

Utjecaj transplantacije koštane srži na oporavak dijabetičnih miševa CBA

Jankolija, Morana

Master's thesis / Diplomski rad

2010

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:217:637280>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATI KI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

MORANA JANKOLIJA

**UTJECAJ TRANSPLANTACIJE KOŠTANE SRŽI NA
OPORAVAK DIJABETI NIH MIŠEVA CBA**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2010.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za molekularnu endokrinologiju i transplantaciju, Zavoda za molekularnu medicinu, Instituta "Ruđer Bošković", pod vodstvom znanstvenog savjetnika Instituta "Ruđer Bošković" dr. sc. Mirka Hadžije i predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, radi stjecanja zvanja dipl. inž. biologije, smjer molekularna biologija.

Dr.sc. Mirku Hadžiji, voditelju rada, zahvaljujem na pomoći i podršci tijekom izrade rada, na ukazanom povjerenju, pruženim savjetima i na kritičkom istanjanju rada.

Prof. dr. sc. Dubravki Hranilović, suvoditeljici, zahvaljujem na susretljivosti, savjetima i na kritičkom istanjanju rada.

Dr.sc. Marijani Popović-Hadžija, dr.sc. Marini Korolija i Marini Marš zahvaljujem na nesebičnoj pomoći, pruženim savjetima i strpljenju tijekom izrade rada. Veliko hvala što ste mi boravak u vašem labosu učinile izrazito ugodnim i prihvatile me kao dio „obitelji“.

Hvala mojim roditeljima na nesebičnoj podršci, riječi ima potpore i strpljenju tijekom cijelog mog studiranja. Hvala Vam što ste bezuvjetno vjerovali u mene i moj uspjeh.

Veliko hvala, mom najboljem prijatelju Marinu Korleviću, dipl.ing. na nesebičnoj pomoći i podršci tijekom studija te na dragocjenim savjetima tijekom izrade rada.

Hvala mojim curkama Kelcu, Šabi i Ružici bez kojih sve ovo ne bi imalo smisla. Hvala vam jer ste vjerovali u mene i onda kad ja sama nisam. Hvala vam na savjetima, psihološkoj potpori i podršci tijekom svih ovih godina.

Hvala svim mojim kolegama i prijateljima na nezaboravnim studentskim danima i na beskrajnoj potpori tijekom studiranja.

Hvala mom Josipu koji je bio uz mene u dobru i zlu.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

**UTJECAJ TRANSPLANTACIJE KOŠTANE SRŽI NA OPORAVAK
DIJABETI NIH MIŠEVA CBA**

Morana Jankolija

Laboratorij za molekularnu endokrinologiju i transplantaciju, Institut "Ruđer Bošković",
Bijenjska 54, Zagreb, Hrvatska

Diabetes mellitus je kronična bolest okarakterizirana visokom razinom šećera u krvi i abnormalnim metabolizmom ugljikohidrata, proteina i masti. Uzrokuje ga nedostatak hormona inzulina u organizmu (*Diabetes mellitus* tipa 1) ili nemogućnost organizma da iskoristi inzulin (*Diabetes mellitus* tipa 2). Inzulin proizvode β -stanice koje se nalaze u Langerhansovim otočnicima i ima u gušteraici. Visoka razina glukoze u krvi tijekom dugog vremenskog razdoblja uzrokuje glikozilaciju proteina i izaziva sekundarne komplikacije kao što su retinopatija, neuropatija i nefropatija. Izloženost Langerhansovih otočnicima i hiperglikemiji narušava ekspresiju gena u stanicama. U našem eksperimentu dijabetes je induciran miševima soja CBA / HZgr iniciranjem aloksana. Aloksan je kemijski spoj koji uzrokuje ireverzibilno oštećenje β -stanica gušteraice i izaziva trajnu hiperglikemiju. Kako bi došlo do popravka oštećenja izazvanog djelovanjem aloksana u Langerhansovim otočnicima i ima, dijabetičnim miševima je transplantirana koštana srž singenog soja miševa. Imunohistokemijskim metodama su detektirane ekspresije Nanoga, PDX-1, ErbB-3 i inzulina u gušteraici i slezenama tretiranih životinja. Nakon 28. dana istraživanja u oštećenim su stanicama koštane srži u tkivu gušteraice te regeneracija β -stanica unutar Langerhansovih otočnika. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je transplantacija koštane srži pospjela oporavak oštećenih Langerhansovih otočnika i a.

(54 stranice, 30 slika, 2 tablice, 32 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: dijabetes, koštana srž, inzulini, Nanog, PDX-1, ErbB-3.

Voditelj: dr. sc. Mirko Hadžija, znanstveni savjetnik Instituta "Ruđer Bošković"

Suvoditelj: prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Gordana Lacković -Venturini

doc. dr. sc. Maja Matulić

Rad prihvaćen: 5. svibnja 2010.

University of Zagreb
Faculty of Science and Mathematics
Department of Biology

Graduation Thesis

**EFFECT OF BONE MARROW TRANSPLANTATION ON THE RECOVERY OF
DIABETIC MICE CBA**

Morana Jankolija

Laboratory for molecular endocrinology and transplantation, Ruđer Bošković Institute,
Bijenička 54, Zagreb, Croatia

Diabetes mellitus is a chronic disorder characterized by high blood sugar levels and abnormal metabolism of carbohydrate, protein and fat. Diabetes is caused by a deficiency of the hormone insulin (Type I *diabetes mellitus*) or the body's inability to use insulin (Type II *diabetes mellitus*). Insulin is produced by β -cells located in the islets of Langerhans of the pancreas. High blood glucose levels, during long periods of time, causes proteins glycosylation and induces secondary complications like retinopathy, neuropathy, and nephropathy. Exposure of islets of Langerhans to hyperglycaemia is associated with a widespread disruption of gene expression in all islet cells. In our experiments diabetes was induced in CBA/HZgr mice by injection of alloxan. The Alloxan is a chemical compound that causes irreversible damage of pancreatic β -cells and induces persistent hyperglycaemia. To regenerate damaged islets syngeneic bone marrow was transplanted in alloxan-induced diabetic mice. The pancreas and spleen of this study were analyzed for expression of Nanog, PDX-1, ErbB-3 and Insulin by immune histochemistry. 28 days after transplantation bone marrow stem cells were detected inside of pancreatic tissue and the regeneration of the β -cells within islets of Langerhans was noticed. Based on the results we can conclude that transplantation of bone marrow promotes the recovery of damaged islets of Langerhans.

(54 pages, 30 figures, 2 tables, 32 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in central biological library.

Key words: diabetes, bone marrow, insulin, Nanog, PDX-1, ErbB-3.

Supervisor: Mirko Hadžija, Ph.D. Senior scientist of Institute "Ruđer Bošković "

Co-supervisor: Dubravka Hranilović, Associated professor.

Reviewers: prof.dr.sc. Gordana Lacković -Venturin

doc.dr.sc. Maja Matuli

Thesis accepted: May 5th 2010.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. GRAFA GUŠTERA E.....	1
1.2. INZULIN.....	2
1.2.1. Grafa inzulina	2
1.2.3. Metabolizmi inzulina	3
1.3. ŠEĆERNA BOLEST (<i>Diabetes mellitus</i>).....	4
1.3.1. Dijabetes tipa 1	5
1.3.2. Dijabetes tipa 2	6
1.3.3. Kriteriji za dijagnosticiranje dijabetesa	7
1.3.4. Utjecaj hiperglikemije na Langerhansove otočice	7
1.4. ALOKSAN I NJEGOVO DJELOVANJE NA ANIMALNE MODELE	8
1.5. KOŠTANA SRŽ	8
1.5.1. Matične stanice	9
1.5.2. Migracija matičnih stanica u tijelu	10
1.5.2. Stupnjevi diferencijacije matičnih stanica prema pankreasnoj liniji	11
1.5.3. Nanog, Pdx-1, i ErbB3 (receptor za Ngn3)	12
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	14
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. MATERIJALI	15
3.1.1. Osnovne kemikalije i materijali	15
3.1.2. Otopine i puferi.....	16
3.1.3. Primarna protutijela	16
3.1.4. Sekundarna protutijela.....	16
3.1.5. Pokusne životinje.....	17
3.1.6. Uređaji	17
3.2. METODE	18
3.2.1. Određivanje koncentracije šećera u krvi	18
3.2.2. Rekonstitucija dijabetičkih miševa CBA/HZgr(H-2 ^k) stanicama koštane srži singenog soja	18
3.2.3. Razudba	19

3.2.4. Histološka analiza.....	19
3.2.5. Imunohistokemija	19
3.2.6. Analiza rezultata fluorescencijskim mikroskopom	21
3.2.7. Analiza slika histoloških prereza	21
4. REZULTATI	22
4.1. TJELESNA MASA	22
4.2. RAZINA GLUKOZE U KRVI	23
4.3. IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA	25
4.3.1. Broj Langerhansovih otočića i β -stanica	25
4.3.2. Detekcija ekspresije Nanog-a, Pdx-1, ErbB-3 i inzulina nakon 14 dana	26
4.3.3. Usporedba ekspresije Nanog-a, Pdx-1, ErbB-3 i inzulina nakon 7., 14. i 28. dana.....	40
5. RASPRAVA	46
6. ZAKLJUČAK	50
7. LITERATURA.....	51

1. UVOD

1.1. GRAĐA I SMJEŠTAJ GUŠTERA

Gušterača ili pankreas (lat. *pan*, sav + *creas*, meso) je egzokrini i endokrini žlijezda duljine 15 do 25 cm smještena ispod želuca i usporedno s njim. Egzokrini dio čine acinusi koji zauzimaju 95% tkivne mase i luče enzime uključene u probavu. Unutar egzokrinog dijela gušterače raspoređeno je više od milijun Langerhansovih otočića koji luče hormone i imaju endokrinu ulogu. Svaki otočić je od okolnog egzokrinog tkiva odvojen tankom ovojnicom od retikulinskih vlakana. Osim ovojnice otočići su obavijeni i spletom fenestriranih kapilara kroz koje izlučeni hormoni dopijevaju u krv (Junqueira i sur., 1995). Langerhansovi otočići sadrže 30-ak vrsta stanica, a stanice uključene u endokrinu ulogu su alfa, beta i delta. Beta stanice luče oko 60% svih stanica, luče inzulin i smještene su u sredini svakog otočića. Alfa stanice luče glukagon, a delta stanice somatostatin i obje vrste su smještene periferno. U otočiću postoji i vrlo mali broj tzv. PP-stanica koje luče hormon nazvan pankreasni polipeptid čija uloga još nije u potpunosti poznata. Inzulin i glukagon su izrazito važni za regulaciju metabolizma glukoze, lipida i bjelancevina u tijelu. Zbog poremećaja u njihovoj sekreciji ili aktivnosti dolazi do razvoja šećerne bolesti (Guyton i Hall, 2003).

