i uspostavila staničnu kulturu. Na identičan način ponovila sam postupak pripreme tretmana manoze i galaktoze u mediju SMCGM te postavljanja eksperimenta za HoloMonitor® M4. Ovoga puta stanice sam nasadila u broju od 20000 stanica po jažici. HoloMonitor® M4 generirao je slike svakih 10 minuta na 10 različitih

pozicija unutar svake jažice tijekom 40 h unutar CO₂ inkubatora (5 % CO₂, 37 °C). Nakon 72 h prebrojala sam stanice uz pomoć automatiziranog brojača LUNA-FX7™ kako bih mogla izračunati vrijeme udvostručenja populacije (PDT od engl. *Population doubling time*). Po završetku eksperimenta rezultate sam obradila pomoću softvera HoloMonitor® Appsuite.

3.6. Analiza ekspresije gena

Drugi dio zamrznutih mioblasta iz pasaže 1, odmrznuti su, nasađeni u pasaži 2 i korišteni za tretman monosaharidima manozom i galaktozom u različitim koncentracijama (50-1000 μM) i kombinaciji (1300/140 μM). Koncentracije šećera i pripadajući nazivi uzoraka prikazani su, radi lakšeg razumijevanja, u *Tablici 4*.

Tablica 4. Različite koncentracije i kombinacije monosaharida kojim su tretirani mioblasti od tri različita pacijenta te pripadajući nazivi uzoraka.

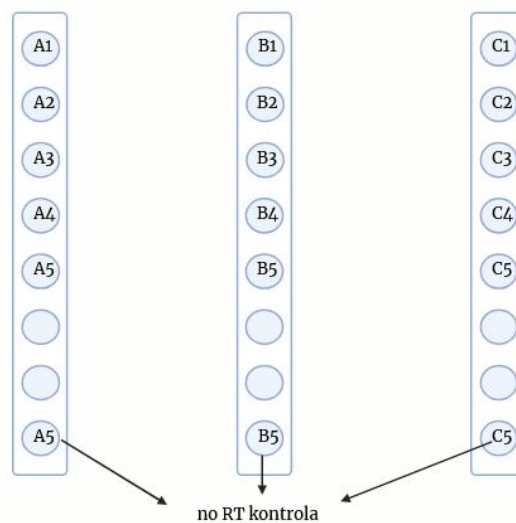
Koncentracija tretmana (μM)	A	B	C
0 manaza	A1	B1	C1
50 galaktoza	A2	B2	C2
500 manaza	A3	B3	C3
1000 manaza	A4	B4	C4
1300 manaza + 140 galaktoza	A5	B5	C5

3.6.1. Izolacija RNA

Izolaciju ukupne RNA provela sam peti dan nakon dodatka tretmana prema protokolu kompleta Quick-RNA MiniPrep (Zymo research, SAD). Kako bih isprala stanice, uklonila sam medij iz jažica te dodala 1 mL DPBS-a. Nakon uklanjanja DPBS-a, stanicama sam dodala 100 μL RNA Shield-a i 100 μL RNA pufera za lizu iz kompleta. Stanice sam potom sastrugala s površine jažica i prebacila u kolonice za izolaciju RNA. Za pročišćavanje izolirane RNA koristila sam pufere Prep i Wash, a dobivenu RNA pohranila sam u vodi bez nukleaza na -20 °C. Nakon izolacije provjerila sam koncentraciju i čistoću ukupne RNA za svaki uzorak. Na NanoDrop spektrofotometar (ThermoScientific, USA) nanijela sam 2 μL vode bez nukleaza kao standard. Koncentraciju sam mjerila nanošenjem po 2 μL svakog uzorka, pri čemu sam prije svakog novog uzorka uređaj prebrisala filter papirom. Dobivene koncentracije koristila sam za izračun volumena potrebnog za reakcijsku smjesu za tretman DNazom. Osim koncentracija, uređaj je izmjerio omjere apsorbancije 260/230 i 260/280, koji ukazuju na čistoću izolirane RNA.

3.6.2. Tretman DNazom i reverzna transkripcija

Tretman DNazom provela sam prema protokolu kompleta DNase I/Rnase-free (ThermoScientific, SAD) kako bih dodatno pročistila izoliranu RNA. Ukupni volumen reakcijske smjese za tretman DNazom iznosi 10 μ L, od čega je konačni volumen vode bez nukleaza i uzorka RNA u reakcijskoj smjesi 8 μ L. Budući da se koncentracije RNA razlikuju među uzorcima, izračunala sam maksimalnu masu koju mogu dodati u reakcijsku smjesu. Taj izračun sam napravila tako da sam pomnožila koncentraciju svakog uzorka RNA s maksimalnim volumenom uzorka koji je moguće dodati u reakcijsku smjesu, a to je 8 μ L. Prema dobivenoj maksimalnoj masi RNA (400 ng) koju sam mogla dodati u reakcijsku smjesu, izračunala sam potreban volumen svakog uzorka RNA te vode bez nukleaza i dodala ih u epruvete s 8 jažica. Osim uzorka RNA i vode bez nukleaza, u svaku jažicu sam dodala 1 μ L DNaze I (enzim koji je uklonio ostatke DNA u RNA uzorcima) i 1 μ L 10x reakcijskog pufera s $MgCl_2$ (kofaktor enzimu DNaza I). Ukupni volumen u svakoj jažici iznosio je 10 μ L. Nizove epruveta sam inkubirala 30 minuta u uređaju T100TM Thermal Cycler (BioRad, SAD) postavljenom na 37 °C. Nakon 30 minuta inkubacije s DNazom, tretman sam zaustavila dodatkom 1 μ L etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) u svaku reakcijsku jažicu. Nakon dodatka EDTA, inkubirala sam nizove epruveta 10 minuta na 65 °C. Uzorke sam rasporedila u 3 epruvete s 8 jažica prema Slici 8, pri čemu sam od svakog pacijenta jedan RNA uzorak i dodala ga dva puta u epruvetu, planirajući kasnije koristiti taj uzorak kao kontrolni koji neće biti reverzno transkribiran („no RT kontrola” na Slici 8.).



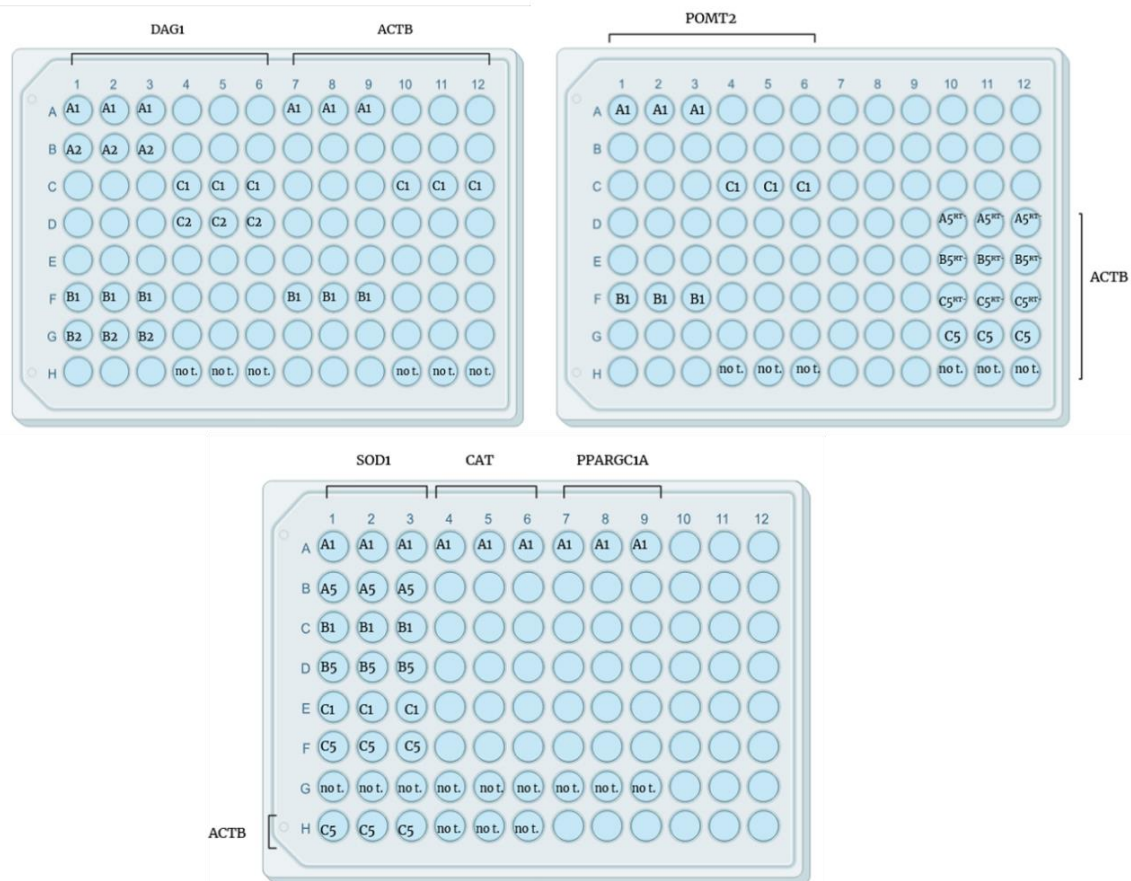
Slika 8. Shematski prikaz rasporeda uzoraka u nizovima epruveta za tretman DNazom i reverznu transkripciju. „No RT kontrola” su uzorci koji se kasnije neće reverzno transkribirati.

Pročišćenu RNA sam zatim reverzno transkribirala u cDNA prema protokolu iScript cDNA synthesis (BioRad, SAD). U epruветama s 8 jažica, nakon tretmana DNazom, nalazilo se 11 μL reakcijske smjese. U svaku jažicu sam dodala 4 μL 5x iScript reakcijske smjese, 4 μL vode bez nukleaza te 1 μL enzima reverzna transkriptaza. U jažicama koje sam pripremila kao kontrolne uzorke, koje neću reverzno transkribirati, umjesto 1 μL enzima reverzne transkriptaze dodala sam 1 μL vode bez nukleaza. Epruvete sam inkubirala u nekoliko koraka: 5 minuta na 25 °C za vezanje početnica, 20 minuta na 46 °C za reverznu transkripciju i 1 minutu na 95 °C kako bih inhibirala aktivnost enzima reverzne transkriptaze.

3.6.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR)

Kako bih provjerila razinu ekspresije gena, koristila sam metodu qPCR. Prije nanošenja uzoraka u pločice s 96 jažica, nacrtala sam shemu rasporeda uzoraka na pločici koja je prikazana na Slici 9. Nakon toga, svaki uzorak u epruветama razrijedila sam s 20 μL vode bez nukleaza, kako bih omogućila ponavljanje reakcije po potrebi. Sljedeći korak bio je pripremanje početnica za qPCR. Sekvence početnica za svaki gen prikazane su u *Tablici 5*. Smjese za početnice sam pripremila u koncentraciji od 2,5 μM za svaku od početnica. U svaku jažicu dodala sam 5 μL Syber Green Supermix-a (SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix, Biorad, SAD), 2 μL smjese odgovarajućih početnica, 2 μL vode bez nukleaza i 1 μL cDNA uzorka. Svaki uzorak stavljala sam u triplikatu, a ukupno sam provela 3 reakcije qPCR.

Pratila sam ekspresiju gena: *DAG1*, *POMT2*, *PPARGC1A*, *SOD1* i *CAT*. β -aktin (*ACTB*) sam koristila kao endogenu kontrolu. Osim uzoraka, u reakciji qPCR sam koristila i dvije vrste kontrole. Prvu kontrolu, koja nije reverzno transkribirana, pripremila sam dodavanjem svih komponenata reakcijske smjese u jažicu, ali bez reverzne transkriptaze, kako bih provjerila prisutnost moguće kontaminacije DNA. Druga kontrola, odnosno kontrola bez uzoraka služi kao provjera moguće kontaminacije reagensa. U ovu kontrolu sam dodala sve komponente reakcijske smjese, ali umjesto 1 μL uzoraka, dodala sam 1 μL vode bez nukleaza. Nakon pripreme pločica za qPCR, prekrila sam ih prozirkom folijom i centrifugirala 5 minuta na 320 g pri 4 °C (Universal 320 R, Hettich, Njemačka). Svaku pločicu sam zatim, po jednu, stavila u uređaj za qPCR CFX96™ Real-time System (BioRad, SAD), na kojem sam pokrenula program prikazan u *Tablici 6*.



Slika 9. Shema rasporeda uzoraka nanosenih na pločicu i korištenu u reakcijama qPCR. Uzorci su nanošeni redom od A1 do A5, od B1 do B5, od C1 do C5 u triplikatima. „No t.” označava *no template* kontrolu, odnosno kontrolu bez uzoraka. Kratica s “RT-“ eksponentom označava *no RT* kontrolu. C5 uzorak s početnicama za *ACTB* se nalazi na sve tri pločice.

Tablica 5. Sekvence početnica korištenih za reakciju qPCR.

Gen	Sekvenca uzvodne početnice	Sekvenca nizvodne početnice
DAG1	5'-CCACAGTGGTTGGCATTCT-3'	5'-CCAAGATGGCAAAGCCTCCT-3'
POMT2	5'-CCGAGTCTATCTGCTTGGCAAC-3'	5'-raspa-3'
SOD1	5'-CTCACTCTCAGGAGACCATTGC-3'	5'-CCACAAGCCAAACGACTTCCAG-3'
CAT	5'-GTGCGGAGATTCAACACTGCCA-3'	5'-CGGCAATGTTCTCACACAGACG-3'
PPARGC1A	5'-TCAAGGCTGAGAACGGGAAG-3'	5'-CGCCCCACTTGATTTTGGAG-3'
ACTB	5'-CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3'	5'-AGCTCTTTGCGGATGTCCACG-3'

Tablica 6. Parametri programa za amplifikaciju qPCR na uređaju CFX96™ Real-time System.

Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
95 °C	30 s	1
95 °C	15 s	40
60 °C	60 s	/
65 °C	5 s	1
95 °C	5 s	1
4 °C	∞	/

3.7. Statistička obrada podataka

Podatke dobivene uz pomoć softvera HoloMonitor® Appsuite statistički sam obradila. Za statističku značajnost razlike u srednjoj površini stanica provela sam Studentov T-test. Uz pomoć ovog testa usporedila sam dobivene vrijednosti srednjih površina stanica na svakoj snimljenoj poziciji netretiranih mioblasta od tri različita pacijenta.

Dvosmjerni test ANOVA koristila sam pri usporedbi podataka dobivenih za proliferacijski kapacitet i brzinu mioblasta. U oba slučaja sam usporedila dobivene srednje vrijednosti od interesa na svakoj snimljenoj poziciji za svaki uzorak. Kao test *post hoc* primijenila sam Tukeyjevu proceduru kojom sam odredila parove uzoraka između kojih postoji statistički značajna razlika.

Nakon reakcije qPCR, rezultate sam analizirala metodom $\Delta\Delta Ct$. Dobivene vrijednosti promjene razine ekspresije gena analizirala sam Shapiro-Wilkovim testom kako bih provjerila normalnost distribucije podataka. Nakon provjere normalnosti distribucije, na dobivenim podacima sam provela Welchov T-test kako bih odredila statističku značajnost razlike.

Razinu značajnosti (α) postavila sam na 0.05, što znači da sam razlike između skupina smatrala statistički značajnima ako je vjerojatnost pogreške manja od 5 %. U svim navedenim statističkim testovima koje sam provela, dobivene p-vrijednosti usporedila sam s postavljenom razinom značajnosti. Ako je p-vrijednost bila manja od 0,05 ($p < 0.05$), razlika se smatrala statistički značajnom.