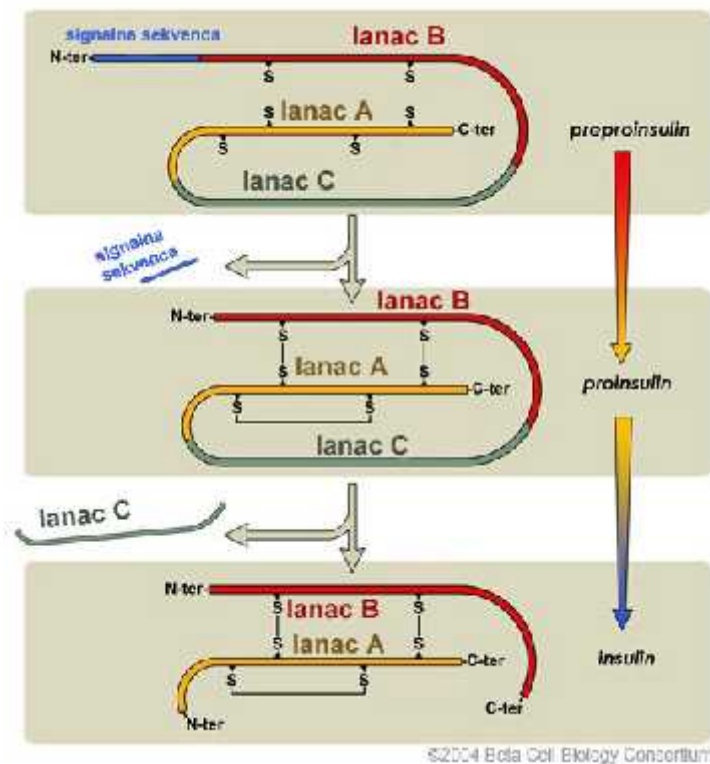


Slika 1. Građnja i smještaj gušterače

1.2. INZULIN

1.2.1. Građa inzulina

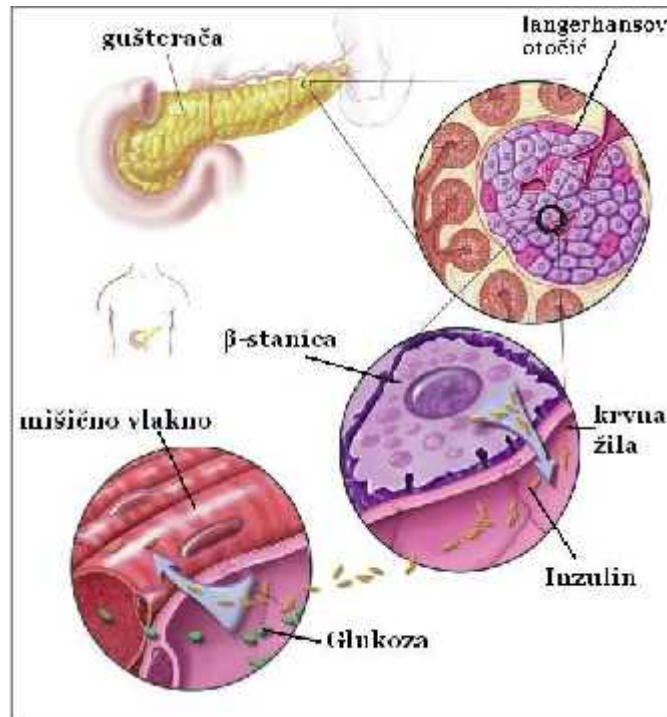
Inzulin je peptid molekularne mase 6000 Da sastavljen od dvaju lanaca aminokiselina. Lanac A ima jedan unutarlanani disulfidni most i povezan je dvama disulfidnim mostovima s lancem B. Transkripcijom i translacijom gena za inzulin (kod ljudi je smješten na 11. kromosomu kod miševa na 7. i 11. kromosomu) nastaje molekula preproinzulina. Uspostavljanjem disulfidnih veza u preproinzulinu nastaje molekula proinzulina koju lanac A i B spojeni s veznim peptidom koji se naziva C-peptid. Tijekom prijenosa iz endoplazmatskog retikuluma i odlaganja u zrnca Golgijeva aparata proinzulin se raspada na molekulu inzulina i molekulu C-peptida. Iako C-peptid nema biološke aktivnosti njegovo određivanje u plazmi korisno je u procjeni funkcije β -stanica, a određivanje njegove količine u 24-satnoj mokraći može poslužiti kao pokazatelj dnevne sekrecije inzulina (Berne i Levy, 1993).



Slika 2. Sinteza inzulina iz preproinzulina

1.2.3. Metaboli ki u inci inzulina

Inzulin upravlja unutarstani nim ustrojem i kontrolira metabolizam ugljikohidrata, masti i bjelan evina u organizmu. Najvažniji stimulans za izlu ivanje inzulina je glukoza koja s inzulinom ini sustav povratne sprege. Cilj takve povratne sprege je održavanje glukoze u krvi relativno konstantnom. Kad se koncentracija glukoze u krvi pove a iznad 5,5 mmol/L naglo se pove a i lu enje inzulina. Vežanjem inzulina za receptor na stani noj membrani pokre e se cijeli niz reakcija u stanici koji je ine mnogo propusnijom za glukozu, aminokiseline te ione kalija i fosfora. Nakon što inzulin pospješi prijenos glukoze u stanice njena se koncentracija u krvi ponovno smanji na normalnu vrijednost. U sluaju suviška ugljikohidrata u organizmu inzulin omogu uje njihovu pohranu u obliku glikogena uglavnom u jetri i miši ima. Glikogen služi kao regulator pri unog oblika glukoze koja se otpušta natrag u krv ako joj razina padne ispod odre ene vrijednosti. To je izrazito važno za ispravno funkcioniranje moždanih stanica koje su propusne za glukozu i bez posredovanja inzulina, pa je opadanje njene koncentracije ispod 3 mmol/L kriti no za normalno funkcioniranje mozga. Ako u organizmu postoji puno ve i suvišak ugljikohidrata nego što se može pohraniti u obliku glikogena inzulin poti e njegovu pretvorbu u masti koje se pohrane u masnome tkivu. Rezultat ukupnog djelovanja inzulina je regulacija bazalne koncentracije glukoze u krvotoku nakon svakog obroka i stvaranje zaliha energije koje e organizmu koristiti u sluaju gladi (Guyton i Hall, 2003). S obzirom da inzulin kontrolira važne procese u metabolizmu njegov nedostatak ozbiljno remeti i narušava normalno funkcioniranje organizma. Doga a se pražnjenje glikogenskih skladišta u jetri i miši ima, bazalna razina glukoze u krvotoku postaje izrazito visoka te dolazi do pove ane razgradnje masti i bjelan evina koje stanice po nu koristiti kao glavni izvor energije. Svi ti procesi u organizmu dovode do stanja koje se naziva šeerna bolest (Berne i Levy, 1993).



Slika 3. Djelovanje inzulina

1.3. ŠE ERNA BOLEST (Diabetes mellitus)

Diabetes mellitus je skupina metaboli kih bolesti okarakteriziranih hiperglikemijom koja nastaje kao rezultat poreme aja u inzulinskoj sekreciji ili djelovanju. U razvoj dijabetesa uklju eno je nekoliko patogenih procesa, po evši od autoimune destrukcije -stanica guštera e s posljedicom manjka inzulina u krvi sve do abnormalnosti koje rezultiraju rezistencijom tkiva na inzulin. Navedeni procesi dovode do smanjenja ulaženja i iskorištavanja glukoze u ve ini stanica organizma pri emu njena koncentracija u krvi raste, a pove ava se iskorištavanje masti i bjelan evina. Smanjenjem zaliha masti i bjelan evina u organizmu osoba slabi i gubi na težini iako jede velike koli ine hrane. Kroni no pove ana glukoza u krvi uzrokuje dehidraciju i ošte enje tkiva. Pretjerano i dugotrajno iskorištavanje masti u jetri uzrokuje pojavu velikih koli ina kolesterola u krvi i njegovo pove ano odlaganje u arterijske stjenke (Guyton i Hall, 2003). Poreme aj inzulinske sekrecije i defekt u samom djelovanju inzulina esto koegzistiraju u istom pacijentu i uglavnom nije jasno koji od njih uzrokuje hiperglikemiju.

Simptomi hiperglikemije su prekomjerno lučenje urina, prekomjerna žeđ, gubitak težine i ponekad zamuren vid. Prati je mogući poremećaj rasta te povećana osjetljivost organizma na razne infekcije. Kronična hiperglikemija vodi k postupnom oštećenju, disfunkciji pa i otkazivanju određenih organa, posebice oči, bubrega, živaca, srca i krvnih žila. Stupanj hiperglikemije se s vremenom može mijenjati što ovisi o duljini samog procesa bolesti koji može započeti i bez da se jave simptomi. U nekih osoba s dijabetesom adekvatna kontrola glukoze u krvi može se postići i redukcijom tjelesne težine, vježbanjem i/ili lijekovima koji snižuju razinu oralno konzumirane glukoze. Takve osobe nemaju potrebu za uzimanjem inzulina. Osobe koje imaju ostatke inzulinske sekrecije svejedno trebaju uzimati inzulin i egzogeno kako bi u potpunosti razinu glukoze u krvi držali pod kontrolom. Osobe sa izrazito uništenim β -stanicama i bez ikakve inzulinske sekrecije postaju ovisne o egzogenom inzulinu koji im je potreban za preživljavanje. Dugotrajne komplikacije dijabetesa uključuju retinopatiju s mogućnošću gubitka vida, nefropatiju koja vodi do otkazivanja bubrega, perifernu neuropatiju koja nosi rizik za nastajanje otvorenih čireva na nogama pa čak i potrebom za amputacijama, autonomnu neuropatiju koja uzrokuje gastrointestinalne, genitalne i kardiovaskularne komplikacije i seksualnu disfunkciju. Osobe sa dijabetesom imaju povećan rizik za kardiovaskularne, arterijske i cerebrovaskularne bolesti. Često imaju povišen krvni tlak i abnormalnosti u metabolizmu lipoproteina. Većina slučajeva dijabetesa spada u jednu od dvije kategorije; dijabetes tipa 1 ili dijabetes tipa 2. U kategoriji tipa 1 uzrok dijabetesa je apsolutan manjak inzulinske sekrecije dok je u kategoriji tipa 2 uzrok kombinacija rezistencije na inzulinsko djelovanje i neadekvatne sekrecije inzulina (American Diabetes Association, 2008).

1.3.1. Dijabetes tipa 1

Naziva se još i dijabetesom ovisnim o inzulinu ili mladenačim dijabetesom, a rezultat je autoimune destrukcije β -stanica gušterače. Obuhvaća samo 5-10% dijabetičara. Imunološki sustav stvara autoantitijela na stanice Langerhansovog otočja, na inzulin ili na enzime potrebne za njegovo djelovanje. U ovom tipu dijabetesa postotak destrukcije β -stanica je prilično varijabilan te može biti brz, uglavnom kod novorođenčadi i djece, dok je kod odraslih uglavnom spor.

Pacijentima se otkrije da imaju umjerenu hiperglikemiju natašte koja se kao posljedica neke infekcije ili stresa brzo može pogoršati. Kod odraslih β -stanice koje preostanu mogu još dugu niz godina zadržati funkciju, međutim ona s vremenom slabi i osobe postanu ovisne o egzogenom inzulinu. U tom kasnijem stadiju sekrecije inzulina ima vrlo malo ili nimalo, a detektira se prema razini C-peptida u plazmi. Dijabetes tipa 1 se uglavnom pojavljuje u djetinjstvu i adolescenciji, ali se može pojaviti i u bilo kojem razdoblju života. Autoimuna destrukcija β -stanica ima mnoge genetičke predispozicije, ali je povezana i sa vanjskim faktorima koji su još slabo razumljivi i definirani (American Diabetes Association, 2008).

1.3.2. Dijabetes tipa 2

Naziva se još i dijabetes neovisan o inzulinu ili adultni, stariji dijabetes. Uzrokuje ga smanjena osjetljivost ciljnih tkiva na metaboličke učinke inzulina (tzv. inzulinska rezistencija) u kombinaciji sa nedovoljnim lučenjem inzulina. Često je od dijabetesa tipa 1 i obuhvaća 90-95% dijabetičara koji uglavnom ne trebaju tretmane inzulinom da bi preživjeli. Autoimunološka destrukcija β -stanica ne postoji i pacijenti nemaju tipične simptome dijabetesa. Većina pacijenata je pretila i sama pretilost uzrokuje jedan oblik inzulinske rezistencije. Pacijenti koji nisu pretili vjerojatno imaju povišen udio masnog tkiva raspoređen u abdominalnoj regiji. Ovaj tip dijabetesa često ostane nedijagnosticiran dugu niz godina jer se hiperglikemija razvija postepeno i u ranim stadijima nije dovoljno visoka da bi pacijent imao simptome tipičnog dijabetesa. Razine inzulina u krvi su često normalne pa čak i povišene. Iako je funkcija β -stanica oštećena i inzulin se normalno luči, njegova sekrecija nije dovoljna da kompenzira stanje inzulinske rezistencije. Inzulinska rezistencija se može popraviti s redukcijom tjelesne težine i uz farmakološke tretmane, ali se rijetko vrati u normalu. Rizik od razvoja ovog tipa dijabetesa se povećava s godinama, manjkom fizičke aktivnosti i pretilošću. Često se javlja u pojedinaца s povišenim krvnim tlakom i povišenom razinom triglicerida u krvi i često je asociran s jakom genetskom predispozicijom (American Diabetes Association, 2008).

1.3.3. Kriteriji za dijagnosticiranje dijabetesa

Da bi se osobi dijagnosticirala šeerna bolest mora biti zadovoljen barem jedan od tri sljedeća kriterija. Prvi kriterij je da razina glukoze izmjerena natašte iznosi više od 7.0 mmol/L. (Krv se uzima nakon najmanje 8 sati gladovanja.) Drugi kriterij je bazalna razina glukoze u plazmi viša od 11.1 mmol/L (mjerenje se izvodi u bilo koje doba dana bez obzira u kojem je vremenu uzet posljednji obrok). Uz povišenu bazalnu razinu glukoze osoba mora imati prisutne simptome hiperglikemije (pojaćano mokrenje, povećana žeđ i neobjašnjiv gubitak težine). Treći kriterij je razina glukoze u krvi izmjerena 2h nakon opterećenja (oralno uzimanje 75g glukoze otopljene u vodi) veća od 11.1 mmol/L (American Diabetes Association, 2008).

1.3.4. Utjecaj hiperglikemije na Langerhansove otočice

Dugotrajno izlaganje tkiva hiperglikemiji inducira stanje oksidativnog stresa u organizmu. Višak glukoze u krvi pojaćava stopu glikolize u kojoj se procesom oksidativne fosforilacije uz utrošak molekularnog kisika generiraju njegovi reaktivni radikali. Radikali koji nastaju su superoksid, vodikov peroksid, dušikov oksid i hidroksilni radikali. Hidroksilni radikali se smatraju najtoksičnijima jer lako prolaze kroz membrane u staničnu jezgru gdje oštećuju DNA. S obzirom da su razine antioksidativnih enzima (CuZn-SOD, Mn-SOD, katalaza i glutation peroksidaza) unutar Langerhansovih otočica izrazito niske to ih čini podložnima oštećenjima izazvanim reaktivnim radikalima kisika. Smatra se da oksidativni stres svoje negativne učinke ostvaruje kroz poremećaj ekspresije gena neophodnih za normalan razvoj. Drastično se smanjuju transkripcija gena za inzulin kao i za njegov transkripcijski faktor pdx-1 pri čemu nastaju nepovratna oštećenja u funkciji β -stanica (Robertson i sur, 2003).

1.4. ALOKSAN I NJEGOVO DJELOVANJE NA ANIMALNE MODELE

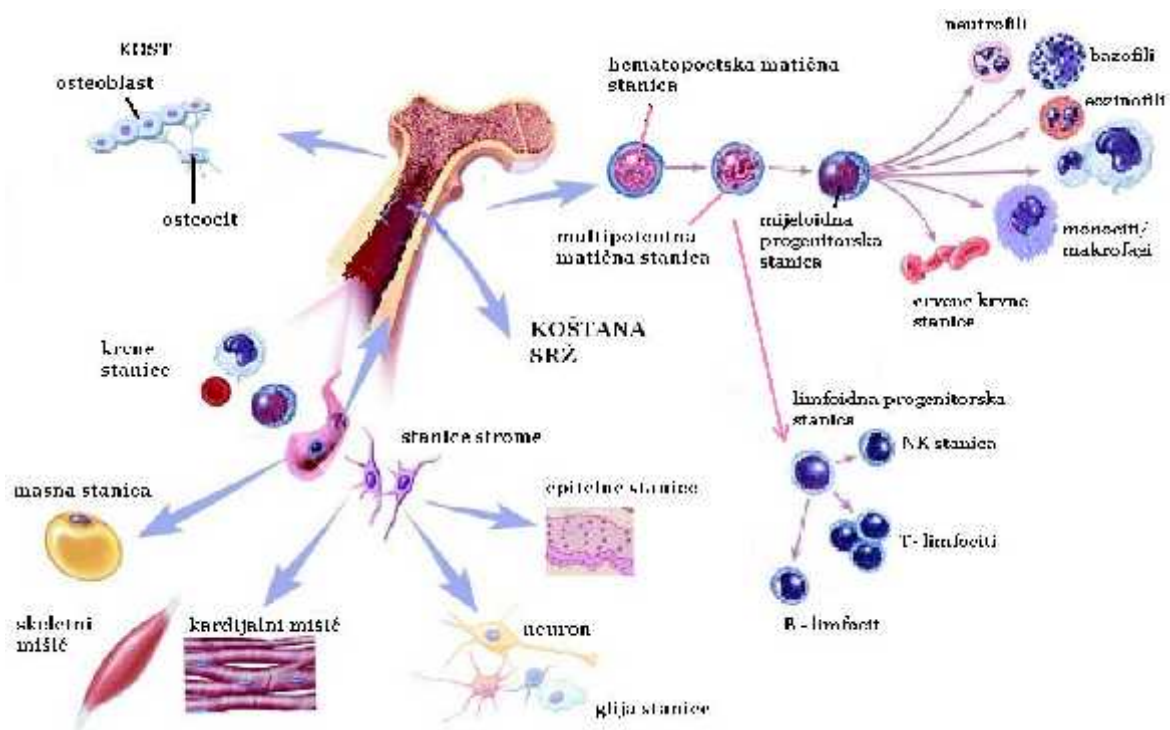
Animalni modeli su izrazito korisni u istraživanjima jer donose mogućnost da se napravi analiza procesa neke bolesti i da se identificiraju mjesta pogodna za terapijsku intervenciju. Štakori i miševi razvijaju sindrom dijabetesa najbliži humanom dijabetesu tipa 1, pa se stoga i najčešće koriste (Lally i Bone, 2003).

Aloksan (ALLOXAN®) nastaje kao produkt oksidacije mokraćne kiseline i dušične kiseline u urinu, a injiciranjem u organizam uništava β -stanice guštera i formiranjem radikala u oksido-redukcijskim procesima. Biološki se opisuje kao citotoksični analog glukoze kojeg transporteri za glukozu GLUT2 na plazmatskoj membrani β -stanica normalno prepoznaju i prenose unutar stanice. S obzirom da ostale stanice guštera i nemaju GLUT2 aloksan za njih nije toksičan. Nakon što uđe u stanicu u velikoj koncentraciji djeluje inhibitorno na mnoge enzime. Ko i djelovanje glukokinaze što sprječava oksidaciju glukoze i stvaranje ATP-a neophodnog za sintezu i sekreciju inzulina. Generiranjem slobodnih radikala uzrokuje lomove u DNA zbog kojih se pokreće apoptoza β -stanica što dovodi do razvoja dijabetesa (Lenzen, 2007).

1.5. KOŠTANA SRŽ

Koštana srž je krvotvorno tkivo koje ispunjava šupljine velikih, dugih i spužvastih kostiju u tijelu. Kod odraslog čovjeka je oko 2,6 kg koštane srži raspoređeno samo u plosnatim kostima (rebra, kralješci, prsna kost, ključna kost, kosti zdjelice, lubanja). Uloga koštane srži je nastanak svih krvnih stanica u tijelu, razgradnja eritrocita i stvaranje rezerve željeza nastale raspadanjem hemoglobina. Osnovu koštane srži čini retikulinsko vezivno tkivo ispunjeno krvnim stanicama i njihovim predstajnicima. Tkivo koje nije direktno povezano sa hematopoezom u koštanoj srži, ali čini hematopoetski mikrookoliš koji pospješuje i usmjerava hematopoezu naziva se stroma. Stroma je sastavljena od fibroblasta, makrofaga, adipocita, osteoblasta, osteoklasta i endotelnih stanica.

U samom središtu koštane srži nalaze se matične stanice koje imaju mogućnost diferencijacije prvenstveno u krvotvorne stanice u tijelu, ali i u skoro sve ostale tipove stanica organizma. Koštana srž je dobro prokrvljena, a endotel krvnih žila predstavlja barijeru koja sprječava prolaz nezrelih krvnih stanica u krvotok (Junqueira i sur., 1995).



Slika 4. Stani ne linije koštane srži

1.5.1. Matične stanice

Dvije najvažnije karakteristike matičnih stanica su mogućnost samoobnavljanja i mogućnost diferencijacije u zrele stanice sa specijaliziranom funkcijom i morfologijom. Prije nego dosegnu potpuno diferencirani stupanj matične stanice stvaraju tzv. progenitorske stanice. Progenitorske ili prekursorske stanice su djelomično diferencirane stanice koje se dijele i stvaraju potpuno diferencirane stanice (Roy i Verfaillie, 1999). Primarna funkcija matičnih stanica je zadržati stanje homeostaze u tijelu i nadomjestiti stanice koje odumru zbog ozljede ili bolesti. Matične i progenitorske stanice se osim u koštanoj srži nalaze i u mnogim zrelim tkivima

(koštana srž, periferna krv, mozak, krvne žile, epitel kože, probavni sustav) (Jackson K. i sur., 2001).

Koštana srž sadrži tri tipa matičnih stanica; hematopoetske, stromalne i endotelne. Hematopoetske matične stanice su odgovorne za formiranje svih tipova krvnih stanica u tijelu. Definirane su dvije podvrste; dugoživu e i kratkoživu e. Dugoživu e se dijele doživotno i važne su za održavanje populacije matičnih stanica u koštanoj srži. Kratkoživu e se diferenciraju u limfoidne i mijeloidne prekursore odgovorne za stvaranje dvaju glavnih linija krvnih stanica. Limfoidni prekursori se diferenciraju u T-stanice, B-stanice i stanice «ubojice» (Akashi i sur., 1999), dok se mijeloidni prekursori diferenciraju u monocite, makrofage, neutrofile, eozinofile, bazofile, megakariocite i eritrocite (Akashi i sur., 2000). Važnu ulogu u proliferaciji i diferencijaciji stanica koštane srži imaju citokini i interakcija s adhezijskim molekulama ekstracelularnog matriksa strome (Johe i sur., 1996). Stromalne stanice osim što osiguravaju fizički okoliš za diferencijaciju hematopoetskih matičnih stanica, odgovorne su i za nastajanje koštanog, hrskavičnog, masnog, vezivnog i retikulinskog tkiva. Endotelne matične stanice stvaraju stanice endotela svih krvnih žila u tijelu (Kalka i sur., 2000).