4. REZULTATI

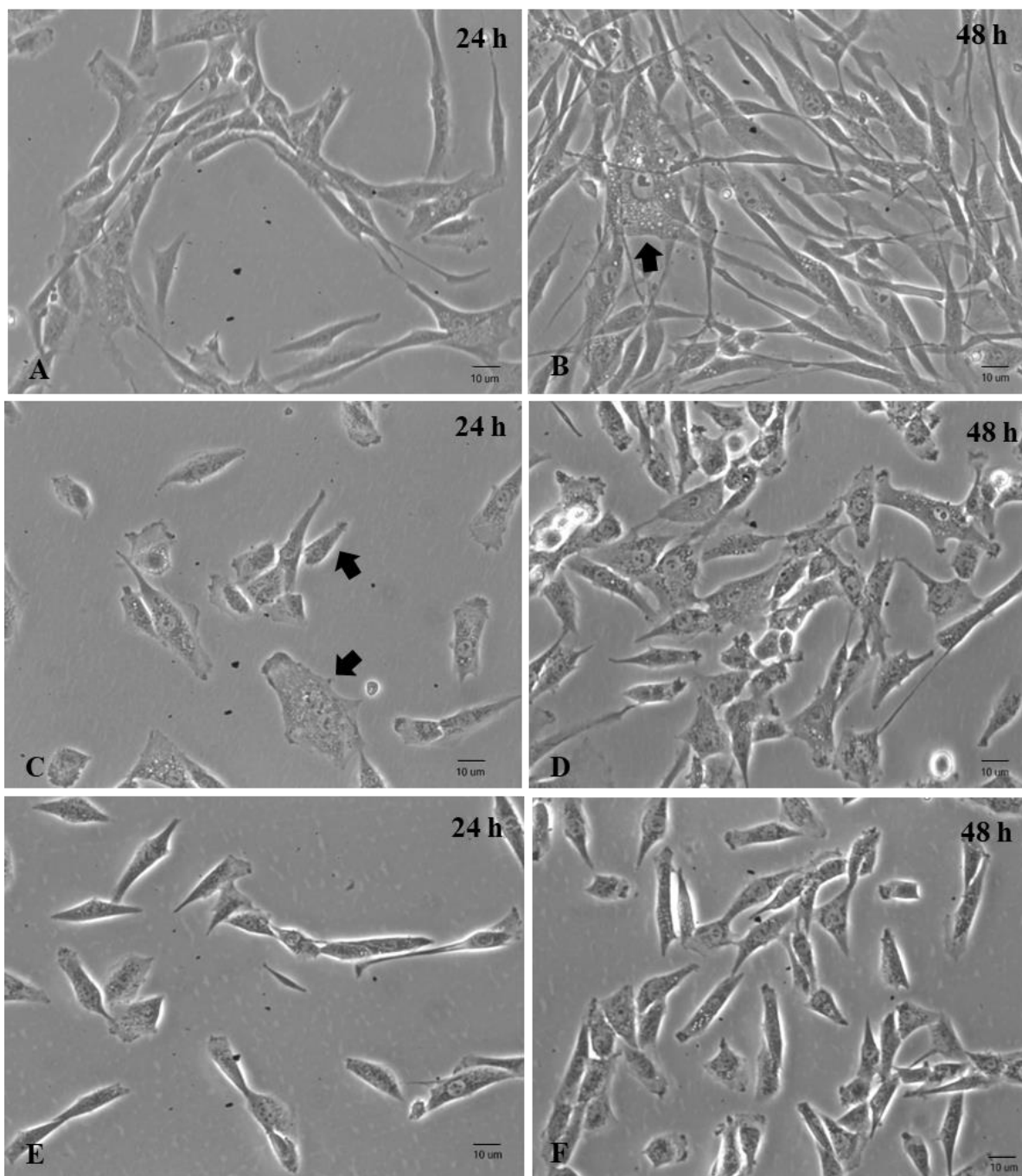
4.1. Morfološke karakteristike mioblasta

Nakon odmrzavanja mioblasta sva tri pacijenta i nasađivanja u pasaži 2, stanice su praćene tijekom nekoliko dana invertnim mikroskopom (Nikon GMHB, Eclipse Ti, Njemačka) pod različitim povećanjima. Na Slici 10. prikazani su mioblasti od sva tri pacijenata pod povećanjem 100x, zabilježeni kamerom DP 23. Mioblasti su vretenastog oblika. Usporedbom slika mioblasta istih pacijenata, ali snimljenih u razmaku 24 sata, može se primijetiti povećanje broja stanica. Morfološki, populacija mioblasta od pacijenta C bez kongenitalne mišićne distrofije, bila je homogenija u odnosu na populaciju mioblasta od pacijenata A i B koji pate od kongenitalne mišićne distrofije.

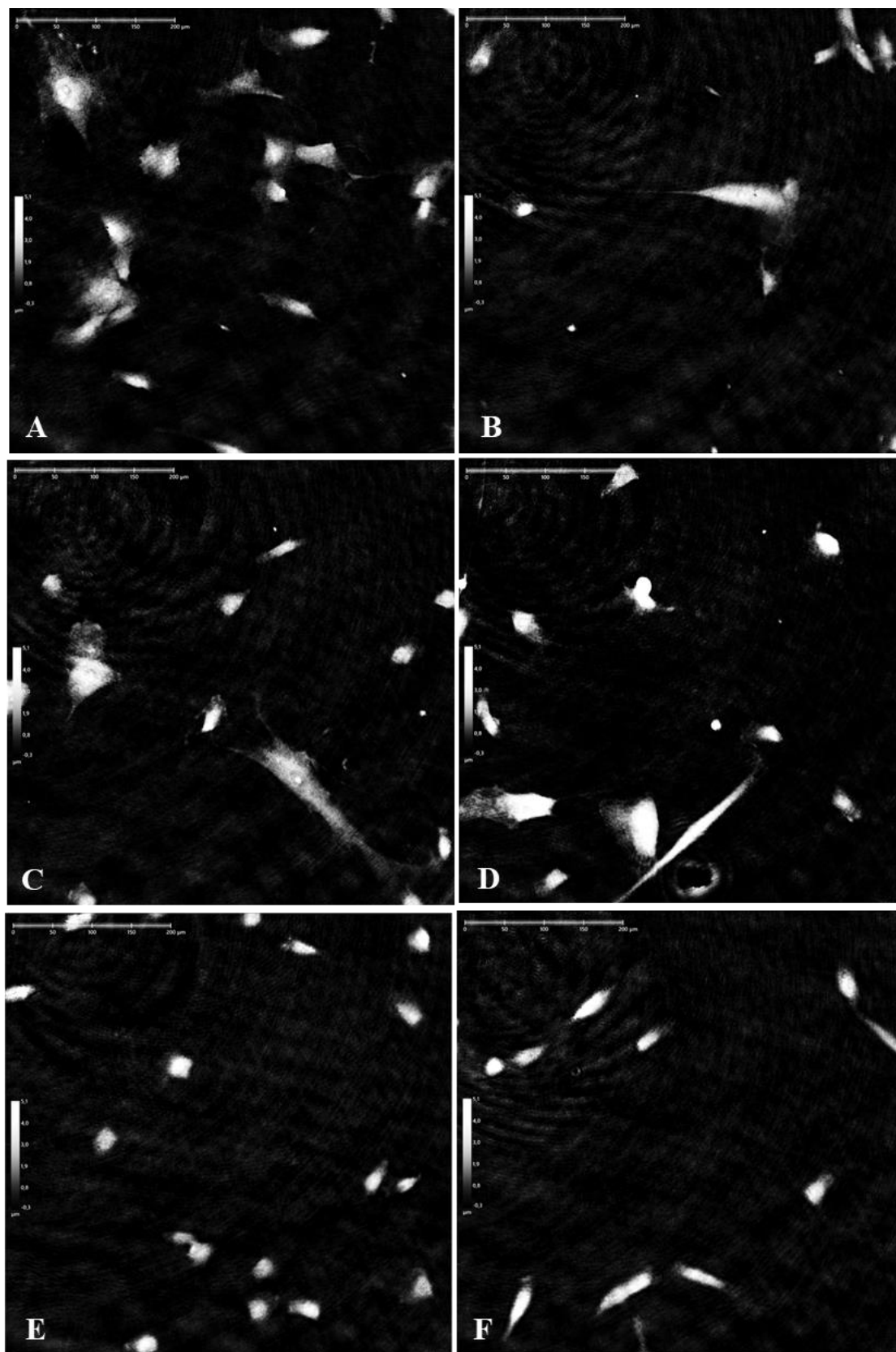
Isto tako su proučavane slike dobivene unutar 10 različitih pozicija za svaki uzorak uz pomoć uređaja HoloMonitor® M4. Primijećeno je da su mioblasti od pacijenta C, koji nema kongenitalnu mišićnu distrofiju, morfološki homogenije u usporedbi s mioblastima od pacijenta A i B s kongenitalnom mišićnom distrofijom. Na Slici 11 prikazane su slike mioblasta pacijenta A, B i C, snimljene u početnom trenutku nasumičnih pozicija, unutar jažica u kojima su bile nasađene netretirane stanice. Na Slici 11 vidi se da su mioblasti od pacijenata A i B s kongenitalnom mišićnom distrofijom, morfološki heterogeniji u odnosu na mioblaste od pacijenta C bez kongenitalne mišićne distrofije. Osim heterogenosti, mioblasti od pacijenata A i B izgledaju veće.

Osim spomenutih morfoloških karakteristika primijećeno je kako mioblasti od pacijenta A sadrže veliki broj vakuola u citoplazmi (Slika 12).

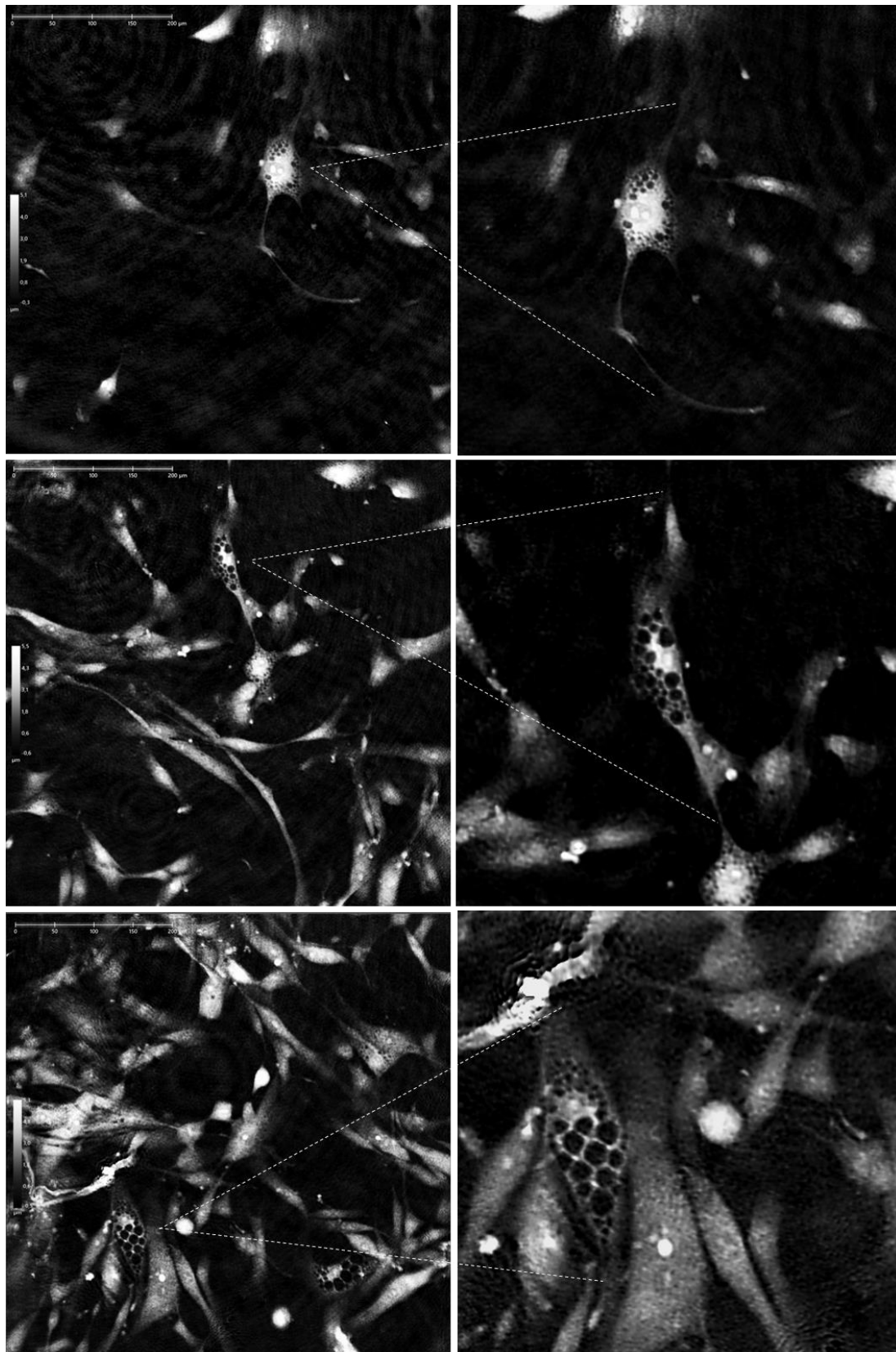
S obzirom na primijećenu razliku u veličini mioblasta među pacijentima, uz pomoć softvera HoloMonitor® Appsuite dobivena je prosječna površina stanica na svakoj slici snimljenoj u početnom trenutku svake pozicije svake jažice. Iz tih podataka izračunata je prosječna površina mioblasta unutar svake jažice, tj. za svaki netretirani uzorak 24 sata nakon nasađivanja, a rezultati su prikazani na Slici 13. Na Slici 13 vidi se kako netretirani mioblasti od pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom (A1 (0) i B1 (0)) imaju veću površinu od netretiranih mioblasta od pacijenta bez kongenitalne mišićne distrofije (C1 (0)). Razlika u izračunatoj prosječnoj površini statistički je značajna.



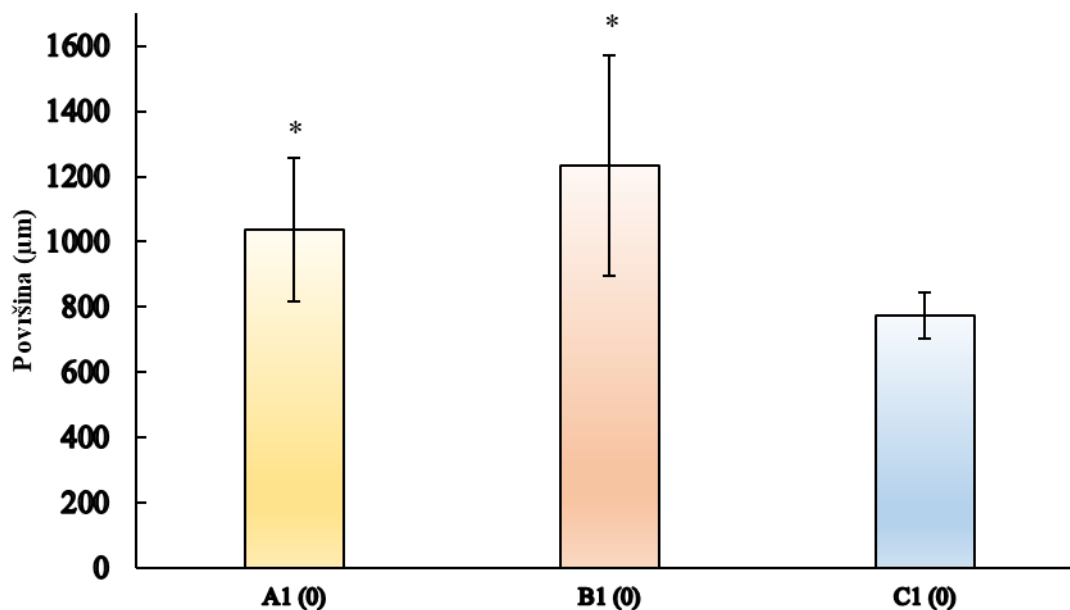
Slika 10. Slika mioblasta u pasaži 2 dobivena invertnim mikroskopom Nikon ECLIPSE TI-U uz pomoć DP 23 kamere pod faznim kontrastom i povećanjem 100x. A i B prikazuju mioblaste od pacijenta A s kongenitalnom mišićnom distrofijom. Stanice su heterogene, a strelica na slici B prikazuje vakuole unutar stanice. C i D prikazuju mioblaste od pacijenta B s kongenitalnom mišićnom distrofijom. Stanice su također heterogene, a strelice na slici C prikazuju površinom veću i manju stanicu. E i F prikazuju mioblaste od pacijenta C bez kongenitalne mišićne distrofije, a vide se homogenije stanice. Slike su snimljene nakon 24 i 48 sati.



Slika 11. Slika mioblata dobivena fazno holografskim mikroskopom HoloMonitor® M4. Slike A-D prikazuju mioblaste od pacijenata A i B s kongenitalnom mišićnom distrofijom, a slike C i D mioblaste od pacijenta C bez kongenitalne mišićne distrofije (prvi dan od nasađivanja).



Slika 12. Slika mioblasta od pacijenta A s kongenitalnom mišićnom distrofijom dobivena fazno holografskim mikroskopom HoloMonitor® M4. Na uvećanim stanicama vidi se veliki broj vakuola u citoplazmi.



Slika 13. Prosječna površina netretiranih mioblasta od pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom (A1 (0) i B1 (0)) te netretiranih mioblasta od pacijenta bez kongenitalne mišićne distrofije (C1 (0)). Rezultati su uspoređeni u svrhu određivanja statističke značajnosti Studentovim T-testom; * $p < 0.05$.

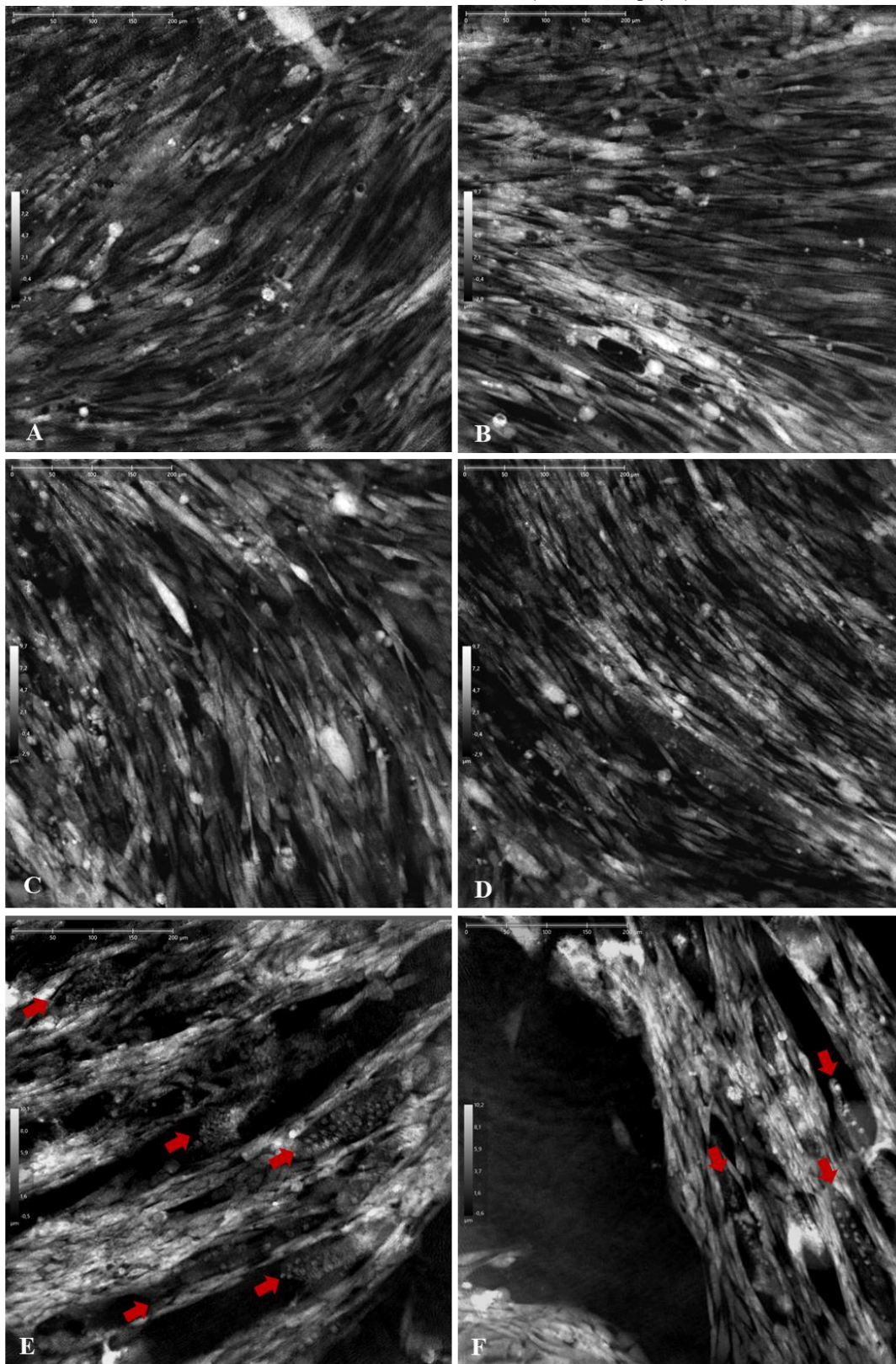
4.2. Stvaranje miotuba

Uređaj HoloMonitor® M4 generirao je sliku svakih 30 minuta unutar 10 pozicija jedne jažice tijekom 72 sata. Budući da je u ovom eksperimentu nasađeno 30000 mioblasta 24 sata prije pokretanja uređaja, stanice su bile poprilično konfluentne te je već nakon 24 sata snimanja softver HoloMonitor® Appsuite imao problema s prepoznavanjem stanica.

S druge strane, zbog visoke konfluentnosti, došlo je do brzog procesa fuzije mioblasta, nastanka višejezgrenih sincicija te na nekim pozicijama, kod netretiranih mioblasta od pacijenta C bez kongenitalne mišićne distrofije, do stvaranja nezrelih mišićnih vlakana ili miotuba (Slika 14). S druge strane, nisu nađene pozicije u kojima su netretirani mioblasti od pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom (A i B) počeli spontano stvarati nezrela mišićna vlakna pri 100 %-tnoj konfluentnosti. Kod mioblasta od pacijenata A i B tretiranih otopinom manoze i galaktoze (1300/140 µM), također nisu primijećene strukture miotuba pri 100 %-tnoj konfluentnosti, dok su mioblasti pacijenta C spontano diferencirali u miotube.

Bez tretmana

Tretman (1300 man/140 gal μ M)



Slika 14. Slika tretiranih i netretiranih mioblata od pacijenata A (slike A i B) i B (slike C i D) s kongenitalnom mišićnom distrofijom te pacijenta C (slike E i F) bez kongenitalne mišićne distrofije dobivena fazno holografskim mikroskopom HoloMonitor® M4 u trenutku 100 %-tne konfluentnosti nakon 72 h. Crvenim strelicama su prikazane miotube.

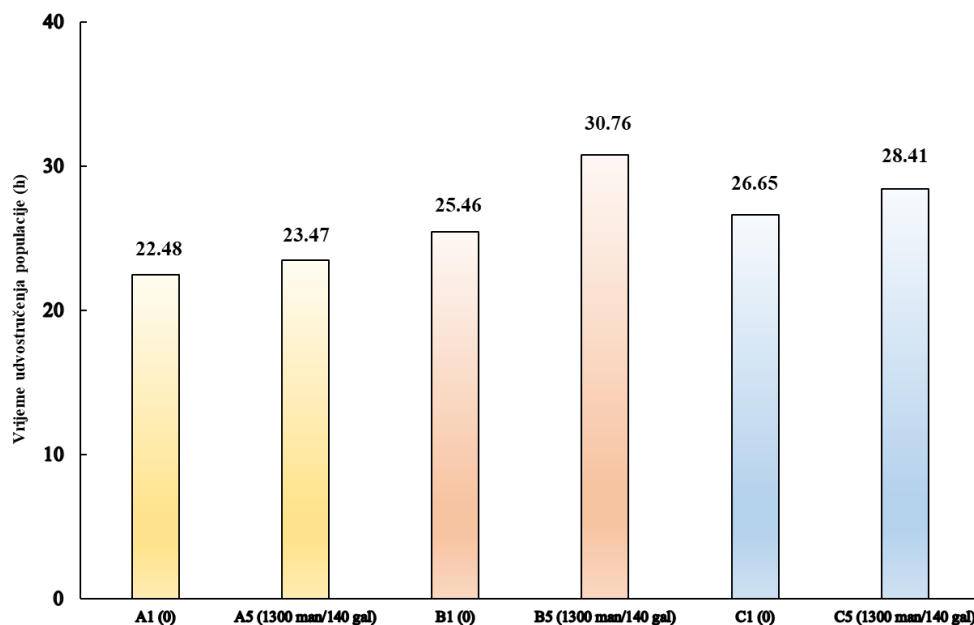
4.3. Vrijeme udvostručenja populacije mioblasta

Vrijeme udvostručenja populacije (PDT od engl. *Population doubling time*) mioblasta izračunato je za netretirane uzorke A1, B1, C1 te uzorke tretirane otopinom manoze i galaktoze (1300/140 μ M). Kako bi se dobile PDT vrijednosti, korištena je formula:

$$PDT = \frac{T \times \log(2)}{\log\left(\frac{N_{kon.}}{N_{poč.}}\right)}$$

u kojoj N_{kon} predstavlja izračunati konačni broj stanica, $N_{poč}$ predstavlja početni nasađeni broj stanica, a T interval u kojem su stanice promatrane (u satima).

Nakon završetka eksperimenta na uređaju HoloMonitor® M4, stanice su prebrojane uz pomoć automatiziranog brojača stanica (LUNA-FX7™). Početni broj nasađenih stanica bio je 20000 po jažici. Vrijeme od nasađivanja do brojanja iznosilo je 96 h. Uz pomoć tih podataka izračunate su PDT vrijednosti. Dobivene PDT vrijednosti prikazane na Slici 15 radi lakšeg snalaženja. PDT vrijednosti variraju između 22 h i 31 h za sve uzorke.



Slika 15. PDT vrijednosti u satima za netretirane mioblaste od pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom A1 (0) i B1 (0) i pacijenta bez kongenitalne mišićne distrofije C1 (0) te tretirane mioblaste od pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom A5 (1300 man/140 gal) i B5 (1300 man/140 gal) i bez kongenitalne mišićne distrofije C5 (1300 man/140 gal).

4.4. Vijabilnost

Osim podataka o broju stanica korištenih za vrijeme udvostručenja populacije, automatizirani brojač stanica utvrdio je podatke o vijabilnosti. Podatci o vijabilnosti prikazani su u *Tablici 7*.

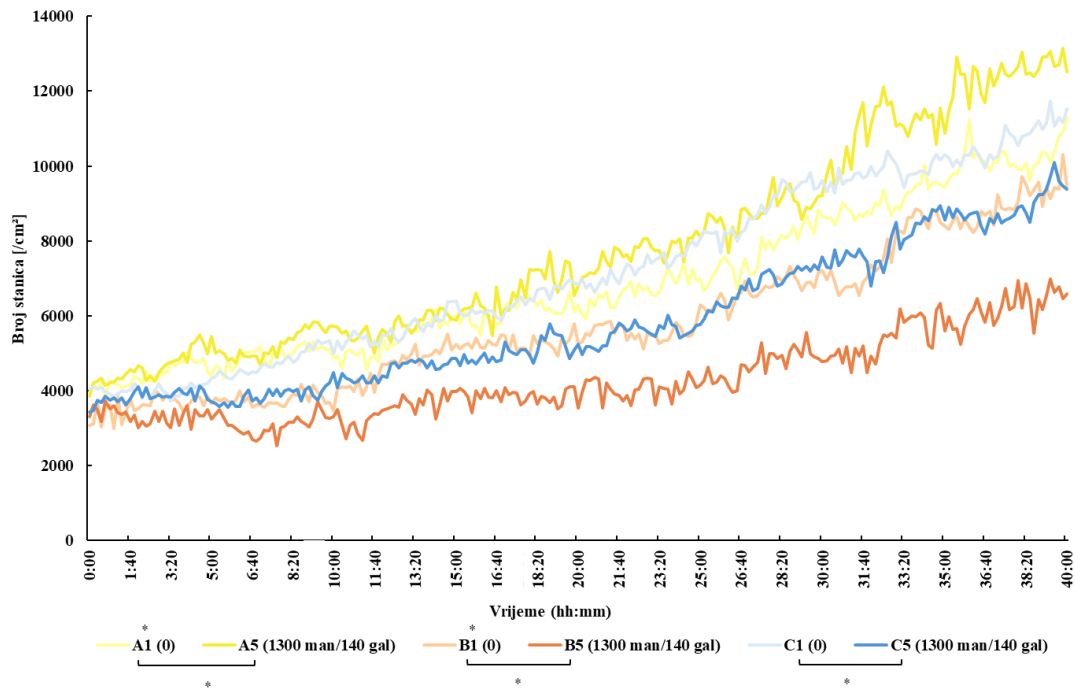
Tablica 7. Vijabilnost mioblasta dobivena uz pomoć automatiziranog brojača stanica (LUNA-FX7™).

Uzorak	Vijabilnost (%)
A1 (0)	99.6
A5 (1300 man/140 gal)	100
B1 (0)	99.5
B5 (1300 man/140 gal)	99.3
C1 (0)	97.5
C5 (1300 man/140 gal)	97.2

4.5. Proliferacija

Uređaj HoloMonitor® M4 generirao je sliku svakih 10 minuta unutar 10 pozicija jedne jažice tijekom 40 sati. Ti podatci su korišteni i obrađeni da bi softver HoloMonitor® Appsuite, uz pomoć automatiziranog algoritma, prepoznao i brojao stanice te na svakoj slici svake pozicije izračunao prosječni broj stanica po cm² jažice. Budući da je u ovom eksperimentu nasadeno 20000 stanica po jažici, a pozicije su pregledane prije pokretanja uređaja i po potrebi promijenjene kako bi bile što manje konfluentne, softver nije imao problema s prepoznavanjem stanica.

Na Slici 16 nalazi se grafički prikaz broja stanica po cm² u ovisnosti o vremenu. Krivulje svih uzoraka pokazuju porast broja stanica kroz vrijeme. Netretirani mioblasti od pacijenata A (A1 (0)) i B (B1 (0)) s kongenitalnom mišićnom distrofijom pokazuju statistički značajno sporiji porast broja stanica u odnosu na mioblaste od pacijenta C (C1(0)) bez kongenitalne mišićne distrofije. Kod pacijenata B i C vidi se statistički značajan pad u brzini porasta broja tretiranih mioblasta (B5 (1300 man/140 gal) i C5 (1300 man/140 gal)) u odnosu na netretirane. Kod pacijenta A primijećen je statistički značajan brži porast broja tretiranih mioblasta (A5 (1300 man/140 gal μ)) u odnosu na netretirane mioblaste (A1(0)).

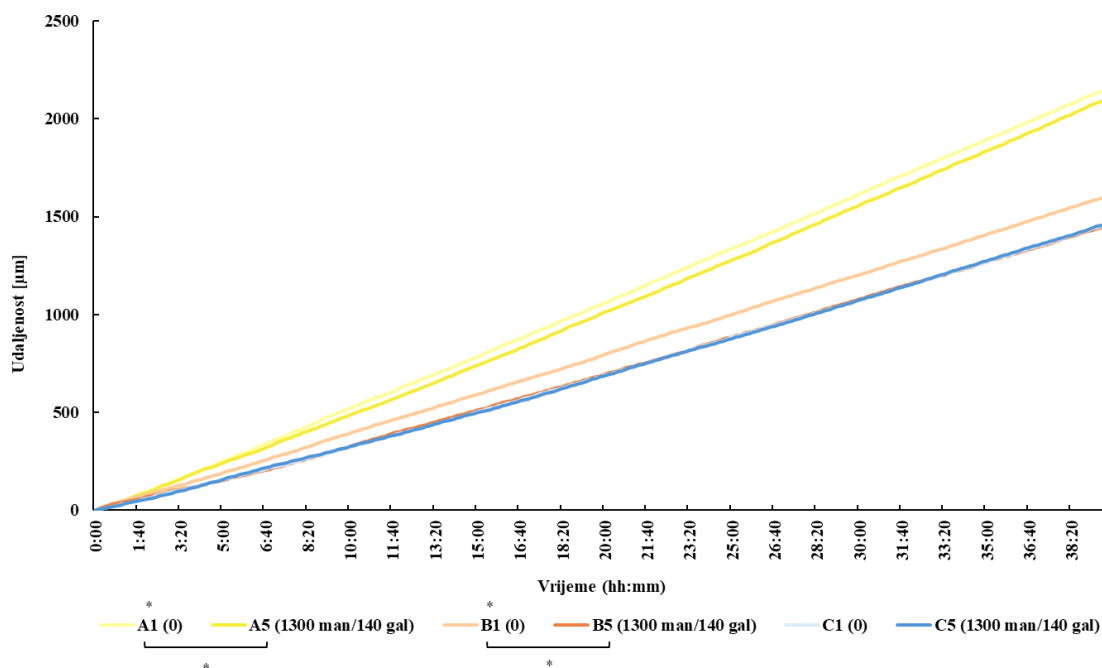


Slika 16. Grafički prikaz porasta broja mioblasta po cm^2 jažice za svaki uzorak u ovisnosti o vremenu. Rezultati su uspoređeni u svrhu određivanja statističke značajnosti dvosmjernim ANOVA testom s Tukeyjevom procedurom; $*p < 0.05$.

4.6. Pokretljivost

Softver HoloMonitor® Appsuite također ima mogućnost izračuna prosječne udaljenosti koje stanice prođu u navedenom vremenu. Prosječnu udaljenost softver izračunava uz pomoć srednje brzine stanice u određenom vremenskom razdoblju. Što je veća prosječna udaljenost koju mioblasti prođu, kreću se većom prosječnom brzinom. Podatci dobiveni uz pomoć uređaja HoloMonitor® M4, koji je generirao sliku svakih 10 minuta, iz eksperimenta u kojem je nasadeno 20000 stanica po jažici, obrađeni su uz pomoć softvera.