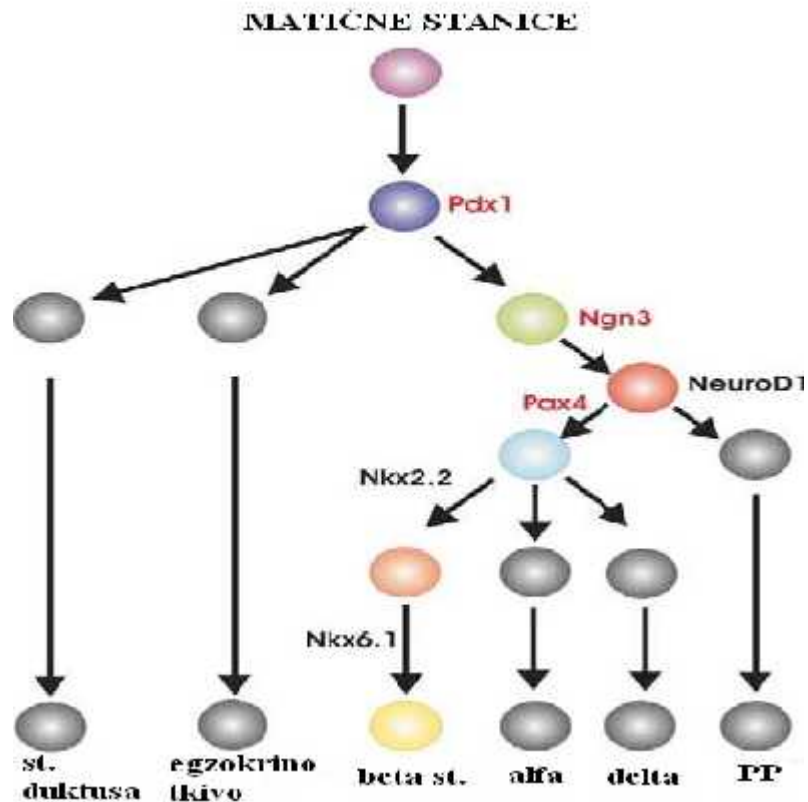
1.5.2. Migracija matičnih stanica u tijelu

Naseljavanje matičnih stanica u određeno oštećeno tkivo nakon transplantacije koštane srži je izrazito složen i još uvijek nedovoljno istražen proces. Njihova zadaća je prepoznati mjesto oštećenja, naseliti se u njemu i diferencirati u stanice od kojih je oštećeno tkivo sastavljeno. Molekule koje imaju ključnu ulogu u tom procesu su integrini, endotelni selektini s njihovim ligandima, komplementi, određeni lipidni medijatori i unutarstanične signalne molekule. Na primjeru naseljavanja matičnih stanica u koštanu srž može se pretpostaviti njihovo naseljavanje i u ostala oštećena tkiva. Dominantnu ulogu imaju kemokin SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) i njegov receptor CXCR4 (Bonig i sur., 2006). SDF-1 je prisutan na površini stromalnih i endotelnih stanica koštane srži. Njegova ekspresija u tkivima se pojačava u stanjima stresa ili oštećenja nekog tkiva. CXCR4 se sintetizira u matičnim stanicama te se prema potrebi može izložiti na staničnoj površini i djelovati kao receptor za SDF-1. Vezanjem CXCR4 matičnih stanica za SDF-1 stanica strome i endotela vjerojatno predstavlja prvi korak u ulasku matičnih stanica u krv.

Pretpostavlja se da u stanju oštećenja nekog organa stanice oštećenog tkiva ekspresiraju određeni faktor na svojoj staničnoj površini koji onda stanice koštane srži prepoznaju svojim receptorima i vežu se na njega (Papayannopoulou i sur., 2001).

1.5.2. Stupnjevi diferencijacije matičnih stanica prema pankreasnoj liniji

Proces diferencijacije tkiva guštera je izrazito složen proces koji se odvija u mnogo koraka i zahtijeva ekspresiju velikog broja različitih transkripcijskih faktora. Međutim, pronađenjem njihove ekspresije u različitim stadijima embrionalnog razvoja guštera pronađena su tri markera koja su se pokazala najprimjerenija za dokazivanje ključnih stupnjeva diferencijacije. Ti faktori su Nanog, Pdx-1, Ngn3. Pronađenjem njihove ekspresije u tkivu nakon transplantacije matičnih stanica može se dokazati pojedini stupanj njihove diferencijacije prema pankreasnoj liniji. Nanog ekspresiraju isključivo matične stanice što ga čini idealnim pokazateljem njihovog naseljavanja u ciljnom tkivu. Ekspresija Pdx-1 je prvi znak razvoja tkiva prema pankreasnoj liniji. Stanice koje ga ekspresiraju su već diferencirane stanice usmjerene prema nastanku egzokrinog i endokrinog tkiva guštera i duktusa. Slijedeći stupanj diferencijacije podrazumijeva nastanak endokrinih progenitorskih stanica koje ekspresiraju Ngn3. Iz tih stanica se razvijaju sve linije stanica koje se mogu pronaći u Langerhansovim otočnicima. U konačnom stupnju diferencijacije nastaju zrele β -stanice koje ekspresiraju inzulin (Korolija i sur., 2009).



Slika 5. Stupnjevi diferencijacije matičnih stanica prema pankreasnoj liniji

1.5.3. Nanog , Pdx-1, i ErbB3 (receptor za Ngn3)

Nanog je transkripcijski faktor koji usmjerava matične stanice prema samoobnavljanju i sprema njihovu diferencijaciju. Njegova mRNA se nalazi isključivo u pluripotentnim stanicama i odsutna je u diferenciranim (Chambers i sur., 2003).

Pdx-1 (pancreatic and duodenal homeobox factor-1) je transkripcijski faktor neophodan za embrionalni razvoj gušterače, diferencijaciju β -stanica i održavanje njihove funkcije. Tijekom embrionalnog razvoja ga ekspimiraju progenitorske stanice. Glavna uloga njegove ekspresije je usmjeravanje tkiva u smjeru nastanka egzokrinih i endokrinih dijelova gušterače.

Nakon završetka embrionalnog razvoja ekspresija Pdx-1 se ograničava isključivo na zrele β -stanice u kojima kontrolira aktivaciju i ekspresiju gena za inzulin i ostalih gena uključujući njihovu osjetljivost organizma na glukozu (Kaneto i sur., 2008).

ErbB-3 je receptor za neuregulin (Ngn3) iz obitelji protein-kinaza. Ti receptori reguliraju aktivnost različitih transkripcijskih faktora i uključeni su u proces razvoja i diferencijacije tkiva gušterače. Njihova funkcija se temelji na interakciji s neurogeninima (pripadaju obitelji faktora rasta) koji su odgovorni za rast i diferencijaciju epitelnih stanica, gljiva stanica, neurona i stanica mišićnog tkiva. Neurogenini reguliraju stanične odgovore aktivirajući i ErbB receptore preko kojih se prenosi signal unutar stanice. ErbB receptore ekspimiraju stanice duktusa tijekom fetalnog razvoja, ali i tijekom regeneracije tkiva. Smatra se da potiču stvaranje endokrinih dijelova gušterače (Kritzik i sur., 2000).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Broj oboljelih od dijabetesa u Hrvatskoj doseže 170.000, dok svjetske brojke govore o 170 milijuna (Mayo, 2005). Prema izjavama WHO-a (world health organization) broj oboljelih će do 2025. godine porasti na 300 milijuna što je izrazito zabrinjavajuća brojka (Noguchi, 2007).

Trenutno je jedini dostupan način liječenja pravilna prehrana, tjelovježba, oralno uzimanje lijekova i naposljetku egzogeno uzimanje inzulina. Pokušaj transplantacije gušterače i zdravih Langerhansovih otočica se nije pokazao dovoljno dobrom metodom zbog nedostupnosti dovoljnog broja transplantata i potrebe za doživotnim uzimanjem imunosupresivnih lijekova (Tang i sur., 2004). U posljednje vrijeme se polažu velike nade u terapiju matičnim stanicama. S obzirom na veliku mogućnost diferencijacije u sve tipove stanica u tijelu, matične stanice predstavljaju dobar izbor za korištenje u terapijske svrhe (Chen, 2009). Pronalazak odgovarajućeg načina na koji bi se matične stanice uspjele diferencirati u β -stanice omogućio bi trajno nadomještanje stanica koje proizvode inzulin što bi osobi koja boluje od dijabetesa uvelike pospješilo duljinu i kvalitetu života.

Cilj ovog rada bio je istražiti mogućnost diferencijacije matičnih stanica koštane srži u β -stanice Langerhansovih otočica. Zbog evolucijske srodnosti s ovjekom i jednostavnog laboratorijskog uzgoja miševi (*Mus musculus*) se nameću kao pogodan modelni organizam. Kako bi se minimalizirao utjecaj genetičke varijabilnosti na rezultate istraživanja koriste se visokosrodni sojevi miševa CBA/HZgr kojima je dijabetes induciran injiciranjem aloksana. Mjerenjem koncentracije glukoze u krvi i tjelesne mase miševa proučeno je tijek dijabetičnog stanja. Imunohistokemijskim metodama istražena je prisutnost matičnih stanica u tkivu gušterače. Njihova sposobnost diferencijacije istraživana je na histološkim prerezima gušterače tretiranjem specifičnim protutijelima za Nanog, Pdx-1, ErbB-3 i Inzulin. Praćenjem ekspresije navedenih markera (svaki od markera je karakterističan za pojedini stadij diferencijacije matičnih stanica prema pankreasnoj liniji) nastojala se dokazati eventualna diferencijacija matičnih stanica i njihova moguća uloga u ozdravljenju dijabetičnog stanja miševa.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Osnovne kemikalije i materijali

- Trikloroctena kiselina (TCA), Kemika, Zagreb
- Trace/DMA Glucose Oxidase, Thermo electron corporation, Australija
- Aprotinin (Antagosan®) , Behring, Njema ka
- Alloxan®Monohydrate, Sigma, SAD
- Etanol (96%), Kemika, Zagreb
- Toluen, Kemika, Zagreb
- Glicerol, Kemika, Zagreb
- Benzalkonij klorid, Pliva d.d, Zagreb
- Tripansko modriilo, Sigma, SAD
- Fenol crvena boja, Sigma, SAD
- Pikrinska kiselina, Kemika, Zagreb
- Formaldehid, Kemika, Zagreb
- Ledena octena kiselina, Kemika, Zagreb
- Tri-natrij-citrat-2 hidrat, Kemika, Zagreb
- Tween®20, Sigma, SAD
- Albumine bovine, Sigma, SAD
- Triton X-100, Sigma, SAD

Ostale kemikalije bile su uobičajene laboratorijske kemikalije p.a. kvalitete.