Na Slici 17 nalazi se grafički prikaz prosječne udaljenosti koju stanice prođu u ovisnosti o vremenu. Vrijednosti udaljenosti za uzorke C1(0), C5 (1300 man/140 gal) i B5 (1300 man/140 gal) poklapaju se, a zbog toga se neki pravci koji predstavljaju vrijednosti za ove uzorke na grafičkom prikazu Slike 17 ne vide. Postoji statistički značajna razlika između srednje brzine netretiranih mioblasta od pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom A1(0) i B1(0) u odnosu na tretirane mioblaste (1300 man/140 gal) istih pacijenata u 40 sati. Također, netretirani mioblasti od pacijenata A (A1(0)) i B (B1(0)) imaju statistički značajnu veću prosječnu brzinu od netretiranih mioblasta od pacijenta C (C1(0)), što je također vidljivo na grafičkom prikazu Slike 17.



Slika 17. Grafički prikaz prosječne udaljenosti koje prođu mioblasi svih uzoraka u ovisnosti o vremenu. Vrijednosti udaljenosti uzoraka C1 (0), C5 (1300 man/140 gal) i B5 (1300 man/140 gal) se poklapaju što rezultira slabo vidljivim pravcima koji predstavljaju ove vrijednosti. Rezultati su uspoređeni u svrhu određivanja statističke značajnosti dvosmjernim ANOVA testom s Tukeyjevom procedurom; * $p < 0.05$.

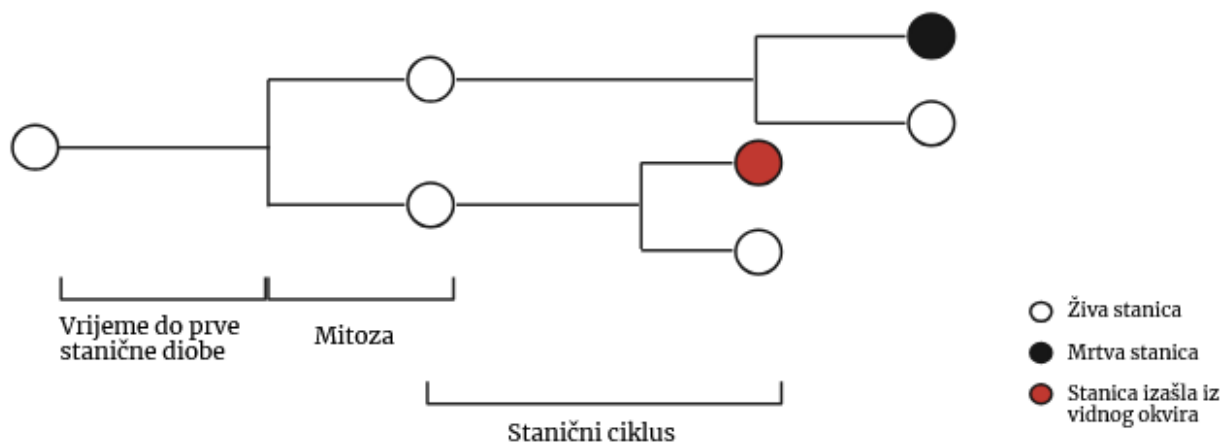
4.7. Vizualizacija kinetike stanica

Budući da softver nema mogućnost kvantifikacije procesa poput stanične diobe i stanične smrti, odlučeno je pratiti 3 mioblasta po jažici, odnosno 18 stanica ukupno, koje su ušle u diobu te njihovo potomstvo tijekom 40 sati. Tijekom stanične diobe, mioblast se uzdigne i poprimi kružni oblik, što rezultira mitozom i završava pojavom dvije stanice kćeri. Kod procesa stanične smrti, stanica se također uzdiže i poprima kružni oblik, ali ta promjena morfologije rezultira smanjenjem površine i lizom, nakon koje mioblast više nije uzdignut i ne kreće se.

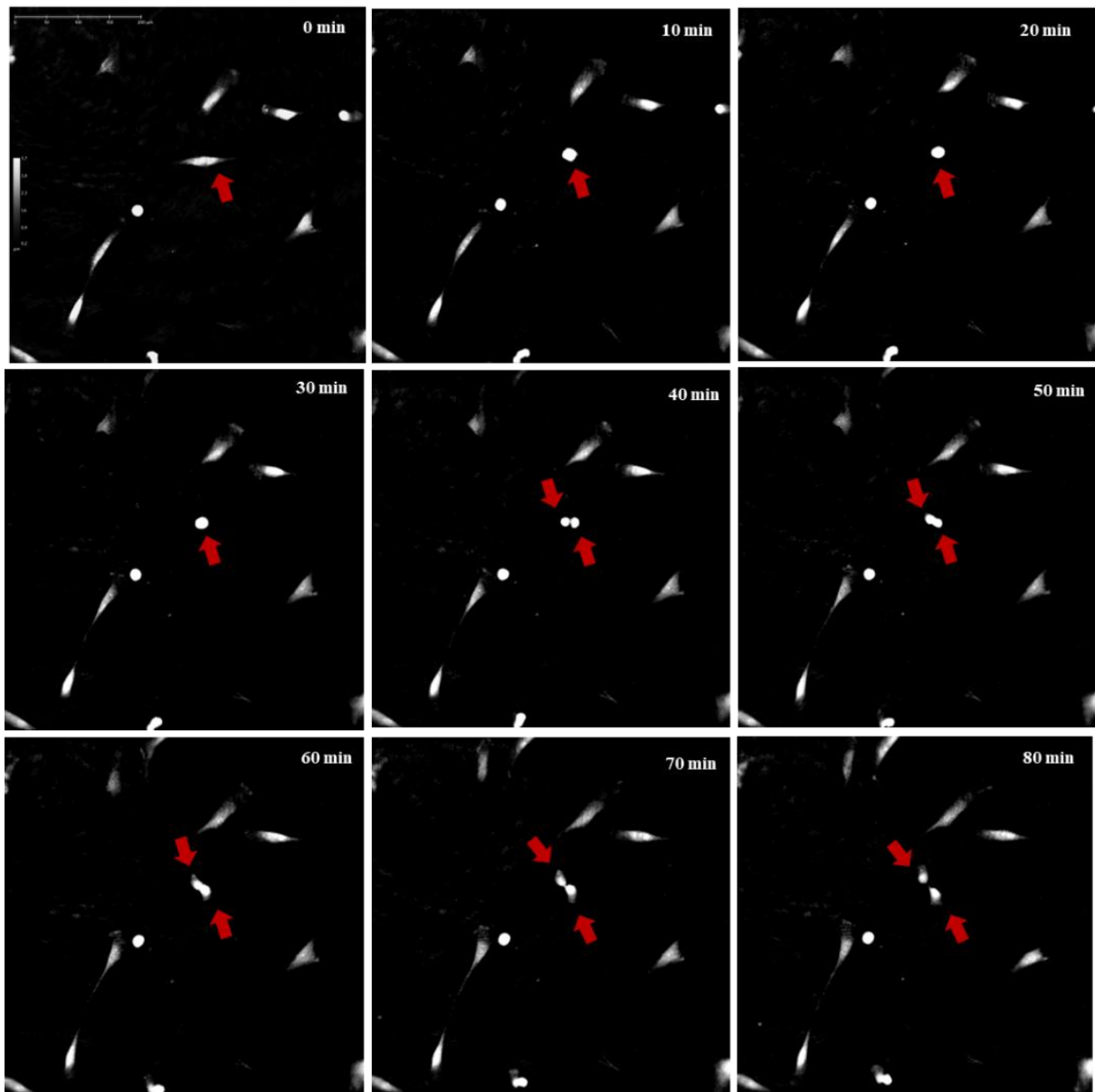
Za svaku proučavanu stanicu mjereno je potrebno vrijeme od početka snimanja do početka mitoze, na Slici 18 označeno kao "vrijeme do prve stanične diobe". Kao početak mitoze gledan je trenutak u kojem je stanica poprimila kružni oblik, a kao kraj pojava dvije stanice kćeri koje su poprimile vretenasti oblik specifičan za mioblaste. Zatim su gledane stanice kćeri te njihova sudbina u daljnjem praćenju (apoptoza ili dioba). Budući da se za početnu gledanu stanicu ne zna u kojem je dijelu staničnog ciklusa bila tijekom početka snimanja, vrijeme od završetka prve stanične diobe, u kojoj su nastale dvije stanice kćeri, do završetka diobe svake od stanice kćeri, korišteno je u izračunu trajanja staničnog ciklusa (Slika 18). S obzirom na staničnu pokretljivost mioblasta treći mogući gledani ishod bio je izlazak iz vidnog okvira snimanja.

Na Slici 19 je prikazan proces stanične diobe kroz slike s vremenskim odmakom od 10 minuta. Mioblast koji je prošao kroz proces mitoze vidi se na 2D te uvećanom 3D prikazu *Slike 20*. Stanica koja je prošla kroz proces apoptoze pokazana je na 2D te uvećanom 3D prikazu *Slike 21*.

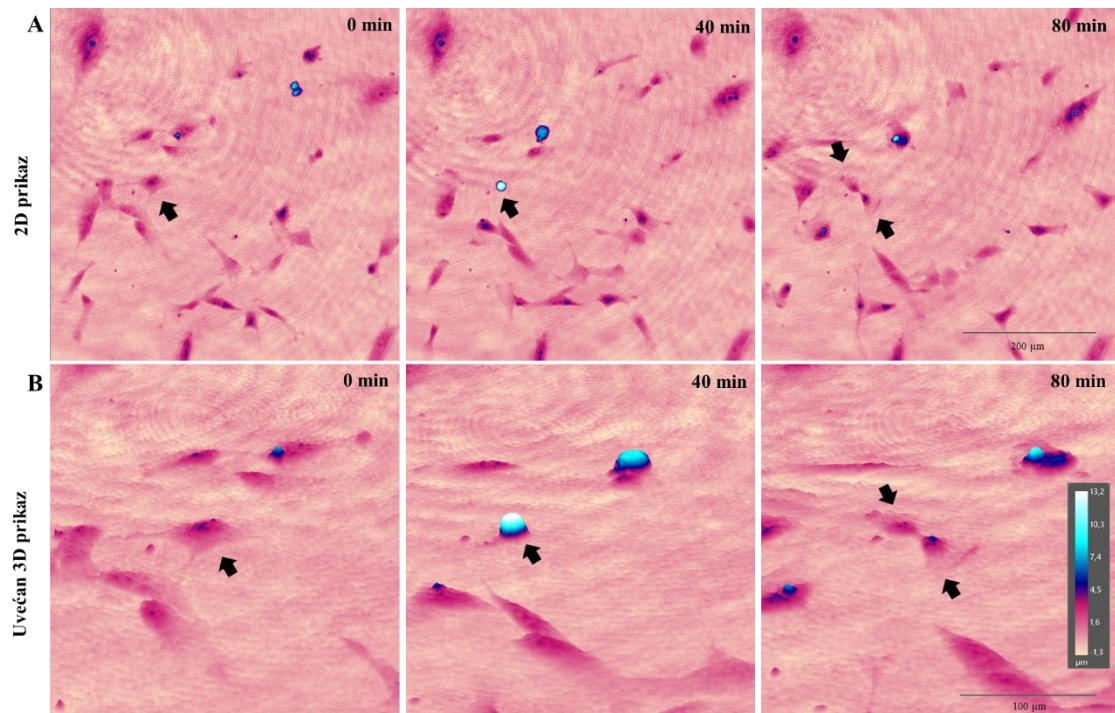
Vrijeme trajanja mitoze variralo je između 0.5 h i 1.5 h unutar populacije, ali i među uzorcima. Vrijeme do prve stanične diobe je variralo između 1 h i 15 h u svim uzorcima, što je pokazalo da proces stanične diobe nije koordiniran unutar stanične populacije, a da su mioblasti u početnom trenutku snimanja bili u različitim fazama staničnog ciklusa. Trajanje staničnog ciklusa variralo je unutar populacije, ali i među uzorcima i iznosilo između 10 h i 26 h. Iako je je trajanje staničnog ciklusa variralo među uzorcima, ali i unutar populacije stanica istog uzorka, uočene su slične vrijednosti trajanja staničnog ciklusa među sestričkim satnicama (Slika 22).



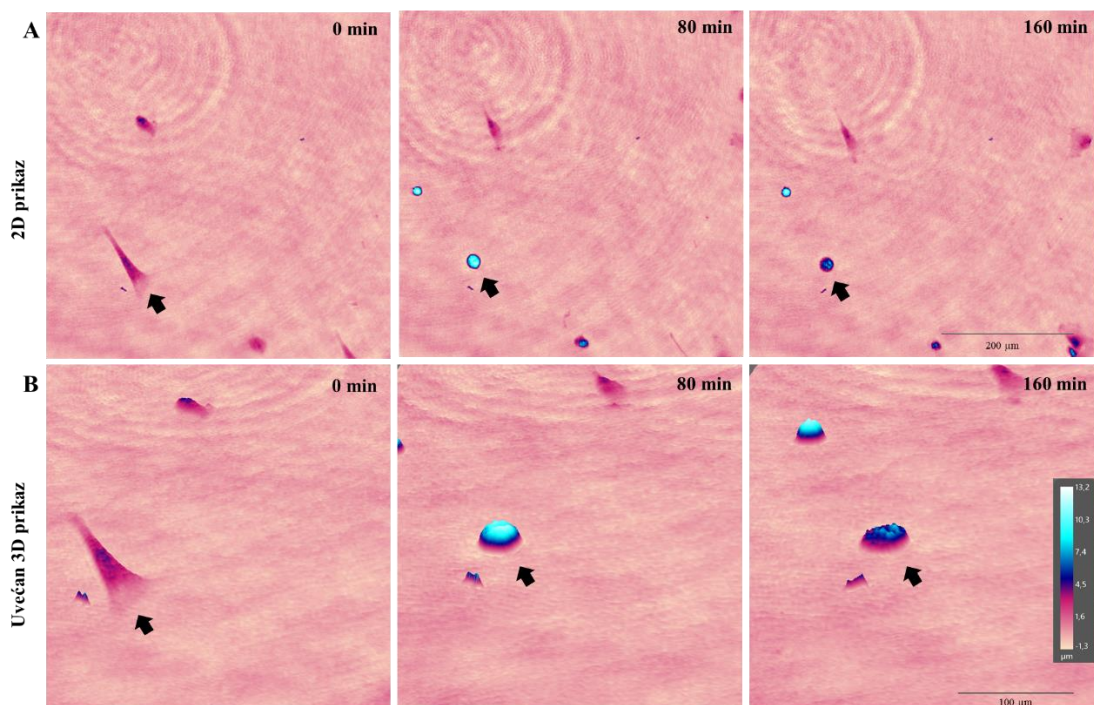
Slika 18. Shema sudbine hipotetskog mioblasta praćenog tijekom 40 sati. „Vrijeme do prve stanične diobe” predstavlja potrebno vrijeme od početka snimanja do početka mitoze za proučavan mioblast, a „stanični ciklus” predstavlja vrijeme od završetka prve stanične diobe u kojem su nastale dvije stanice kćeri do završetka diobe svake od stanice kćeri.



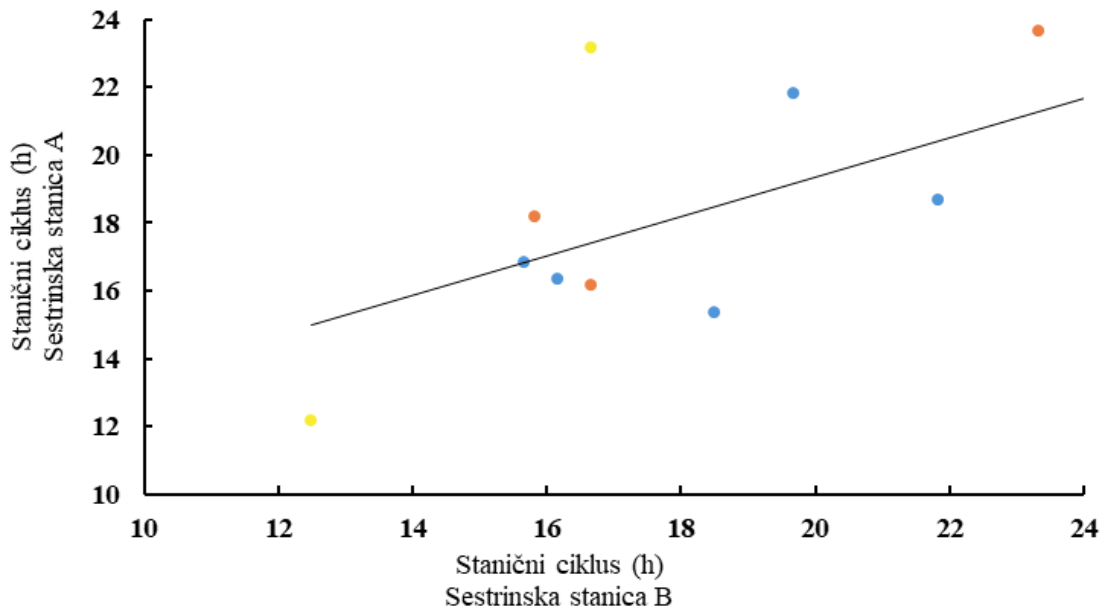
Slika 19. Slika mioblasta koji prolazi kroz proces stanične diobe dobivena fazno holografskim mikroskopom HoloMonitor® M4. Proces stanične diobe prikazan je kroz slike s vremenskim odmakom od 10 minuta. U početnoj točki (0 minuta) crvenom strelicom je prikazan mioblast koji će ući u diobu, a u završnoj točki (80 minuta) strelicama su prikazane stanice kćeri nakon završene mitoze.