3.1.2. Otopine i puferi

- OTOPINA ASEPSOLA: 5% benzalkonij-klorid (m/v)
- OTOPINA TRIPANSKOG MODRILA: 0,2 %-tna otopina tripanskog modrila (m/v) : 4,2 %-tni NaCl (m/v) u omjeru 1:4.
- HANK'S-OVA OTOPIA (pH 7.2): 8,0 g/L NaCl, 0,4 g/L KCl, 0,10 g/L MgSO₄ x 7H₂O, 0,10 g/L MgCl₂ x 6H₂O, 0,14 g/L CaCl₂, 0,185 g/L CaCl₂ x 2H₂O, 0,27 g/L CaCl₂ x 6H₂O, 0,048 g/L Na₂HPO₄, 0,06 g/L Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0,06 g/L KH₂PO₄, 0,35 g/L NaHCO₃, 1 g/L glukoze, 0,020 g/L fenol crvene boje.
- BOUIEN-OVA OTOPIA: 75% (v/v) zasi ene otopine pikrinske kiseline, 20% (v/v) otopine formaldehida (35%-tne (w/w)), 5% (v/v) zasi ene otopine ledene octene kiseline.
- CITRATNI PUFER (pH 6,0): 0,3% (m/v) tri-natrij-citrat-2-hidrat, 0,05% (v/v) Tween®20
- PBS PUFER (pH 7,2): 8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,148 g/L Na₂HPO₄, 0,2 g/L KH₂PO₄, 0,0377 g/L CaCl₂, 0,05 g/L MgCl₂ x 6H₂O.
- INKUBACIJSKI PUFER 1%-tni (pH 7,4): 2% Bovine serume albumin (v/v), 0,3% Triton X-100 u PBS-u

3.1.3. Primarna protutijela

- Anti-h/m/b Insulin Purified Rat Monoclonal IgG_{2A}, R&D systems , SAD
- Anti-h/m PDX-1 Purified Mouse Monoclonal IgG_{2B}, R&D systems , SAD
- Anti-mNanog Affinity Purified Goat IgG, R&D systems , SAD
- ErbB-3 Goat Polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, SAD

3.1.4. Sekundarna protutijela

- Rabbit anti-goat IgG-FITC, Santa Cruz Biotechnology, SAD
- Anti-mouse IgG Fluorescein Conjugated Goat F(ab')₂, R&D systems, SAD
- Anti-rat IgG Fluorescein Conjugated Goat F(ab')₂, R&D systems, SAD

3.1.5. Pokusne životinje

U eksperimentu su korišteni miševi soja CBA/HZgr (H-2^k) uzgojeni u Institutu Ruđer Bošković, Zagreb. Od okota do početka istraživanja životinje su držane u standardnim uvjetima: 10 miševa po kavezu, omjer svjetla i tame 12/12 sati, temperatura 22°C, vlažnost 50-70%, hranjeni standardnom GLP (Good laboratory practice) laboratorijskom hranom (Mucedola srt, Italija). Upotrijebljeno je 57 miševa, od toga 15 ženki i 42 mušjaka starosti 3-4 mj., tjelesne mase 16 – 34 g. Miševi su tretirani aloksanom i 24 sata nakon tretmana aloksanom primili su 1×10^6 stanica koštane srži. Prema tjednima žrtvovanja podijeljeni su u tri skupine.

1. Prva skupina miševa je žrtvovana 7 dana nakon injiciranja koštane srži.
2. Druga skupina miševa je žrtvovana 14 dana nakon injiciranja koštane srži.
3. Treća skupina miševa je žrtvovana 28 dana nakon injiciranja koštane srži.

Za kontrolne skupine uzeti su zdravi miševi i miševi koji nakon tretmana aloksanom nisu primili stanice koštane srži (dijabetični miševi).

Svim miševima je jednom tjedno određivana razina šećera u krvi i tjelesna masa vaganjem na električnoj vagi Scaltec, tipa SAC62 1.200g ±0,1g.

3.1.6. Uređaji

Značajniji uređaji koji su korišteni u eksperimentalnom radu su: Električna vaga (Scaltec, tipa SAC62 1.200g ±0,1g), centrifuga (Hettich universal), spektrometar (Cecile 5501), pH-metar (Seven Easy, Mettler Toledo), pećnica jačine 250W (Thermo Electron), mikrovalna pećnica jačine 750W, fluorescencijski mikroskop Olympus BX51 s filterom za zelenu boju (fluorescein) tipa NB i pripadajuća kamera Olympus DP50.

3.2. METODE

3.2.1. Određivanje koncentracije šećera u krvi

Miševi se zagriju pod infracrvenom lampom i imobiliziraju tako da im je samo rep slobodan. Na repu se napravi rez te se iz kapljice krvi pipetom uzme uzorak krvi od 25 μ l, nakon čega se krvne žile podvežu. Krv se pomiješa s 1ml 3%-tne otopine TCA te se stavi na inkubaciju. Minimalno vrijeme inkubacije je 10 min. Nakon inkubacije epruvete se centrifugiraju 10 min na 3000 okretaja u centrifugi (Hettich universal, Njemačka). 200 μ l supernatanta prenese se u epruvetu u kojoj je dodano 2ml reagensa (glukoze oksidaze). Ova smjesa inkubira se 20 min u mraku. Apsorbancija uzoraka nakon inkubacije mjeri se fotometrijski (Cecile 5501, Engleska) pri valnoj duljini od 540nm. Kao standard korištena je otopina glukoze, a kao slijepa proba korištena je destilirana voda.

$$\text{Formula za određivanje konc. šećera: } \frac{A(\text{uzorka})}{\text{standard}} \times 100 / 18,02$$

Standard = 0,032

3.2.2. Rekonstitucija dijabetičnih miševa CBA/HZgr(H-2^k) stanicama koštane srži singenog soja

Tri zdrava miša soja CBA/HZgr(H-2^k), starosne dobi 8 tjedana, žrtvovana su cervikalnom dislokacijom i dezinficirani 5%-tnom otopinom asepsola. U sterilnim uvjetima su izvađeni femuri i sterilnim krpicama odvojene su kosti od miša. Nakon rezanja epifiza, sadržaj kosti je iglom i špricom ispuhan u šalicu sa sterilnom Hank's-ovom otopinom. Dobiveni uzorak se profiltrira kroz sterilno sito (veličina pora 100 μ m) kako bi se razbile stanične nakupine. Dobivena suspenzija se centrifugira na +4 °C, 600 g, kroz 10 minuta, a talog stanica se razrijedi u otopini Hank'sa. Broj stanica u dobivenoj suspenziji se odredi brojanjem u Neuenbauer-ovoj komorici uz pomoć boje tripansko modrilo za određivanje broja živih stanica. Broj stanica se podesi na 10⁶ stanica u volumenu od 0,5 mL Hank's-ove otopine i ta se doza intravenozno injicira u dijabetičnog miša.

3.2.3. Razudba

Razudba se izvodi na anesteziranom mišu. Miš određen za žrtvovanje se izvadi iz kaveza i stavi u posudu u kojoj se nalazi eter kao sredstvo za anesteziju. Posuda se poklopi na 30 sekundi do 1 minute, ovisno o tome koliko je potrebno za anesteziju miša. Anestezirani miš se fiksira za podlogu i premaže alkoholom. U abdominalnu aortu miša se injekcijom od 5ml ubrizga 1ml aprotinina koncentracije 200U/ml razrijeđenog sa 4ml Hank's-ove otopine. Aprotinin kao inaktivator enzima gušterače sprečava njenu autodigestiju prilikom vađenja. Napravi se uzdužni rez duž *linea albae* i kosi rezovi od sredine prema prednjim i stražnjim nogama. Koža se odvoji od miša i pri vrsti za podlogu. Zatim se naprave isti rezovi kroz mišino tkivo paze i da se u gornjem dijelu trbušne šupljine ne probode prsni koš. Mišino tkivo se također fiksira za podlogu kako bi se oslobodio pristup organima trbušne šupljine. Pincetom se prihvati tkivo gušterače koje se pažljivo odvoji od kurvatures želuca, duodenuma, tankog crijeva i slezene. Izvadi se i slezena te se oba organa stave u Bouien-ovu otopinu u kojoj se drže naredna 24 sata do histološke analize.

3.2.4. Histološka analiza

Za histološku obradu uzete su gušterača i slezena. Tkiva se fiksiraju 24 sata u Bouien-ovoj otopini. Nakon fiksacije uzorci tkiva se dehidriraju postupnim uranjanjem u rastuću koncentraciju alkohola. Nakon dehidracije slijedi uklapanje u parafin. Hlađenjem parafina se postiže njegovo skrućivanje u unutrašnjosti fiksiranog tkiva i oko njega. Parafin se reže u tzv. parafinske blokove koji se zatim mikrotomom režu na rezove debljine 5 μ m.

3.2.5. Imunohistokemija

1. Deparafinizacija

Tri stakalca s histološkim prerezima se stave u nosač koji se zatim prekrije folijom i inkubira 5 min na 55°C u pećnici jačine 250W (Thermo Electron, SAD).

Zatim se nosa izvadi, folija se skine, a stakalca se stave na inkubaciju u toluen 3x15 min. Svakih 15 minuta toluen se zamijeni novim kako bi se one iš enja na uzorcima što bolje isprala. Nakon inkubacije u toluenu stakalca se izvade, papirom se osuši višak teku ine i prebace se u 96%-tni EtOH na 1 min. Sada slijedi rehidracija 5 min u 96%-tnom EtOH, zatim 5 min u 75%-tnom EtOH i na kraju 2x5min u destiliranoj vodi. Voda se svakih 5 min promijeni. U svakoj inkubaciji se stakalca konstantno moraju miješati kako bi kemikalije što bolje djelovale na sve dijelove tkiva.

2. Priprema za bojanje (oporavak antigenih mjesta)

Deparafinizirana stakalca se stave u nosa u koji je prethodno uliveno 450 ml citratnog pufera. Sve zajedno se kuha 2x5min u mikrovalnoj pe nici ja ine 750 W s tim da se izme u dva kuhanja otvore vrata. Stakalca se sada premjeste u toplu vodu prethodno zagrijanu na 60°C i ostave se u njoj sve dok se ne ohladi na sobnu temperaturu. Nakon hla enja se stakalca isperu 3x5 min u PBS puferu sobne temperature. PBS pufer se svakih 5 min promijeni.

3. Bojanje

U tri Petrijeve zdjelice se stavi filter papir prethodno navlažen s destiliranom vodom. One služe kao vlažne komore kako ne bi došlo do sušenja prereza. Sa stakalaca se pažljivo papirom obriše višak PBS pufera i hidrofobnim markerom odvoje prerezi na stakalcu da ne do e do miješanja protutijela. Sada se na svaki prerez nanese 50µl inkubacijskog pufera i inkubira se 30min uz povremeno miješanje. Nakon inkubacije se stakalca isperu u PBS puferu, pokupi se višak teku ine i vrate se u Petrijeve zdjelice. Na svaki prerez se nanese 50 µl primarnog protutijela koje se inkubira 60min uz povremeno miješanje. Nakon inkubacije stakalca se temeljno isperu 3x5 min u PBS puferu. Nakon svakih 5 min PBS pufer se promijeni.

Sada se na svaki prerez nanese 50 µl PBS pufera i 5 µl sekundarnog protutijela koje se inkubira u mraku 45 min na sobnoj temperaturi uz povremeno miješanje. Nakon inkubacije stakalca se ispiru 3x5 min u PBS puferu.