Slika 20. Slika mioblasta koji prolazi kroz proces stanične diobe dobivena fazno holografskim mikroskopom HoloMonitor® M4. Proces stanične diobe prikazan je kroz slike s vremenskim odmakom od 40 minuta u 2D prikazu (slika A) te uvećanom 3D prikazu (slika B). Strelicom je označena praćena stanica.



Slika 21. Slika mioblasta koji prolazi kroz proces stanične smrti dobivena fazno holografskim mikroskopom HoloMonitor® M4. Proces stanične smrti prikazan je kroz slike s vremenskim odmakom od 80 minuta u 2D prikazu (slika A) te uvećanom 3D prikazu (slika B). Strelicom je označena praćena stanica.



Slika 22. Grafički prikaz trajanja staničnog ciklusa sestrinskih stanica, za sestrinsku stanicu A na y-osi, a sestrinsku stanicu B na x-osi. Žutim oznakama označeno je trajanje staničnog ciklusa sestrinskih mioblasta od pacijenta A (kongenitalna mišićna distrofija), crvenim oznakama od pacijenta B (kongenitalna mišićna distrofija), a plavim oznakama od pacijenta C (bez kongenitalne mišićne distrofije). Postoji korelacija srednje jačine za trajanje staničnog ciklusa između sestrinskih stanica (Pearsonov koeficijent korelacije iznosi 0.58).

4.8. Promjena ekspresije gena

Nakon tretmana mioblasta manozom i galaktozom u različitim koncentracijama (50-1000 μM) i kombinaciji (1300/140 μM) uspješno je izolirana RNA iz stanica. RNA je tretirana DNazom te reverznom transkripcijom uspješno je prepisana u cDNA. Metodom qPCR dobivene su Ct vrijednosti (broj ciklusa koji je potreban da fluorescencija uzorka bude viša od pozadinskog signala) za gene *DAG1*, *POMT2*, *PPARGC1A*, *SOD1*, *CAT*.

4.8.1. Analiza ekspresije gena *DAG1* i *POMT2*

Prije samog početka obrade podataka, Ct vrijednosti dobivene za *POMT2* kalibrirane su između pokretanja qPCR-a (engl. *Inter-run calibration*) kako bi se uskladili podaci dobiveni iz različitih PCR ciklusa (pokretanja), radi eliminacije varijacija između njih. Ct vrijednosti za netretirane uzorke A1 (0), B1 (0) i C1 (0) normalizirane su u odnosu na uprosječenu Ct vrijednost tehničkih triplikata β -aktina. Tako su dobivene ΔCt vrijednosti. ΔCt vrijednosti su nakon toga normalizirane u odnosu uprosječenu ΔCt vrijednost tehničkih triplikata za kontrolni netretirani uzorak C1 (0) (RNA izolirana iz netretiranih mioblasta od pacijenta bez kongenitalne mišićne distrofije). Tako su dobivene $\Delta\Delta\text{Ct}$ vrijednosti. Iz dobivenih $\Delta\Delta\text{Ct}$ vrijednosti izračunata je razlika u razini ekspresije, odnosno faktor promjene (engl. *Fold change*) uz pomoć

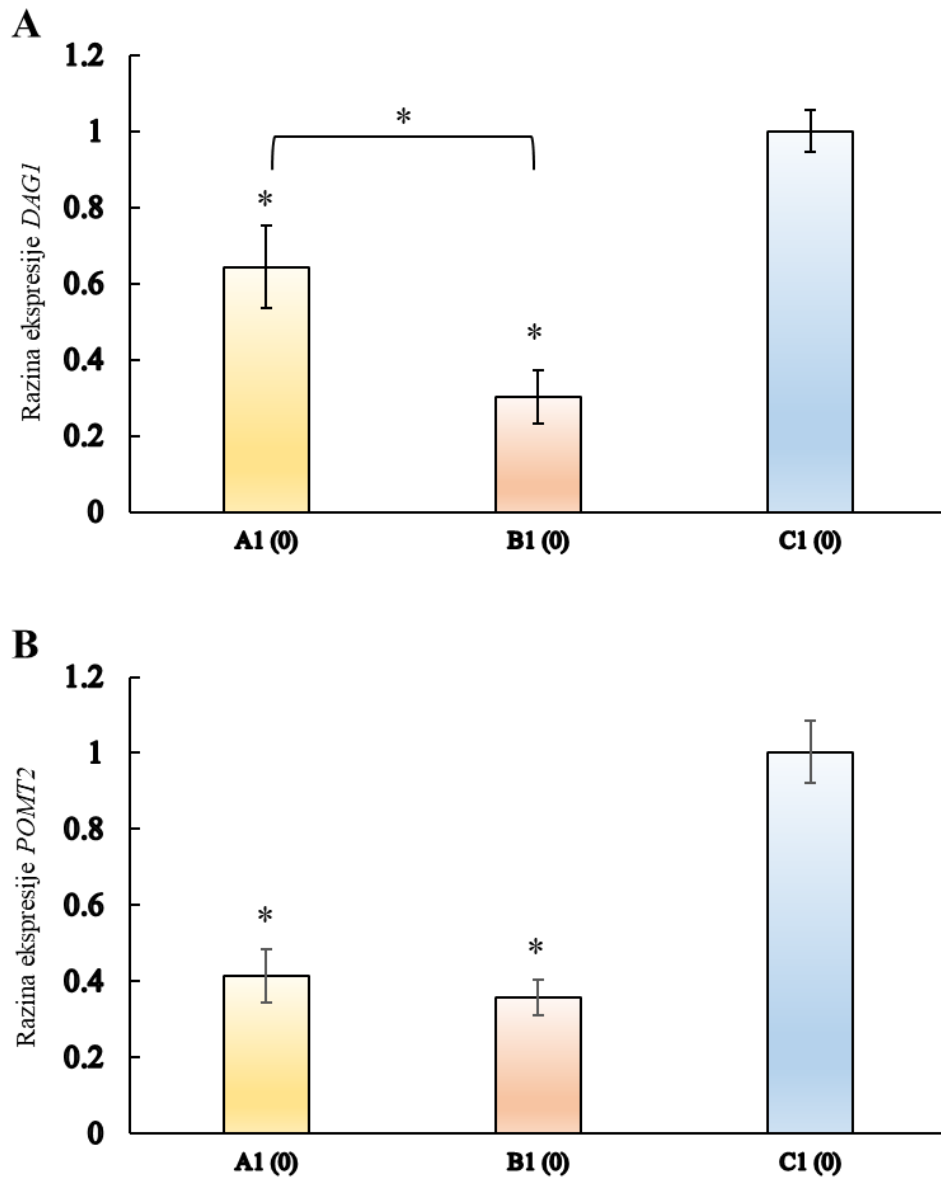
formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Uprosječeni triplikati vrijednosti faktora promjene za gene *POMT2* i *DAG1* grafički su prikazani na Slici 23.

Na Slici 23 vidi se kako uzorci A1 (0) i B1 (0) (netretirani mioblasti od pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom) imaju manju ekspresiju gena *DAG1* i *POMT2* u odnosu na C1 (0) (netretirani mioblasti od pacijenta bez kongenitalne mišićne distrofije). Osim toga, primijećena je razlika u razini ekspresije *DAG1* između netretiranih mioblasta od pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom. Uzorak B1 (0) ima statistički značajno manju ekspresiju *DAG1* od uzorka A1 (0).

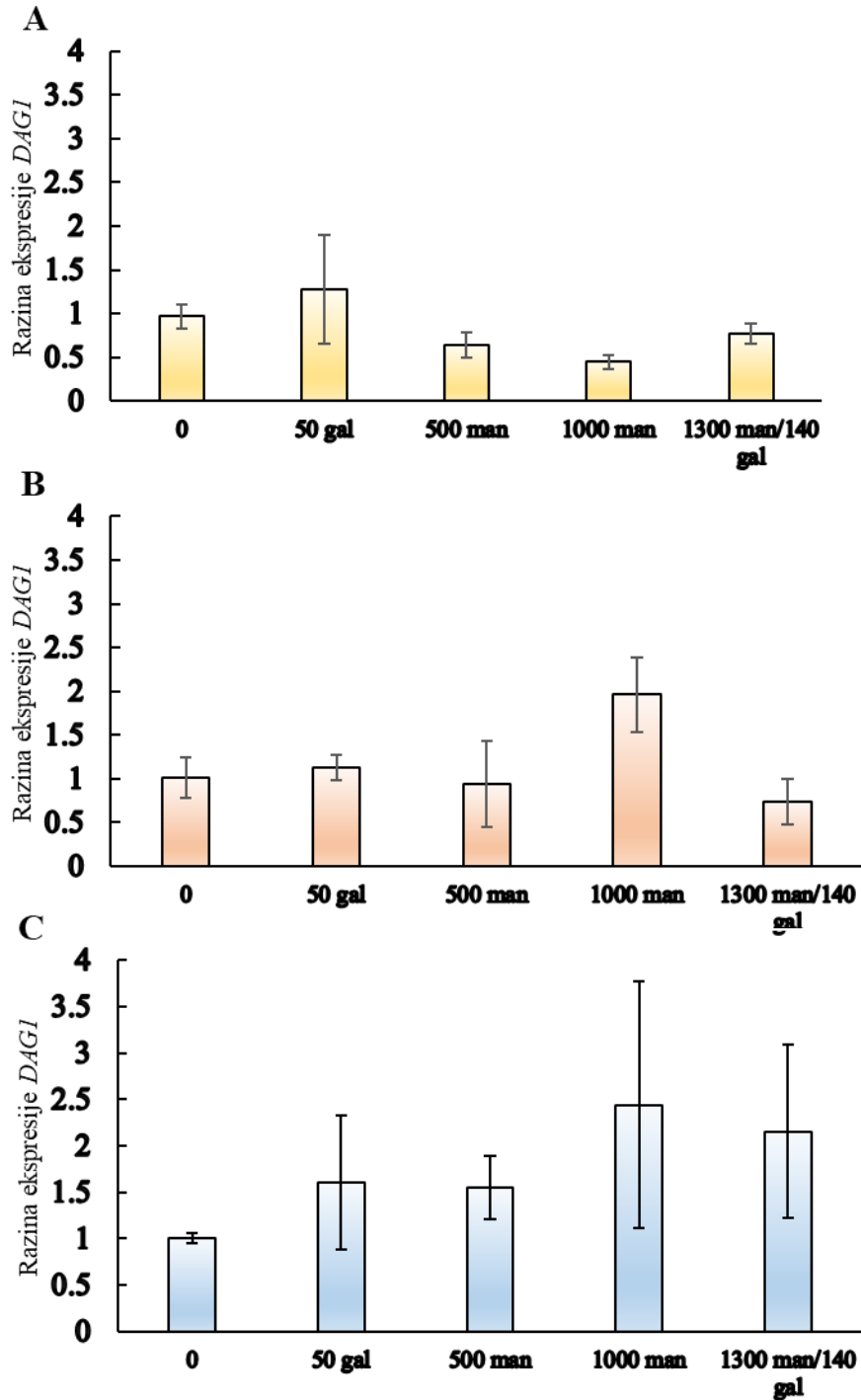
Osim toga, Ct vrijednosti za sve uzorke normalizirane su u odnosu na uprosječenu Ct vrijednost tehničkih triplikata β -aktina. Nakon toga su ΔCt vrijednosti dobivene za RNA iz tretiranih mioblasta od pacijenta A s kongenitalnom mišićnom distrofijom normalizirane u odnosu na A1 (0) (RNA izolirana iz netretiranih mioblasta). Na isti način su ΔCt vrijednosti za tretirane uzorke B normalizirane u odnosu na B1 (0), a za uzorke C u odnosu na C1 (0). Iz dobivenih $\Delta\Delta Ct$ vrijednosti izračunata je razlika u razini ekspresije tj. faktor promjene uz pomoć formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Triplikati vrijednosti faktora promjene za gen *DAG1* uprosječeni su te grafički prikazani na Slici 24. Na Slici 25 prikazani su triplikati vrijednosti faktora promjene za gen *POMT2*.

Na Slici 24 vidi se kako tretiranjem mioblasta od pacijenata A i B s kongenitalnom mišićnom distrofijom te pacijenta C bez kongenitalne mišićne distrofije nema statistički značajne promjene u ekspresiji *DAG1*.

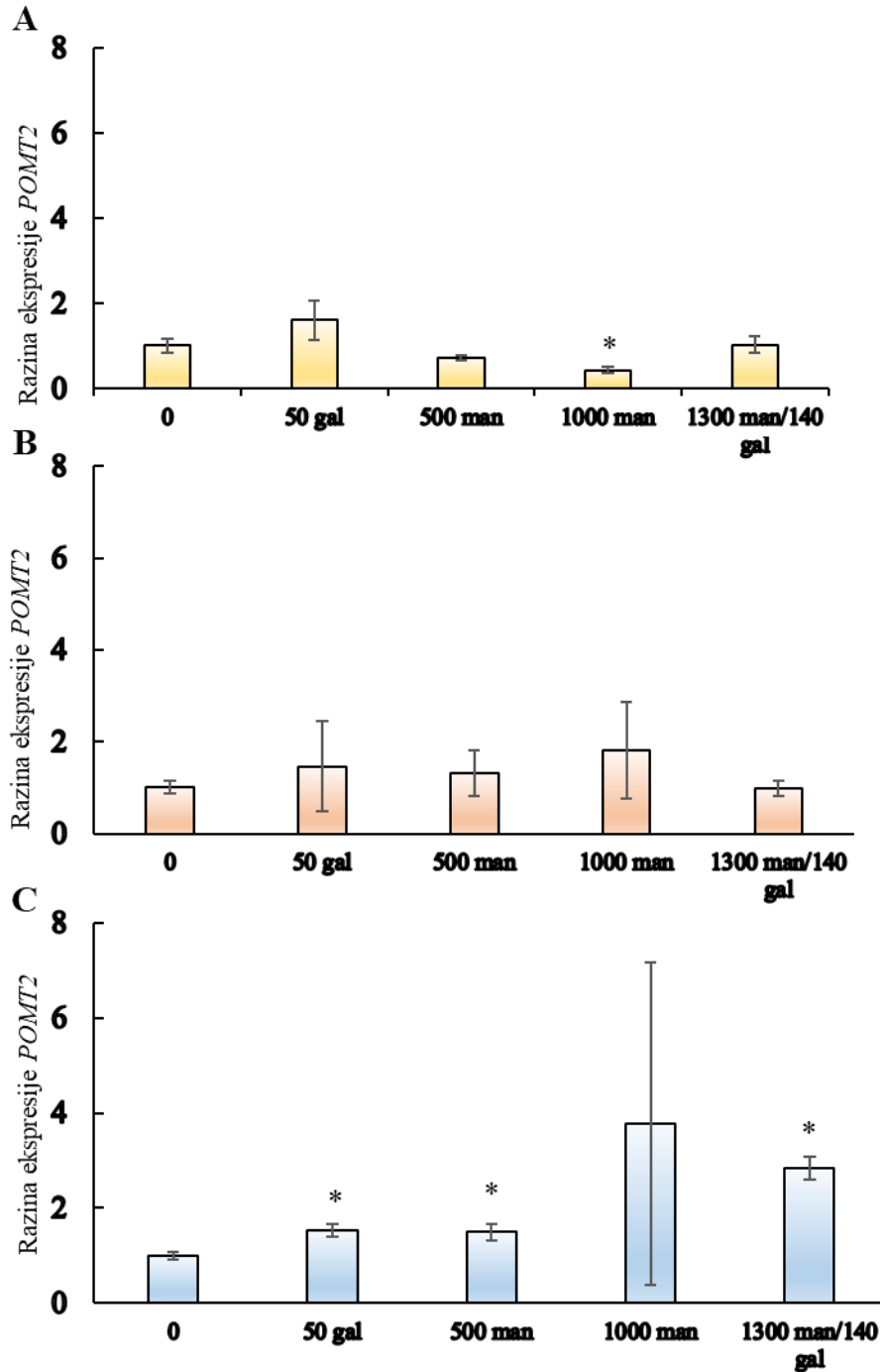
Slika 25 pokazuje kako određene koncentracije tretmana (50 μM gal, 500 μM man), kao i tretman manoze i galaktoze u kombinaciji (1300/140 μM), rezultiraju povećanom razinom ekspresije *POMT2* kod mioblasta od pacijenta C bez kongenitalne mišićne distrofije.



Slika 23. Usporedba ekspresije gena *DAG1* (slika A) i *POMT2* (slika B) dobivenih iz ukupne izolirane RNA netretiranih mioblasta od pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom (A1 (0) i B1 (0)) u odnosu na RNA izoliranu iz mioblasta od pacijenta bez kongenitalne mišićne distrofije (C1 (0)). Rezultati su prikazani kao razina ekspresije \pm standardna devijacija. Rezultati su uspoređeni u svrhu određivanja statističke značajnosti Welch-ovim T-testom; * $p < 0.05$.



Slika 24. Usporedba ekspresije gena *DAG1* dobivena iz ukupne izolirane RNA iz mioblasta od pacijenta A (slika A) i pacijenta B (slika B) s kongenitalnom mišićnom distrofijom te pacijenta C (slika C) bez kongenitalne mišićne distrofije tretiranih manozom i galaktozom u različitim koncentracijama (50-1000 μM) i kombinaciji (1300/140 μM) u odnosu na RNA izoliranu iz netretiranih mioblasta (0 μM). Rezultati su prikazani kao razina ekspresije \pm standardna devijacija. Rezultati su uspoređeni u svrhu određivanja statističke značajnosti Welch-ovim T-testom; * $p < 0.05$.

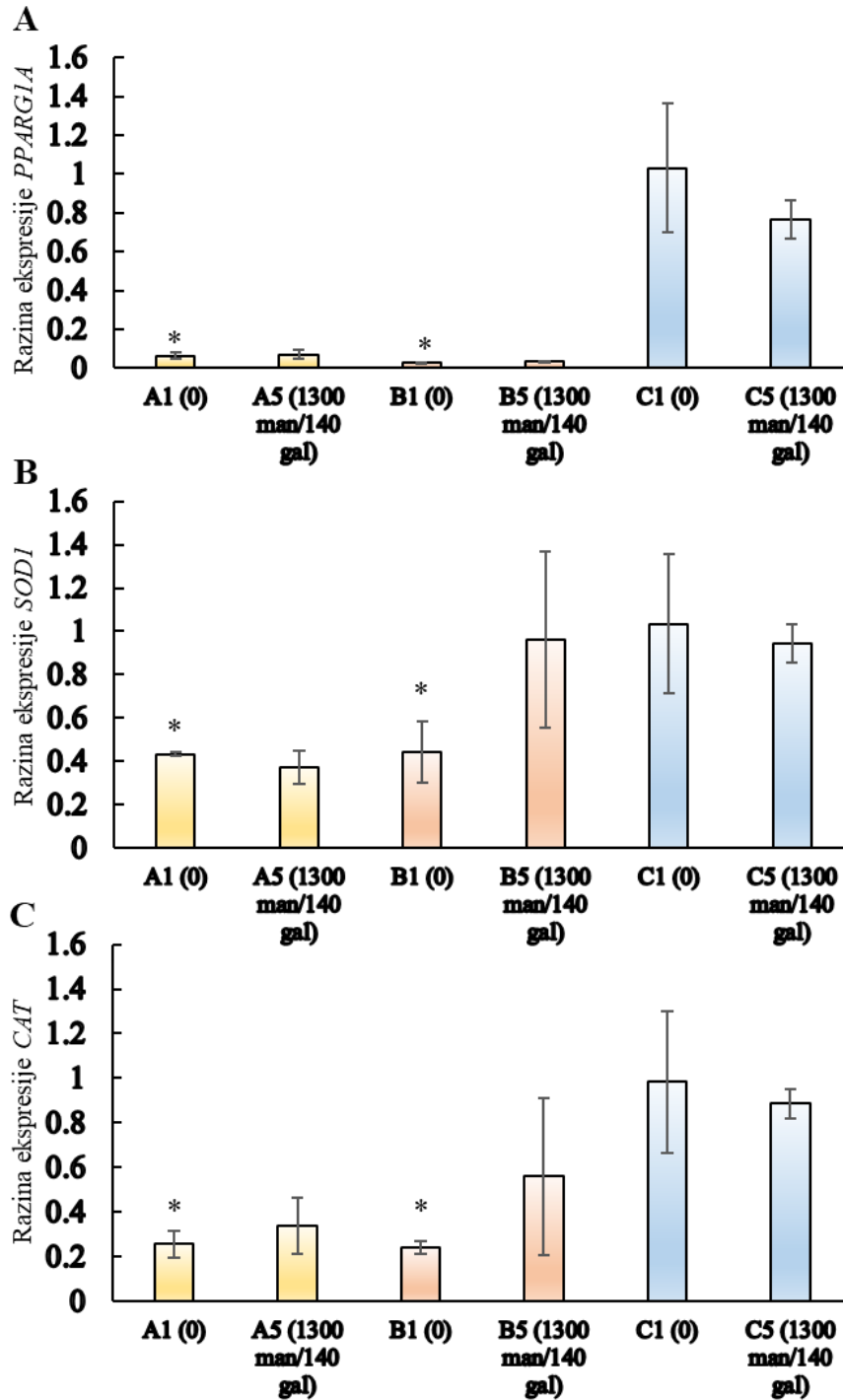


Slika 25. Usporedba ekspresije gena *POMT2* dobivena iz ukupne izolirane RNA iz mioblasta od pacijenta A (slika A) i pacijenta B (slika B) s kongenitalnom mišićnom distrofijom te pacijenta C (slika C) bez kongenitalne mišićne distrofije tretiranih manozom i galaktozom u različitim koncentracijama (50-1000 μ M) i kombinaciji (1300/140 μ M) u odnosu na RNA izoliranu iz netretiranih mioblasta (0 μ M). Rezultati su prikazani kao razina ekspresije \pm standardna devijacija. Rezultati su uspoređeni u svrhu određivanja statističke značajnosti Welch-ovim T-testom; * $p < 0.05$.

4.8.2. Analiza ekspresije gena *PPARGCIA*, *SOD1* i *CAT*

Prije početka obrade podataka, Ct vrijednosti dobivene za *PPARGCIA*, *SOD1* i *CAT* kalibrirane su između pokretanja qPCR-a kako bi se uskladili podaci dobiveni iz različitih PCR ciklusa te se eliminirale varijacije između njih. Ct vrijednosti dobivene za uzorke A1 (0), B1 (0), C1 (0), A5 (1300 man/140 gal μ M), B5 (1300 man/140 gal μ M) i C5 (1300 man/140 gal μ M) normalizirane su u odnosu na uprosječenu Ct vrijednost tehničkih triplikata β -aktina. Δ Ct vrijednosti su nakon toga normalizirane u odnosu uprosječenu Δ Ct vrijednost tehničkih triplikata za uzorak C1 (0) (RNA izolirana iz netretiranih mioblasta od pacijenta bez kongenitalne mišićne distrofije). Tako je napravljeno za vrijednosti dobivene za sva tri gena. Iz dobivenih $\Delta\Delta$ Ct vrijednosti izračunata je razlika u razini ekspresije tj. faktor promjene uz pomoć formule $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Uprosječeni triplikati vrijednosti faktora promjene za gene *PPARGCIA*, *SOD1*, *CAT* grafički su prikazani na Slici 26.

Na Slici 26 vidi se kako je ekspresija gena za *PPARGCIA* te gena za antioksidacijske enzime (*SOD1*, *CAT*) kod uzoraka A1 (0) i B1 (0) (netretirani mioblasti od pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom) statistički značajno smanjena u usporedbi s uzorkom C1 (0) (netretirani mioblasti od pacijenta bez kongenitalne mišićne distrofije).



Slika 26. Usporedba ekspresije gena *PPARGC1A* (slika A), *SOD1* (slika B) i *CAT* (slika C) dobivena iz ukupne izolirane RNA iz mioblasta od pacijenta bez (C5) i s kongenitalnom mišićnom distrofijom (A5 i B5) tretiranih manozom i galaktozom (1300/140 μ M) te istih netretiranih mioblasta (A1 (0) i B1(0)) u odnosu na RNA izoliranu iz netretiranih mioblasta od pacijenta bez kongenitalne mišićne distrofije (C1 (0)). Rezultati su prikazani kao razina ekspresije \pm standardna devijacija. Rezultati su uspoređeni u svrhu određivanja statističke značajnosti Welch-ovim T-testom; * $p < 0.05$.

5. RASPRAVA

5.1. Morfologija mioblasta

U ovom istraživanju, već prvog dana nakon nasađivanja, primijećeno je da su mioblasi od pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom statistički značajno veće površine te morfološki heterogeniji u odnosu na kontrolne mioblaste. Hernández-Almaraz i sur. (2022) pratili su morfološke karakteristike mioblasta od zdravih pacijenata, uključujući površinu, tijekom 39 dana u kulturi. Pokazali su kako tijekom procesa razvoja mišićnih stanica u kulturi, koji uključuje migraciju, proliferaciju i diferencijaciju, mioblasi prolaze kroz cikličke promjene u veličini stanica, pri čemu mijenjaju duljinu aktinskih filamenata, oblik i površinu stanice. Iako su procese pokretljivosti, proliferacije i diferencijacije obilježavale morfološke razlike među stanicama, razlike nisu bile vidljive prvi dan od nasađivanja, a mioblasi su unutar različitih kultura bili homogeni. Delaporte i sur. (1984) jedini su dosad opisali morfološke karakteristike mioblasta pacijenata s DMD-om u usporedbi s kontrolnim mioblastima. U svom su istraživanju primijetili da su kulture mioblasta pacijenata s DMD-om heterogene. Također su uočili da određene stanice odskaču veličinom i oblikom, dok se kontrolni mioblasi unutar kulture nisu značajno razlikovali.

Osim spomenutih morfoloških razlika, u ovom je radu primijećeno da mioblasi od pacijenta A, koji boluje od kongenitalne mišićne distrofije, sadrže velik broj vakuola ili lizosoma u citoplazmi. Malatesta i sur. (2011) primijetili su povećan broj lizosoma u mioblastima izoliranim iz pacijenata s miotoničnom distrofijom tipa 2 te su sugerirali da bi takva pojava mogla biti rezultat nepravilne regulacije sustava za degradaciju proteina u stanicama. Poznato je da nekoliko tipova mišićnih distrofija, uključujući kongenitalne mišićne distrofije, imaju nepravilnu regulaciju sustava za degradaciju proteina (Sandri i sur. 2013). Moguće je da poremećaj sustava koji upravlja degradacijom proteina putem lizosomske hidrolize dovodi do stvaranja povećanog broja vakuola u citoplazmi mioblasta. Stanični obrambeni mehanizam degradacije, poznat kao nonsense posredovana degradacija mRNA (NMD od engl. Nonsense-mediated decay), aktivira se kada mutacija u genu rezultira sintezom mRNA s preuranjenim stop kodonom (Peccarelli i Kebaara 2014). Wengrod i sur. (2013) predložili su da NMD može inhibirati sustav degradacije proteina putem lizosoma. Poznato je da mutacija c.786G>A u genu *POMT2* pacijenta A rezultira preuranjenim stop kodonom, a veliki broj vakuola prisutan u mioblastima tog pacijenta mogao bi biti povezan s ovim mehanizmom.

5.2. Stvaranje miotuba

U ovom je istraživanju samo kod kontrolnih netretiranih, ali i tretiranih mioblasta uspješno vizualizirano spontano stvaranje miotuba tijekom četiri dana. U starijim literaturnim navodima (Blau i sur. 1983) i (Delaporte i sur. 1984) pokazano je da su mioblasti od pacijenata s DMD-om *in vitro* imali sporiji proces diferencijacije tijekom stvaranja miotuba u odnosu na kontrolne mioblaste. U to vrijeme, proces izolacije mioblasta, kao i uspostavljanje i praćenje stanične kulture, nije bio razvijen kao danas. Danas je poznato da mioblasti, nakon što dosegnu visoku konfluentnost, spontano diferenciraju i stvaraju strukture nezrelih mišićnih vlakana *in vitro* (Topman i sur. 2011). Većina novijih istraživanja koja su se bavila procesom fuzije mioblasta u miotube temeljena je na besmrtnim staničnim linijama dobivenim iz mioblasta izoliranih nakon biopsije. U takvim istraživanjima ove stanične linije omogućuju prevladavanje ograničenog kapaciteta proliferacije mioblasta u kulturi. U jednom takvom istraživanju, Mamchaoui i sur. (2011) koristili su besmrtne stanične linije mioblasta izoliranih iz pacijenata s pet različitih tipova mišićnih distrofija, uključujući i kongenitalnu mišićnu distrofiju. Prema njihovim rezultatima, sve besmrtne stanične linije mioblasta uspješno su diferencirale i stvorile miotube unutar pet dana praćenja. Kako bi se moglo raspravljati, zašto u ovom istraživanju kod mioblasta od pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom vizualizacija miotuba nije bila uspješna, stanične kulture trebalo bi imunobožati na teški lanac miozina. Ekspresija teškog lanca miozina aktivna je nakon diferencijacije mioblasta u miotube (Noë i sur. 2022). Tek tada bi se moglo procijeniti je li problem bio u vizualizaciji ili u samom mehanizmu stvaranja miotuba.

5.3. Vrijeme udvostručenja populacije mioblasta i proliferacija

PDT vrijednosti izračunate u ovom istraživanju za sve stanice variraju između 22 i 31 h. Podaci o vremenu udvostručenja populacije mioblasta variraju ovisno o literaturnom izvoru. Lorenzon i sur. (2004) izračunali su PDT vrijednost za mioblaste izolirane iz pacijenata različite dobi pri čemu su za najmlađeg pacijenta izračunate PDT vrijednosti varirale između 24 i 29 h.

U ovom istraživanju pokazano je da mioblasti od pacijenta s kongenitalnom mišićnom distrofijom imaju statistički značajan manji proliferativni kapacitet u odnosu na mioblaste od pacijenata bez kongenitalne mišićne distrofije. Prvotno su Blau i sur. (1983) te Delaporte i sur. (1984) pokazali da mioblasti od pacijenata s DMD-om pokazuju smanjeni proliferativni kapacitet u odnosu na kontrolne mioblaste. Bitno je napomenuti da u to vrijeme metoda purifikacije mišićnih satelitnih stanica nakon izolacije od ostalih stanica, poput fibroblasta, nije bila u potpunosti usavršena. Kasnije, nakon usavršavanja metode purifikacije, Mamchaoui i sur. (2011) pokazali su da mioblasti, ne samo od pacijenata s DMD-om, nego i ostalih tipova

mišićne distrofije, uključujući kongenitalnu mišićnu distrofiju, ne pokazuju smanjenje proliferativnog kapaciteta *in vitro* u odnosu na kontrolne mioblaste.

Tretman manozom i galaktozom (1300/140 μM) pokazuje statistički značajan negativni učinak na proliferativni kapacitet mioblasta od pacijenata B i C. Iako je poznato da određene koncentracije manoze imaju negativni utjecaj na proliferativni kapacitet tumorskih stanica (Gonzalez i sur. 2018), točan mehanizam utjecaja manoze na proliferaciju slabo je poznat i nije potvrđen. Pretpostavlja se da dodavanje visokih koncentracija manoze uzrokuje nakupljanje manoze-6-fosfata, što stanice ne mogu učinkovito metabolizirati. Manoza-6-fosfat tada inhibira metabolizam glukoze i snižava unutarstaničnu koncentraciju ATP-a (DeRossi i sur. 2006). Bitno je napomenuti da se mehanizmi u tumorskim stanicama razlikuju od onih u mioblastima, a dostupna literatura ne nudi dodatne podatke koji bi povezali učinak manoze na proliferativni kapacitet mioblasta. S druge strane, tretman manozom i galaktozom (1300/140 μM) pokazuje statistički značajan pozitivan učinak na proliferativni kapacitet mioblasta od pacijenta A s kongenitalnom mišićnom distrofijom.