Nakon svakih 5 min PBS pufer se promijeni. Sada se sa stakalaca obriše višak teku ine, doda se 80 μ l 10%-tnog glicerola na svaki prerez i prekrije se pokrovnim stakalcem. Prerezi se analiziraju pod mikroskopom.

3.2.6. Analiza rezultata fluorescencijskim mikroskopom

Stakalca su promatrana fluorescencijskim mikroskopom Olympus BX51 s pripadaju om kamerom DP50 kroz filter tipa NB. Ekscitacijska svjetlost koja pobu uje fluorescenciju sekundarnih protutijela je valne duljine 490 nm, a svjetlost koju se o itava valne duljine 510 nm.

3.2.7. Analiza slika histoloških prereza

Slike histoloških prereza slikane kamerom Olympus DP50 fluorescencijskog mikroskopa Olympus BX51 obra ene su u programu analySIS® (Soft imaging system, GmbH, Njema ka). Izmjerene su apsorpcijske vrijednosti tkiva koje pokazuje signal fluorescencije, tkiva koje spontano fluorescira i pozadine. Vrijednosti su statisti ki obra ene programom analySIS® (Soft imaging system, GmbH, Njema ka), a podaci su grafi ki prikazani u Excelu (Microsoft). Rezultati su prikazani kao $M \pm SD$. Zna ajnost razlike me u skupinama su utvr ene Studentovim t-testom ili analizom varijanci (ANOVA).

4.REZULTATI

Radi utvrđivanja mogući oporavka dijabetičnog stanja djelovanjem stanica koštane srži miševi su podijeljeni u tri skupine. Miševi prve skupine su bili potpuno zdravi. Miševima druge skupine je injiciranjem aloksana inducirana šećerna bolest. Trećoj skupini miševa je 24 sata nakon tretmana aloksanom injicirano 1×10^6 stanica koštane srži. Treća skupina miševa je radi utvrđivanja stupnja oporavka prema tjednima istraživanja podijeljena na tri podskupine. Prva skupina je žrtvovana nakon 7, druga nakon 14 i treća nakon 28 dana. Svim skupinama miševa je jednom tjedno mjerena tjelesna masa i koncentracija glukoze u krvi.

4.1. TJELESNA MASA

Na početku istraživanja tjelesna masa svih skupina miševa kretala se prosječno oko 25 grama. Kroz 4 tjedna istraživanja u obje se skupine uočava trend smanjenja tjelesne mase za prosječno oko 5 grama (Tablica 1.). U skupini dijabetičnih miševa tretiranih koštanom srži tjelesna masa pada u odnosu na početnu masu tijela ili blago raste u odnosu na skupinu dijabetičnih miševa što upućuje na eventualne regenerativne sposobnosti stanica koštane srži.

Tablica 1. Promjena tjelesne mase kontrolnih miševa (kontrola), dijabeti nih miševa (dijabetes) i miševa tretiranih koštanom srži (dijabetes + KS) kroz etiri tjedna istraživanja.

Skupine (n)		Dani			
		0	7	14	28
mužjaci	Kontrola (12)	28,1±1,4*	28,3±1,2	28,9±1,3	29,6±2,1
	Dijabetes+ KS (18)	27,8±1,2	23,2±1,0	22,1±1,3	24,5±2,6##
	Dijabetes (12)	28,5±1,1	24,7±1,6	25,1±1,9	23,5±2,3##
ženke	Dijabetes + KS (9)	20,1±0,9	17,1±0,5	17,6±0,6	16,7±0,4
	Dijabetes (6)	20,1±1,1	18,1±0,8	18,6±0,9	18,0±1,1

n – broj miševa u pojedinoj skupini

*- težina tijela u gramima

- Dijabetes+KS vs. Dijabetes, $t = 0,23233$; $p = 0,82293$ prema Studentovom t-testu nije značajno.

4.2. RAZINA GLUKOZE U KRVI

Kroz 4 tjedna istraživanja razina glukoze u krvi je kod obje skupine miševa porasla na prosječno 35 mmol/L (Tablica 2.). Nekoliko miševa iz skupine koja je tretirana stanicama koštane srži pokazuje pad razine glukoze u krvi nakon 14. i 28. tjedna istraživanja u odnosu na dijabetične miševе što upućuje na mogućnost regeneracije stanicama koštane srži. Zapažen je pad razine glukoze u odnosu na početne vrijednosti (0. i 14. dana kod mužjaka, 0. i 28. dana kod ženki), ali prosječno nisu dosegnute vrijednosti normoglikemije.

Tablica 2. Razine glukoze u krvi kontrolnih miševa (kontrola), dijabeti nih miševa (dijabetes) i miševa tretiranih koštanom srži (dijabetes + KS) kroz etiri tjedna istraživanja

Skupine (n)		Dani			
		0	7	14	28
mužjaci	Kontrola (12)	6,4±0,9*	5,3±0,5	4,9±0,9	6,6±0,6
	Dijabetes+ KS (18)	30,4±0,9	26,1±0,8	20,7±0,8###	28,7±2,3
	Dijabetes (12)	31,4±1,1	34,7±1,6	29,1±1,9	33,5±2,9
ženke	Dijabetes + KS (9)	29,8±1,8	23,9±2,3	26,5±2,3	21,6±1,4***
	Dijabetes (6)	31,6±2,8	28,1±2,8	31,6±2,9	32,0±2,1

n – broj miševa u pojedinoj skupini

*- koncentracija glukoze mmol/L

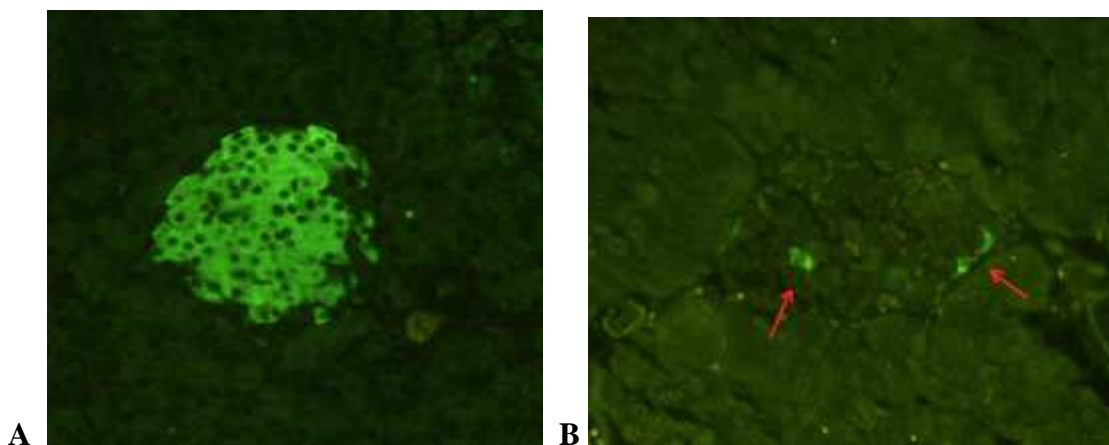
- Dijabetes+KS mužjaci (0 vs 14 dan) $t = -8,515$, $p = 0,001$ prema Studentovom t-testu je zna ajno sniženo.

*** - Dijabetes+KS ženke (0 vs 28 dan) $t = -8,414$, $p = 0,001$ prema Studentovom t-testu je zna ajno sniženo.

4.3. IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA

4.3.1. Broj Langerhansovih otočića i -stanica

Usporedbom histoloških prereza zdravih miševa i dijabetičnih miševa (šeherni bolest izazvana djelovanjem aloksana) uočava se smanjen broj Langerhansovih otočića na histološkim prerezima dijabetičnih miševa. Nakon obrade prereza monoklonskim protutijelom specifičnim za inzulin vidljivo da je u Langerhansovom otočiću dijabetičnog miša preostalo svega nekoliko aktivnih -stanica (Slika 6. B) koje još uvijek ekspimiraju inzulin u odnosu na zdrav Langerhansov otočić koji je u potpunosti ispunjen aktivnim -stanicama (Slika 6. A).



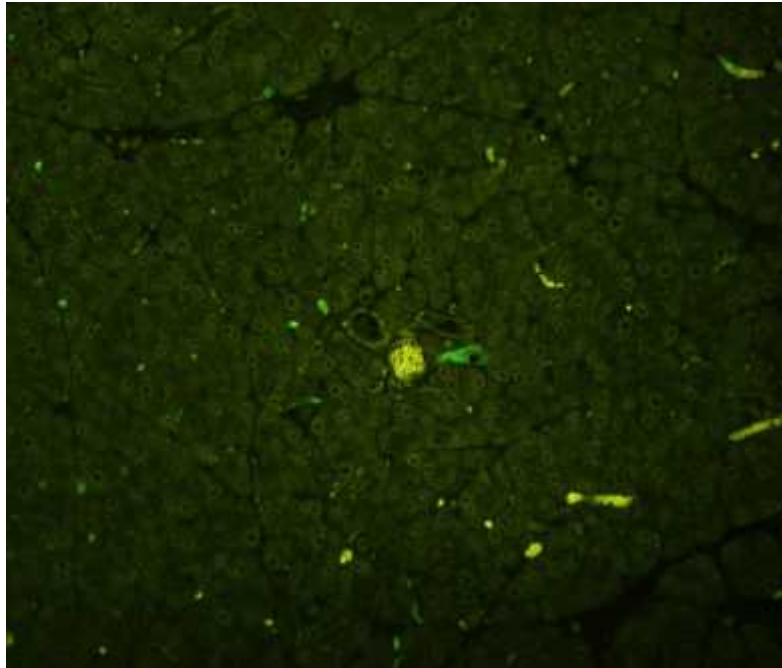
Slika 6. Histološki prezet tkiva guštera e zdravog miša s Langerhansovim otočićem ispunjenim -stanicama koje ekspimiraju inzulin (A) u usporedbi s prezetom tkiva guštera e dijabetičnog miša (B). Uo lijevo je izrazito smanjenje broja -stanca u Langerhansovim otočićima dijabetičnih miševa.

4.3.2. Detekcija ekspresije Nanog-a, Pdx-1, ErbB-3 i inzulina nakon 14 dana

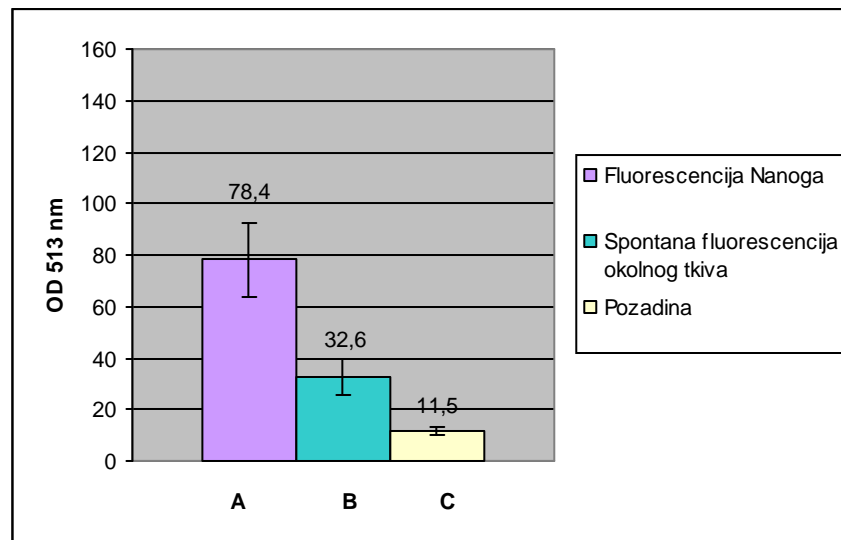
Radi utvrđivanja regenerativne sposobnosti stanica koštane srži skupina dijabeti nih miševa (šećerna bolest izazvana djelovanjem aloksana) podvrgnuta je djelovanju stanica koštane srži (dalje u tekstu «skupina miševa tretiranih koštanom srži»). Miševi su 24h nakon tretmana aloksanom primili 1×10^6 stanica koštane srži. Kao kontrolna skupina uzeti su miševi koji nakon tretmana aloksanom nisu primili stanice koštane srži (dalje u tekstu «dijabeti na skupina miševa»). Sve životinje su žrtvovane nakon 14 dana i izrađeni su histološki prerezi tkiva gušterače i slezene. Prerezi su tretirani monoklonskim protutijelom specifičnim za pojedini promatrani marker te sekundarnim protutijelom potrebnim za detekciju fluorescencije. Slike svih histoloških prereza su obrađene programom koji analizira jačinu fluorescencije pojedinog markera u odnosu na okolno tkivo i podlogu.