5.4. Vijabilnost

Vijabilnost je mjera koja pokazuje broj živih, zdravih stanica u uzorku i može biti pokazatelj utjecaja tretmana na stanice u kulturi (Kamiloglu i sur. 2020). Ako je postotak vijabilnosti u kulturi veći od 80 %, stanična kultura se smatra zdravom (Segeritz i Vallier 2017). U ovom istraživanju postotak vijabilnosti svih uzoraka mioblasta, neovisno o tome jesu li bili podvrgnuti tretmanu ili ne, bio je vrlo visok u trenutku mjerenja i iznosio između 97 % i 100 %.

5.5. Pokretljivost

Kako bi tijekom stvaranja miotuba izvršili procese adhezije i fuzije membrane, mioblasi moraju uspješno migrirati (Knudsen i Horwitz 1977). Pokretljivost stanica, koja omogućava njihovu migraciju i fuziju, nije bitna samo u razvoju, već i u procesu regeneracije mišića tijekom ozljede (Demonbreun i sur. 2015). Jansen i Pavlath (2006) primijetili su da mioblasi s null mutacijom za manozni receptor, koji se *in vitro* kreću sporije u usporedbi s kontrolnim mioblastima, pokazuju migracijske nepravilnosti tijekom regeneracije mišića *in vivo*. U ovom istraživanju opaženo je da netretirani mioblasi od pacijenata A i B s kongenitalnom mišićnom distrofijom pokazuju statistički značajno veću brzinu kretanja u odnosu na kontrolne mioblaste pacijenta C. Witkowski' And i Dubowitz (1985) istraživali su pokretljivost mioblasta od pacijenata s DMD-om, uspoređujući ih s kontrolnim mioblastima i mioblastima od nositelja mutacije za DMD. Njihovi rezultati pokazali su da mioblasi od pacijenata s DMD-om imaju

veću brzinu kretanja *in vitro* u odnosu na kontrolne mioblaste i mioblaste nositelja, pri čemu je samo razlika u odnosu na mioblaste nositelja bila statistički značajna. Povećana brzina migracije često se povezuje s regenerativnim kapacitetom, no u kontekstu DMD-a i kongenitalne mišićne distrofije potrebno je uzeti u obzir i druge čimbenike, poput fuzije i diferencijacije mioblasta, koji također imaju ulogu u procesu regeneracije mišićnog tkiva.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da tretman manozom i galaktozom (1300/140 μ M) smanjuje brzinu kretanja mioblasta od pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom, dok na mioblaste od pacijenta C, koji nema kongenitalnu mišićnu distrofiju, nije imao učinak. To može upućivati na moguću regulatornu ulogu monosaharida u staničnoj migraciji te postojanje razlika u migracijskim svojstvima mioblasta u različitim patološkim stanjima.

5.6. Kinetika mioblasta

Budući da je apoptoza u svakoj populaciji stanica u ovom istraživanju bila rijedak događaj, što potvrđuje izmjereni visoki postotak vijabilnih mioblasta, odlučeno je detaljnije pratiti stanice kćeri i trajanje staničnog ciklusa. Izračunato trajanje mitoze variralo je između 0.5 h i 1.5 h, što je u skladu s podacima iz literature koji navode trajanje mitoze za ljudske mioblaste (Bischoff i Holtzer 1969), (Konigsberg i sur. 1978), (Gross i Rotwein 2013). Iako je trajanje staničnog ciklusa variralo unutar populacije i među uzorcima, primijećena je korelacija srednje jačine trajanja staničnog ciklusa između sestrinskih mioblasta. Slično tome, Gross i Rotwein (2013) su, unatoč varijacijama u trajanju staničnog ciklusa unutar populacije, pokazali čvrstu korelaciju trajanja staničnog ciklusa za sestrinske mioblaste, za razliku od nedostatka korelacije za trajanje staničnog ciklusa kod nasumično uspoređivanih stanica.

5.7. Analiza ekspresije gena *DAG1* i *POMT2*

α -distroglikan i β -distroglikan prevode se s iste prekursorske mRNA, koja se prepisuje s gena za distroglikan (*DAG1*) te se posttranslacijski obrađuju u α i β podjedinicu. Zbog toga se ekspresija α -distroglikana u ovom radu pratila kroz razinu mRNA *DAG1*. Primjenom metode qPCR, uočeno je da je ekspresija *DAG1* kod mioblasta od pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom smanjena u odnosu na ekspresiju *DAG1* kod kontrolnih mioblasta. Smanjena ekspresija α -distroglikana primijećena je kod pacijenata s DMD-om te u *mdx* mišu (Matsumura i Campbell 1994). Također, smanjena ekspresija α -distroglikana uočena je i kod drugih tipova mišićnih distrofija uzrokovanih mutacijama u proteinu sarkoglikanu (Hack i sur. 2000). Yang i sur. (2024) imunohistokemijskom su metodom primijetili smanjenu ekspresiju α -distroglikana kod pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom uzrokovanom mutacijom u genu

POMT2, no nisu predložili razlog ovakvog obrasca ekspresije. Bitno je spomenuti da je u ovom istraživanju primijećeno kako mioblasti od pacijenta B imaju manju razinu ekspresije gena *DAG1* u odnosu na mioblaste od pacijenta A. Poznato je da pacijent B ima težu kliničku sliku od pacijenta A. Brown i sur. (2004) pokazali su da je smanjenje ekspresije α -distrogljikana izravno povezano s težinom kliničke slike pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom uzrokovanom mutacijama u genu *FKRP*.

Osim smanjenje ekspresije α -distrogljikana, mioblasti od pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom pokazuju i smanjenu ekspresiju gena *POMT2* u odnosu na kontrolne mioblaste. Poznato je da kongenitalna mišićna distrofija, odnosno distrogljikanopatija, nastaje uslijed mutacija u genu *POMT2*, koje utječu na aktivnost enzima *POMT2* te posljedično i na obrazac glikozilacije α -distrogljikana (Kanagawa 2021). Međutim, nisu poznata istraživanja koja bi potvrdila obrazac smanjene ekspresije gena *POMT2* opažen u ovom istraživanju. Lualdi i sur. (2006) pokazali su da mutacije u genu mogu utjecati na razinu mRNA detektiranu metodom qPCR. Ako mutacija rezultira preuranjenim stop kodonom, NMD uklanja transkripte RNA, što se na metodi qPCR očituje kao smanjena ekspresija. Već je spomenuto da mutacija c.786G>A, prisutna u genu *POMT2* pacijenta A, rezultira preuranjenim stop kodonom. Mutacija c.248+1G>C, prisutna u genu *POMT2* pacijenta B, utječe na mjesto prekrajanja jer se nalazi na donorskom mjestu spajanja introna, što može rezultirati pomakom okvira čitanja i posljedično dovesti do preuranjenog stop kodona. García-Rodríguez i sur. (2020) pokazali su da mutacije koje uzrokuju preuranjene stop kodone u genu za distrofin, što rezultira DMD-om, također utječu na sintezu mRNA.

Dodatkom određenih koncentracija (50-1000 μ M) i kombinacije (1300/140 μ M) manoze i galaktoze u medij u kojem su se nalazili mioblasti pacijenata A i B, uočene su fluktuacije u razini ekspresije gena *POMT2* i *DAG1*, no one nisu bile statistički značajne. S obzirom na osjetljivost metode qPCR, male promjene u razini ekspresije nisu dovoljne za donošenje zaključaka o učinku tretmana na mRNA razini. Stoga, mioblasti pacijenata A i B nisu pokazali značajne promjene ekspresije *POMT2* i *DAG1* tijekom tretmana manozom i galaktozom. Cataldi i sur. (2018) primijetili su da dodatak ribitola kao suplementa *FKRP* mutantnim miševima djelomično vraća funkcionalnu glikozilaciju α -distrogljikana. Predložili su da povećana koncentracija CDP-ribitola u organizmu rezultira povećanom dostupnošću supstrata za enzimsku reakciju, a time omogućuje mišićnim vlaknima da nadoknade gubitak funkcije enzima *FKRP* pojačavanjem aktivnosti već sintetiziranog enzima, pri čemu je ova mogućnost ovisna o samoj mutaciji. Ortiz-Cordero i sur. (2021) potvrdili su da u *FKRP* mutiranim

miotubama, ribitol doista normalizira glikozilaciju α -distroglikana, ali samo kod mutacija koje ne utječu na fundamentalnu ulogu katalitičke domene enzima FKRP. U ovom istraživanju, kod tretiranih mioblasta od pacijenta C, koji ne boluje od kongenitalne mišićne distrofije i nema poznatu mutaciju koja bi mogla utjecati na funkciju enzima POMT2, uočava se statistički značajno povećana razina ekspresije gena *POMT2*. Iako su u ranijim studijama opisani potencijalni mehanizmi djelovanja monosaharida na glikozilaciju, oni nisu povezani s učinkom tretmana na mRNA razini. Zbog mehanizma NMD-a, koji uzrokuje brzu degradaciju mRNA, mutacije koje dovode do preuranjenih stop kodona mogu smanjiti ekspresiju mRNA. Ovaj mehanizam može objasniti zašto tijekom tretmana mioblasta s mutacijama u genu *POMT2* nije došlo do promjena u ekspresiji. Stoga, iako dodatak manoze i galaktoze može potencijalno utjecati na ekspresiju enzima u zdravim stanicama, u prisutnosti mutacija koje uzrokuju NMD, može se pretpostaviti da će ekspresija mRNA ostati smanjena, što se može povezati s degradacijom mRNA koja nosi preuranjeni stop kodon.

5.8. Analiza ekspresije gena *PPARGC1A*, *SOD1* i *CAT*

Kada su mišićna vlakna izložena oksidacijskom stresu, dolazi do povećane ekspresije gena uključenih u antioksidacijske obrambene mehanizme, uključujući *CAT* i *SOD1* (Kramer i Goodyear 2007). Povišena ekspresija ovih gena često ukazuje na povećanu razinu oksidacijskog stresa. U ovom istraživanju, opaženo je smanjenje ekspresije gena *CAT* i *SOD1* u mioblastima od pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom u odnosu na kontrolne mioblaste. Za razliku od toga, pregledni rad Kozakowska i sur. (2015) pokazao je da pacijenti s DMD-om te *mdx* miševi imaju povećanu ekspresiju gena za antioksidacijske enzime, uključujući *CAT* i *SOD1*. Poznato je da pojačana proizvodnja ROS-ova pridonosi patologiji kongenitalne mišićne distrofije (Mosca i sur. 2021). Budući da je oksidacijski stres česta posljedica narušenog integriteta sarkoleme, rezultati ovog istraživanja upućuju na moguć poremećaj aktivacije staničnih puteva povezanih s odgovorom na oksidacijski stres. Osim toga, poznato je da visoka razina oksidacijskog stresa smanjuje *in vitro* regenerativni potencijal mioblasta te da promjene u razini ekspresije gena za antioksidacijske enzime, uključujući *CAT* i *SOD1*, koreliraju s regenerativnim kapacitetom mioblasta (Kozakowska i sur. 2015).

Osim smanjenja ekspresije *CAT* i *SOD1*, mioblasi od pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom pokazuju statistički značajno nižu razinu ekspresije gena *PPARGC1A* u odnosu na kontrolne mioblaste. Ovaj gen kodira za PGC1 α , transkripcijski koaktivator ključan za biogenezu mitohondrija (Mosca i sur. 2021). PGC-1 α regulira ekspresiju gena za

antioksidacijske enzime (Suntar i sur. 2020), što upućuje na mogućnost da smanjena razina *PPARGC1A* utječe na sniženu ekspresiju *CAT* i *SOD1*.

Budući da tretman manozom i galaktozom nije doveo do statistički značajnih promjena u ekspresiji gena *CAT*, *SOD1* i *PPARGC1A* kod sva tri pacijenta, rezultati ovog istraživanja ne ukazuju na izravan učinak tretmana na regulaciju antioksidacijskih obrambenih mehanizama na mRNA razini.

6. ZAKLJUČCI

- Morfološka karakterizacija mioblasta od pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom potvrdila je izraženu heterogenost unutar populacija, povećan broj vakuola u citoplazmi te statistički značajno veću površinu stanica u odnosu na kontrolne mioblaste.
- Vrijeme udvostručenja populacije, određeno je za tretirane i netretirane mioblaste od sva tri pacijenta, bilo je uporedivo s podacima iz literature za humane mioblaste.
- Vijabilnost stanica ostala je očuvana, bez uočenog smanjenja, kod tretiranih i netretiranih mioblasta svih pacijenata.
- Fazno holografška mikroskopija potvrdila je smanjen proliferativni kapacitet te povećanu brzinu kretanja mioblasta od pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom u odnosu na kontrolne mioblaste. Tretman manozom i galaktozom pozitivno je utjecao na proliferativni kapacitet mioblasta kod jednog pacijenta, ali smanjio je brzinu kretanja mioblasta od oba pacijenta s kongenitalnom mišićnom distrofijom.
- Praćenjem pojedinačnih stanica te njihovog potomstva utvrđeno je trajanje stanične diobe i staničnog ciklusa. Uočena je korelacija srednje jačine za trajanje staničnog ciklusa sestrinskih mioblasta.
- Analiza ekspresije gena potvrdila je nižu razinu ekspresije gena *DAG1*, *POMT2*, *PPARGC1A*, *SOD1* i *CAT* u mioblastima od pacijenata s kongenitalnom mišićnom distrofijom. Statistički značajno povećanje ekspresije *POMT2* uočeno je jedino u kontrolnim mioblastima tretiranim manozom i galaktozom.

Ovo istraživanje proširuje postojeće spoznaje o distroglukanopatijama te ispituje potencijalnu ulogu šećera u terapijskim pristupima. Dobiveni rezultati pružaju temelj za buduća istraživanja molekularnih mehanizama mišićnih distrofija te za bolje razumijevanje stanične kulture kao modela u ispitivanju terapijskih mogućnosti.

7. LITERATURA

Alderton J.M., Steinhardt R.A. (2000): Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *J Biol Chem* 275: 9452–9460.

Bischoff R., Holtzer H. (1969): Mitosis and the processes of differentiation of myogenic cells in vitro. *J Cell Biol* 41: 188–200.

Blau H.M., Webster C., Pavlath G.K. (1983): Defective myoblasts identified in Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 4856–4860.

Boyer S.W., Johnsen C., Morava E. (2022): Nutrition interventions in congenital disorders of glycosylation. *Trends Mol Med* 28: 463–481.

Brenman J.E., Chao D.S., Xia H., Aldape K., Brecht D.S. (1995): Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 82: 743–752.

Brown S.C., Torelli S., Brockington M., Yuva Y., Jimenez C., Feng L., Anderson L., Ugo I., Kroger S., Bushby K., Voit T., Sewry C., Muntoni F. (2004): Abnormalities in α -Dystroglycan expression in MDC1C and LGMD2I muscular dystrophies. *Am J Pathol* 164: 727–737.

Cataldi M.P., Lu P., Blaesus A., Lu Q.L. (2018): Ribitol restores functionally glycosylated α -dystroglycan and improves muscle function in dystrophic FKRP-mutant mice. *Nat Commun* 9: 3448.

Chal J., Pourquié O. (2017): Making muscle: Skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Development (Camb)* 144: 2104–2122.

Clarkson P.M., Hubal M.J. (2002): Exercise-induced muscle damage in humans. *Am J Phys Med Rehabil* 81: 52–69.

Collart C., Allen G.E., Bradshaw C.R., Smith J.C., Zegerman P. (2013): Titration of four replication factors is essential for the *Xenopus laevis* midblastula transition. *Science* 341: 893–896.

Crawley S., Farrell E.M., Wang W., Gu M., Huang H.Y., Huynh V., Hodges B.L., Cooper D.N., Kaufman S.J. (1997): The α 7 β 1 integrin mediates adhesion and migration of skeletal myoblasts on laminin. *Exp Cell Res* 235: 274–286.

Davies K.E., Nowak K.J. (2006): Molecular mechanisms of muscular dystrophies: Old and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 762–773.

Delaporte C., Dehaupas M., Fardeau M. (1984): Comparison between the growth pattern of cell cultures from normal and Duchenne dystrophy muscle. *J Neurol Sci* 64: 149–160.

Demonbreun A.R., Biersmith B.H., McNally E.M. (2015): Membrane fusion in muscle development and repair. *Semin Cell Dev Biol* 45: 48–56.

DeRossi C., Bode L., Eklund E.A., Zhang F., Davis J.A., Westphal V., Wang L., Borowsky A.D., Freeze H.H. (2006): Ablation of mouse phosphomannose isomerase (Mpi) causes mannose 6-phosphate accumulation, toxicity, and embryonic lethality. *J Biol Chem* 281: 5916–592.

Duan D., Goemans N., Takeda S., Mercuri E., Aartsma-Rus A. (2021): Duchenne muscular dystrophy. *Nat Rev Dis Primers* 7: 13.

Ervasti J.M., Campbell K.P. (1993): A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* 122: 809–823.

Feissner R.F., Skalska J., Gaum W.E., Sheu S.S. (2009): Crosstalk signaling between mitochondrial Ca²⁺ and ROS. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14: 1197–1218.

Fiorotto M. (2012): The making of a muscle. *Biochemist (Lond)* 34: 4–11.

Fu X., Wang H., Hu P. (2015): Stem cell activation in skeletal muscle regeneration. *Cell Mol Life Sci* 72: 1663–1677.

Gao Q.Q., McNally E.M. (2015): The dystrophin complex: Structure, function, and implications for therapy. *Compr Physiol* 5: 1223–1239.

Gawlik K.I. (2018): At the crossroads of clinical and preclinical research for muscular dystrophy—Are we closer to effective treatment for patients? *Int J Mol Sci* 19: 1490.

Gerin I., Ury B., Breloy I., et al. (2016): ISPD produces CDP-ribitol used by FKTN and FKRP to transfer ribitol phosphate onto α -dystroglycan. *Nat Commun* 7: 11534.

Gissel H. (2006): The role of Ca²⁺ in muscle cell damage. *Ann N Y Acad Sci* 1066: 166–180.

Goddeeris M.M., Wu B., Venzke D., Yoshida-Moriguchi T., Saito F., Matsumura K., Moore S.A., Campbell K.P. (2013): LARGE glycans on dystroglycan function as a tunable matrix scaffold to prevent dystrophy. *Nature* 503: 136–140.

Gonzalez P.S., O'Prey J., Cardaci S., Barthet V.J.A., Sakamaki J. ichi, Beaumatin F., Roseweir A., Gay D.M., Mackay G., Malviya G., Kania E., Ritchie S., Baudot A.D., Zunino B., Mrowinska A., Nixon C., Ennis D., Hoyle A., Millan D., McNeish I.A., Sansom O.J., Edwards J., Ryan K.M. (2018): Mannose impairs tumour growth and enhances chemotherapy. *Nature* 563: 719–723.

Gross S.M., Rotwein P. (2013): Live cell imaging reveals marked variability in myoblast proliferation and fate. *Skelet Muscle* 3: 10.

Gumerson J.D., Michele D.E. (2011): The dystrophin-glycoprotein complex in the prevention of muscle damage. *J Biomed Biotechnol* 2011: 210797.

Hack A.A., Groh M.E., McNally E.M. (2000): Sarcoglycans in muscular dystrophy. *Microsc Res Tech* 48: 167–180

Halmo S.M., Singh D., Patel S., Wang S., Edlin M., Boons G.J., Moremen K.W., Live D., Wells L. (2017): Protein O-linked mannose β -1,4-N-acetylglucosaminyltransferase 2 (POMGNT2) is a gatekeeper enzyme for functional glycosylation of α -dystroglycan. *J Biol Chem* 292: 2101–2109.

He M., Zhou X., Wang X. (2024): Glycosylation: mechanisms, biological functions and clinical implications. *Sig Transduct Target Ther* 9: 194.

Ibraghimov-Beskrovnya O., Ervasti J.M., Leveille C.J., Slaughter C.A., Sernett S.W., Campbell K.P. (1992): Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355: 696–702.

Inamori K.I., Yoshida-Moriguchi T., Hara Y., Anderson M.E., Yu L., Campbell K.P. (2012): Dystroglycan function requires xylosyl- and glucuronyltransferase activities of LARGE. *Science* 335: 93–96.

Jansen K.M., Pavlath G.K. (2006): Mannose receptor regulates myoblast motility and muscle growth. *J Cell Biol* 174: 403–413.

Kadry Y.A., Calderwood D.A. (2020): Structural and signaling functions of integrins. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1862: 183206.

Kamiloglu S., Sari G., Ozdal T., Capanoglu E. (2020): Guidelines for cell viability assays. *Food Front* 1: 332–349.

Kanagawa M. (2021): Dystroglycanopathy: From elucidation of molecular and pathological mechanisms to development of treatment methods. *Int J Mol Sci* 22: 13162.

Kanagawa M., Toda T. (2018): Ribitol-phosphate—a newly identified posttranslational glycosylation unit in mammals: structure, modification enzymes and relationship to human diseases. *J Biochem* 163: 359–369.

Kang C., Ji L.L. (2012): Role of PGC-1 α signaling in skeletal muscle health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1271: 110–117.

Khairallah R.J., Shi G., Sbrana F., Prosser B.L., Borroto C., Mazaitis M.J., Hoffman E.P., Mahurkar A., Sachs F., Sun Y., Chen Y.W., Raiteri R., Lederer W.J., Dorsey S.G., Ward C.W. (2012): Microtubules underlie dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *Sci Signal* 5: ra56.

Kim J.H., Jin P., Duan R., Chen E.H. (2015): Mechanisms of myoblast fusion during muscle development. *Curr Opin Genet Dev* 32: 162–170.

Kim J.H., Kwak H.B., Thompson L. V., Lawler J.M. (2013): Contribution of oxidative stress to pathology in diaphragm and limb muscles with Duchenne muscular dystrophy. *J Muscle Res Cell Motil* 34: 1–13.

Knudsen K.A., Horwitz A.F. (1977): Tandem events in myoblast fusion. *Dev Biol* 58: 328–338.

Kobayashi Y.M., Rader E.P., Crawford R.W., Iyengar N.K., Thedens D.R., Faulkner J.A., Parikh S. V., Weiss R.M., Chamberlain J.S., Moore S.A., Campbell K.P. (2008): Sarcolemma-localized nNOS is required to maintain activity after mild exercise. *Nature* 456: 511–515.

Kobzik L., Reid M.B., Bredt D.S., Stamler J.S. (1994): Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 372: 546–54.

Konigsberg I.R., Sollmann P.A., Mixer L.O. (1978): The duration of the terminal G1 of fusing myoblasts. *Dev Biol* 63: 11–26.

Kozakowska M., Pietraszek-Gremplewicz K., Jozkowicz A., Dulak J. (2015): The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes. *J Muscle Res Cell Motil* 36: 377–393.

Kramer H.F., Goodyear L.J. (2007): Exercise, MAPK, and NF- κ B signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 103: 388–395.

Kuwabara N., Manya H., Yamada T., Tateno H., Kanagawa M., Kobayashi K., Akasaka-Manya K., Hirose Y., Mizuno M., Ikeguchi M., Toda T., Hirabayashi J., Senda T., Endo T., Kato R.

(2016): Carbohydrate-binding domain of the POMGnT1 stem region modulates O-mannosylation sites of α -dystroglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 9280–9285.

Li D., Yue Y., Lai Y., Hakim C.H., Duan D. (2011): Nitrosative stress elicited by nNOS μ delocalization inhibits muscle force in dystrophin-null mice. *J Pathol* 223: 88–98.

Lian D., Chen M.M., Wu H., Deng S., Hu X. (2022): The role of oxidative stress in skeletal muscle myogenesis and muscle disease. *Antioxidants (Basel)* 11: 755.

Lieber R.L. (2009): Skeletal muscle structure, function, and plasticity: the physiological basis of rehabilitation. Lippincott Williams & Wilkins.

Live D., Wells L., Boons G.J. (2013): Dissecting the molecular basis of the role of the O-mannosylation pathway in disease: α -dystroglycan and forms of muscular dystrophy. *ChemBioChem* 14: 2392–2402.

Lorenzon P., Bandi E., Guarrini F. De, Pietrangelo T., Schäfer R., Zweyer M., Wernig A., Ruzzier F. (2004): Ageing affects the differentiation potential of human myoblasts. *Exp Gerontol* 39: 1545–1554.

Lualdi S., Rocco M. Di, Corsolini F., Spada M., Bembi B., Cotugno G., Battini R., Stroppiano M., Gabriela Pittis M., Filocamo M. (2006): Identification of nine new IDS alleles in mucopolysaccharidosis II. Quantitative evaluation by real-time RT-PCR of mRNAs sensitive to nonsense-mediated and nonstop decay mechanisms. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1762: 478–484.

Luo G., Hershko D.D., Robb B.W., Wray C.J., Hasselgren P.-O. (2003): IL-1 stimulates IL-6 production in cultured skeletal muscle cells through activation of MAP kinase signaling pathway and NF- κ B. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: 1249–1254.

Malatesta M., Giagnacovo M., Renna L.V., Cardani R., Meola G., Pellicciari C. (2011): Cultured myoblasts from patients affected by myotonic dystrophy type 2 exhibit senescence-related features: ultrastructural evidence. *Eur J Histochem* 55: e26.

Mamchaoui K., Trollet C., Bigot A., Negroni E., Chaouch S., Wolff A., Kandalla P.K., Marie S., Di Santo J., St Guily J.L., Muntoni F., Kim J., Philippi S., Spuler S., Levy N., Blumen S.C., Voit T., Wright W.E., Aamiri A., Butler-Browne G., Mouly V. (2011): Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skelet Muscle* 1: 34.

Manya H., Chiba A., Yoshida A., Wang X., Chiba Y., Jigami Y., Margolis R.U., Endo T. (2004): Demonstration of mammalian protein O-mannosyltransferase activity: coexpression of POMT1 and POMT2 required for enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 500–505.

Manya H., Yamaguchi Y., Kanagawa M., Kobayashi K., Tajiri M., Akasaka-Manya K., Kawakami H., Mizuno M., Wada Y., Toda T., Endo T. (2016): The muscular dystrophy gene TMEM5 encodes a ribitol β 1,4-xylosyltransferase required for the functional glycosylation of dystroglycan. *J Biol Chem* 291: 24618–24627.

Matsuda R., Nishikawa A., Tanaka H. (1995): Visualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. *J Biochem* 118: 959–964.

Matsumura K., Campbell K.P. (1994): Dystrophin-glycoprotein complex: its role in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 17: 2–15.

Michele D.E. (2022): Mechanisms of skeletal muscle repair and regeneration in health and disease. *FEBS J* 289: 6460–6462 .

Hernández-Almaraz P., Lugo-Lugo O., Brassea-Pérez E., Gaxiola-Robles R., Zenteno-Savín T. (2022): Morphometric characteristics of human skeletal muscle cells in primary culture. *Int J Morphol* 40: 521–529.

Mosca N., Petrillo S., Bortolani S., Monforte M., Ricci E., Piemonte F., Tasca G. (2021): Redox homeostasis in muscular dystrophies. *Cells* 10: 1364.

Noë S., Corvelyn M., Willems S., et al. (2022): The Myotube Analyzer: how to assess myogenic features in muscle stem cells. *Skelet Muscle* 12: 12.

Ortiz-Cordero C., Magli A., Dhoke N., Selvaraj S., Kuebler T., Oliveira N.A.J., Zhou H., Sham Y.Y., Bang A.G., Perlingeiro R.C.R. (2021): NAD⁺ enhances ribitol and ribose rescue of α -dystroglycan functional glycosylation in human FKRP-mutant myotubes. *Elife* 10: 1–50.

De Palma C., Perrotta C., Pellegrino P., Clementi E., Cervia D. (2014): Skeletal muscle homeostasis in Duchenne muscular dystrophy: modulating autophagy as a promising therapeutic strategy. *Front Aging Neurosci* 6: 188.

Peccarelli M., Kebaara B.W. (2014): Regulation of natural mRNAs by the nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Eukaryot Cell* 13: 1126–1135.

Rahimov F., Kunkel L.M. (2013): Cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy. *J Cell Biol* 201: 499–510.

Robert V., Massimino M.L., Tosello V., Marsault R., Cantini M., Sorrentino V., Pozzan T. (2001): Alteration in calcium handling at the subcellular level in mdx myotubes. *J Biol Chem* 276: 4647–4651.

Rybakova I.N., Patel J.R., Ervasti J.M. (2000): The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *J Cell Biol* 150: 1209–1214.

Sandri M., Coletto L., Grumati P., Bonaldo P. (2013): Misregulation of autophagy and protein degradation systems in myopathies and muscular dystrophies. *J Cell Sci* 126: 5325–5333.

Segeritz C.P., Vallier L. (2017): Chapter 9 - Cell culture: growing cells as model systems in vitro. In: Jalali M., Saldanha F.Y.L., Jalali M., editors. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Academic Press; p. 151–172.

St-Pierre J., Drori S., Uldry M., Silvaggi J.M., Rhee J., Jäger S., Handschin C., Zheng K., Lin J., Yang W., Simon D.K., Bachoo R., Spiegelman B.M. (2006): Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators. *Cell* 127: 397–408.

Suntar I., Sureda A., Belwal T., Sanches Silva A., Vacca R.A., Tewari D., Sobarzo-Sánchez E., Nabavi S.F., Shirooie S., Dehpour A.R., Xu S., Yousefi B., Majidinia M., Daglia M., D'Antona G., Nabavi S.M. (2020): Natural products, PGC-1 α , and Duchenne muscular dystrophy. *Acta Pharm Sin B* 10: 734–745.

Taniguchi-Ikeda M., Morioka I., Iijima K., Toda T. (2016): Mechanistic aspects of the formation of α -dystroglycan and therapeutic research for the treatment of α -dystroglycanopathy: A review. *Mol Aspects Med* 51: 115–124.

Thewissen R.M.J., Post M.A., Maas D.M., Veizaj R., Wagenaar I., Alsady M., Kools J., Bouman K., Zweers H., Meregalli P.G., Kooi A.J. van der, Doorn P.A. van, Groothuis J.T., Lefeber D.J., Voermans N.C. (2024): Oral ribose supplementation in dystroglycanopathy: A single case study. *JIMD Rep* 65: 171–181.

Tidball J.G., Welc S.S., Wehling-Henricks M. (2018): Immunobiology of Inherited Muscular Dystrophies. *Compr Physiol* 8: 1313–1356.

Topman G., Sharabani-Yosef O., Gefen A. (2011): A method for quick, low-cost automated confluency measurements. *Microsc Microanal* 17: 915–922.

Velasco-Mallorquí F., Fernández-Costa J.M., Neves L., Ramón-Azcón J. (2020): New volumetric CNT-doped gelatin-cellulose scaffolds for skeletal muscle tissue engineering. *Nanoscale Adv* 2: 2885–2896.

Waite A., Brown S.C., Blake D.J. (2012): The dystrophin-glycoprotein complex in brain development and disease. *Trends Neurosci* 35: 487–496.

Wallace G.Q., McNally E.M. (2009): Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. *Annu Rev Physiol* 71: 37–57.

Wengrod J., Martin L., Wang D., Frischmeyer-Guerrero P., Dietz H.C., Gardner L.B. (2013): Inhibition of nonsense-mediated RNA decay activates autophagy. *Mol Cell Biol* 33: 2128–2135

Wenz T., Rossi S.G., Rotundo R.L., Spiegelman B.M., Moraes C.T. (2009): Increased muscle PGC-1 α expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 20405–20410.

Willer T., Inamori K., Venzke D., Harvey C., Morgensen G., Hara Y., Beltrán Valero de Bernabé D., Yu L., Wright K.M., Campbell K.P. (2014): The glucuronyltransferase B4GAT1 is required for initiation of LARGE-mediated α -dystroglycan functional glycosylation. *eLife* 3: e03941.

Witkowski J.A., Dubowitz V. (1985): Duchenne muscular dystrophy: studies of cell motility in vitro. *J Cell Sci* 76: 225–234.

Yang, G., Lv, X., Wu, W., et al. (2024): Clinical and molecular genetic analysis further delineates the phenotypic variability of POMT2-related limb girdle muscular dystrophy type R14. Preprint (Version 1) available at Research Square.

Web stranice

Web 1. Terminology Of Myocyte. Genetic Engineering Info.
<http://geneticengineeringinfo.blogspot.com/2013/06/terminology-of-myocyte.html>

Baze podataka:

ClinVar: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine.
Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>. Pristupljeno 20.1.2025.

Životopis:

Rođena sam 10. prosinca 2000. godine u Zagrebu gdje sam završila I. Gimnaziju, smjer Opća gimnazija. Zvanje sveučilišne prvostupnice Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu stekla sam izradom završnog rada na temu „Uloga ponavljajućih DNA u organizaciji i evoluciji genoma”. Tijekom preddiplomskog sveučilišnog studija sudjelovala sam u popularizaciji znanosti u Hrvatskom prirodoslovnom muzeju na manifestaciji „Noć muzeja”. Po završetku preddiplomskog studija, upisala sam Sveučilišni diplomski studij Molekularna biologija u istoj matičnoj ustanovi. Laboratorijsku stručnu praksu odradila sam na Institutu Ruđer Bošković na Zavodu za molekularnu biologiju u Laboratoriju za molekularnu genetiku, pod vodstvom dr. sc. Helene Bilandžije.