EKSPRESIJA NANOG-A

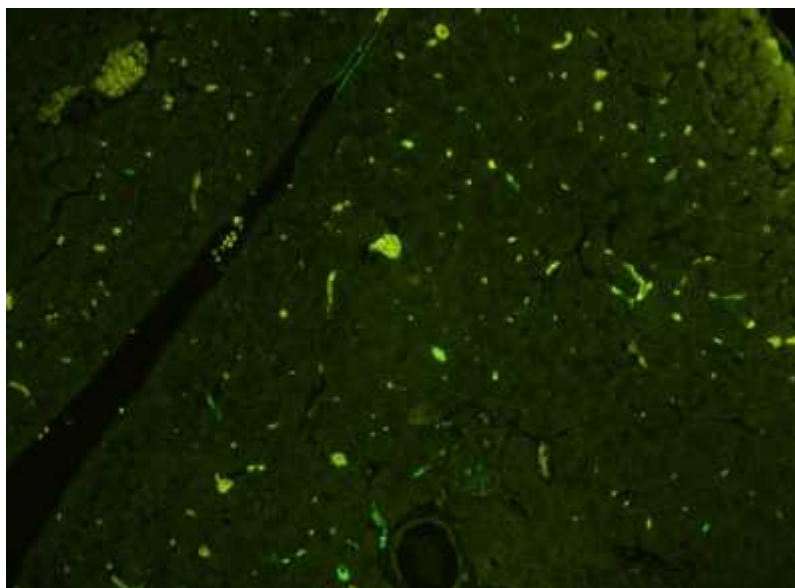
Histološki prerezi tkiva gušterače dijabeti nih miševa i miševa koji su primili stanice koštane srži tretirani su specifičnim protutijelom za Nanog (Anti-mNanog Affinity Purified Goat IgG) te sekundarnim protutijelom za detekciju fluorescencije (Rabbit anti-goat IgG-FITC). Na prerezima dijabeti nih miševa uočava se mali broj stanica pozitivnih na ekspresiju Nanog-a koje su vjerojatno rezultat endogenog samooporavka. (Slika 7.) Prerezi miševa tretiranih koštanom srži pokazuju trostruko veći broj stanica pozitivnih na Nanog u odnosu na dijabeti ne miševе (Slika 9. i 11.) Usporedbom jačine fluorescencije pozitivnih struktura prerezi miševa tretiranih koštanom srži daju jači signal za ekspresiju Nanog-a u odnosu na prereze dijabeti nih miševa (Slike 8., 10. i 12.).



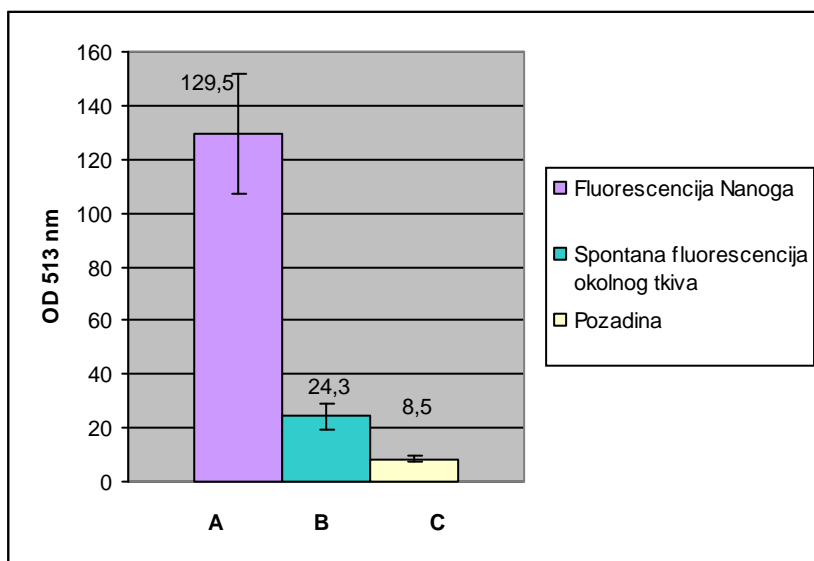
Slika 7. Histološki presjek tkiva guštera e dijabeti nog miša. Unutar egzokrinog tkiva guštera e se uo avaju stanice pozitivne na ekspresiju Nanog-a.



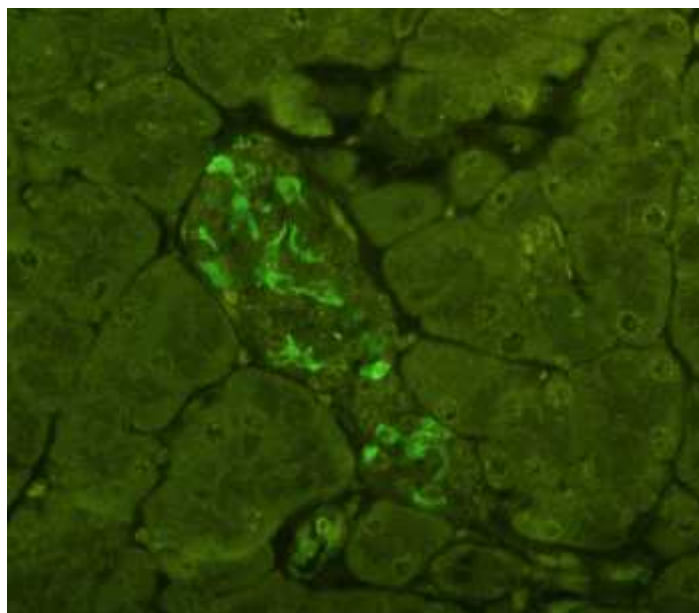
Slika 8. Analiza histološkog prereza guštera e dijabeti nog miša. Ja ina fluorescencije stanica pozitivnih na Nanog (A) u odnosu na spontanu fluorescenciju okolnog tkiva (B) i pozadine (C). Prema testu ANOVA ($F= 1593,5736$, $p<0,05$) zna ajno razli ito.



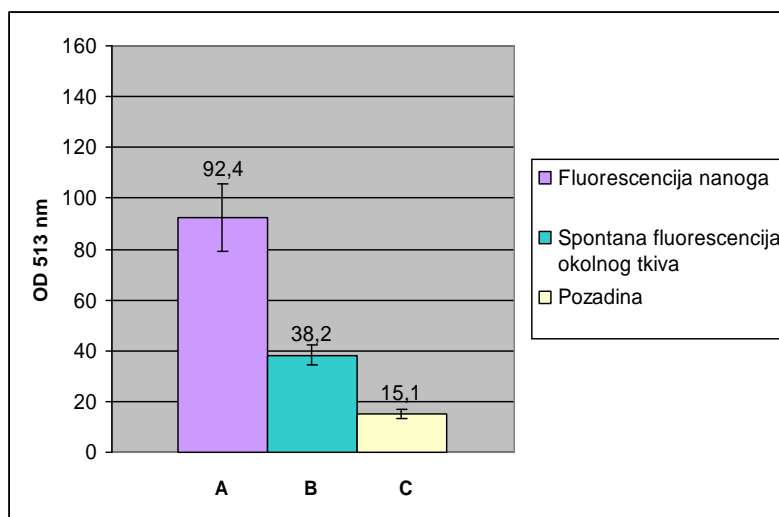
Slika 9. Histološki presjek tkiva guštera e dijabeti nog miša tretiranog koštanom srži. Unutar egzokrinog tkiva guštera e se uo ava veliki broj stanica pozitivnih na ekspresiju Nanog-a



Slika 10. Analiza histološkog prereza guštera e dijabeti nog miša tretiranog koštanom srži. Ja ina fluorescencije stanica pozitivnih na Nanog (A) u odnosu na spontanu fluorescenciju okolnog tkiva (B) i pozadine (C). Prema testu ANOVA ($F= 2315,78879$, $p<0,05$) zna ajno razli ito.



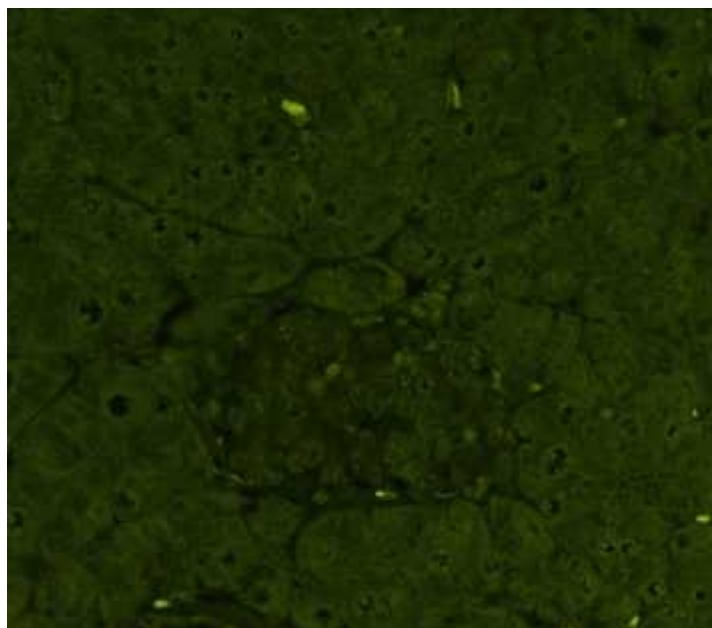
Slika 11. Histološki presjek tkiva guštera e dijabeti nog miša tretiranog koštanom srži. Unutar Langerhansovog oto i a se uo ava veliki broj stanica pozitivnih na ekspresiju Nanog-a.



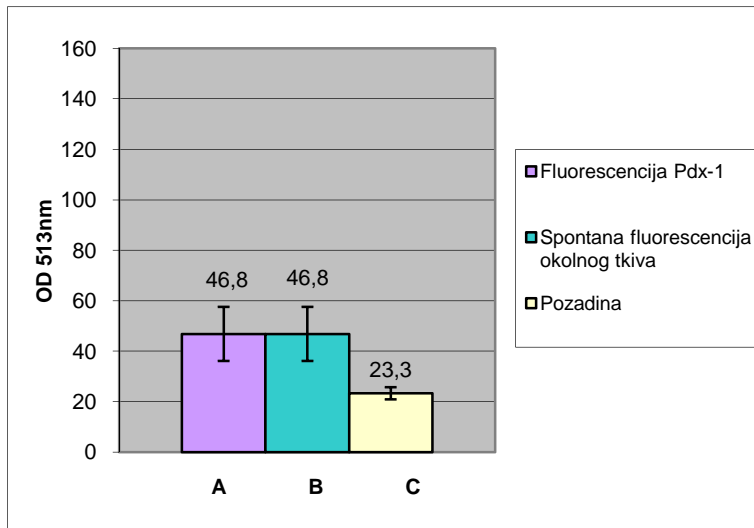
Slika 12. Analiza histološkog prereza guštera e dijabeti nog miša tretiranog koštanom srži. Ja ina fluorescencije stanica pozitivnih na Nanog unutar Langerhansovog oto i a (A) u odnosu na spontanu fluorescenciju okolnog tkiva (B) i pozadine (C). Prema testu ANOVA ($F= 2097,2716$, $p<0,05$) zna ajno razli ito.

EKSPRESIJA PDX-1

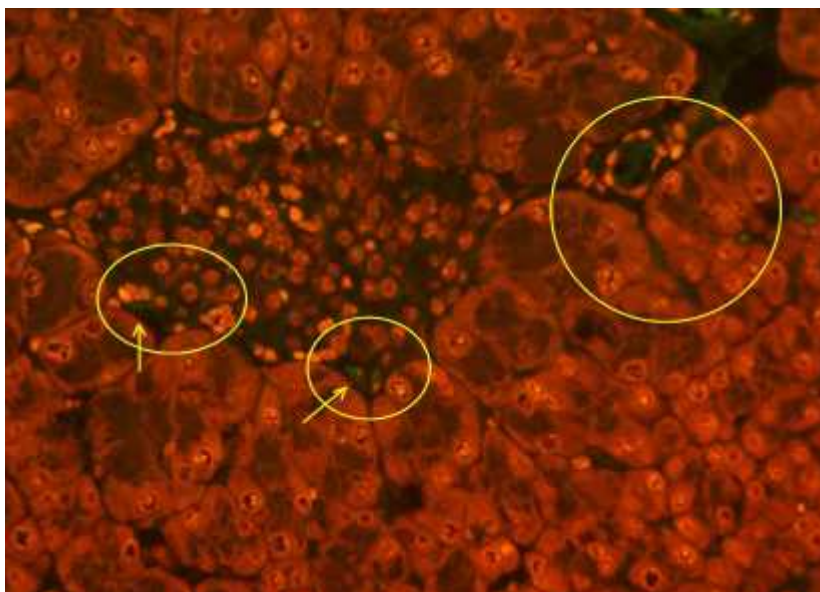
Histološki prerezi tkiva guštera e skupine dijabeti nih miševa i skupine miševa podvrgnutih djelovanju koštane srži tretirani su specifi nim protutijelom za Pdx-1 (Anti-h/m PDX-1 Purified Mouse Monoclonal IgG_{2B}) te sekundarnim protutijelom za detekciju fluorescencije (Anti-mouse IgG Fluorescein Conjugated Goat F(ab')₂). Na prerezima dijabeti nih miševa ne uo avaju se strukture koje eksprimiraju Pdx-1. (Slika 13.) Na prerezima miševa tretiranih koštanom srži uo ava se nekoliko stanica unutar Langerhansovog oto i a koje pokazuju pozitivan signal u obliku laganog zelenog obojenja citoplazme. Radi boljeg kontrasta prerez je dodatno obojan propidijevim jodidom (Slika 15.). Istim protutijelom su dodatno tretirani prerezi limfnog vora i slezene miševa tretiranih koštanom srži. Na oba prereza se unutar nekih stanica vidi pozitivan signal (Slika 17. i 19.). Analiza slike prereza dijabeti nog tkiva pokazuje isklju ivo spontanu fluorescenciju (Slika 14.). Analizom slika prereza tkiva tretiranog koštanom srži uo eno je zna ajno pove anje ja ine fluorescencije stanica pozitivnih na Pdx-1 u odnosu na spontanu fluorescenciju okolnog tkiva (Slika 16.,18. i 20.).



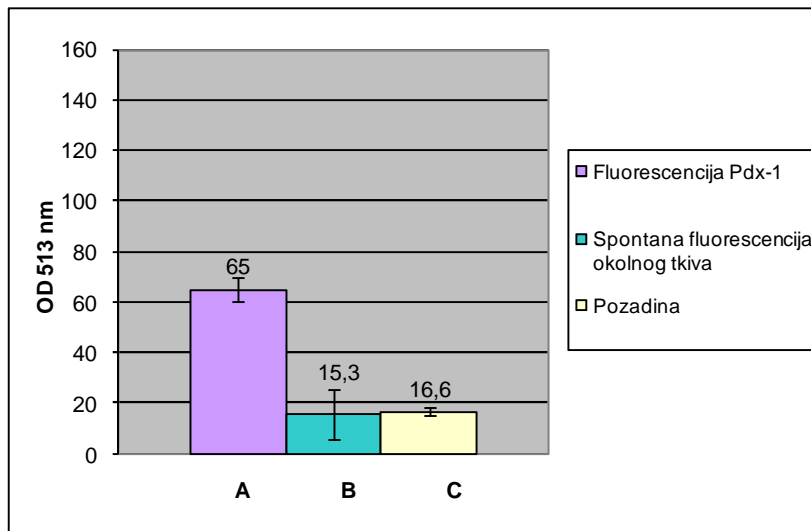
Slika 13. Histološki presjek tkiva guštera e dijabeti nog miša. Na slici nema vidljivih znakova ekspresije Pdx-1.



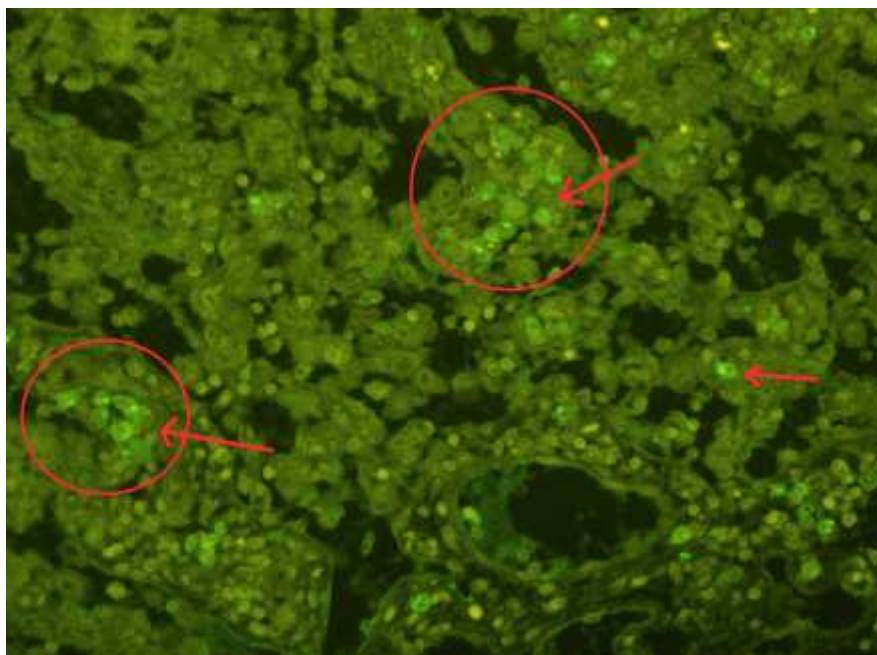
Slika 14. Analiza histološkog prereza tkiva guštera e dijabeti nog miša. Na prerezu su prisutne isključivo spontana fluorescencija (A i B) te fluorescencija pozadine (C). Prema testu ANOVA ($F= 259,10546$, $p<0,85$) nije značajno različit.



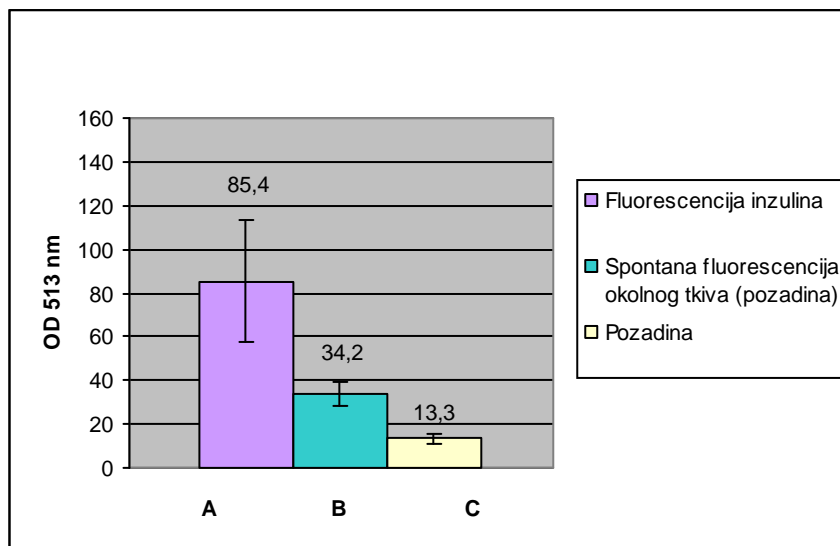
Slika 15. Histološki prerez tkiva guštera e dijabeti nog miša tretiranog koštanom srži kontrastiran propidijevim jodidom. Na periferiji Langerhansovog oto i a uo avaju se stanice pozitivne na ekspresiju Pdx-1.



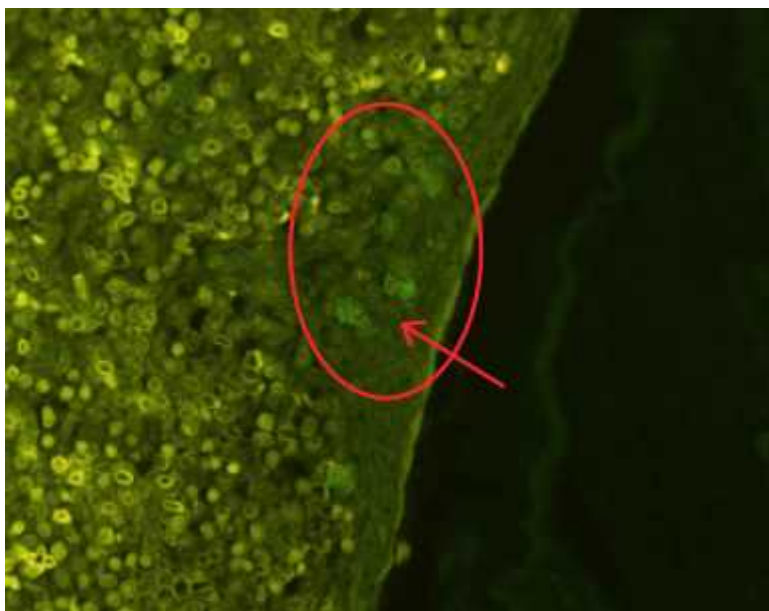
Slika 16. Analiza histološkog prereza tkiva guštera e dijabeti nog miša tretiranog koštanom srži. Ja ina fluorescencije citoplazme stanica pozitivnih na Pdx-1 (A) u odnosu na spontanu fluorescenciju okolnog tkiva (B) i pozadine (C). Prema testu ANOVA ($F= 2097,2716$, $p<0,05$) zna ajno razli ito.



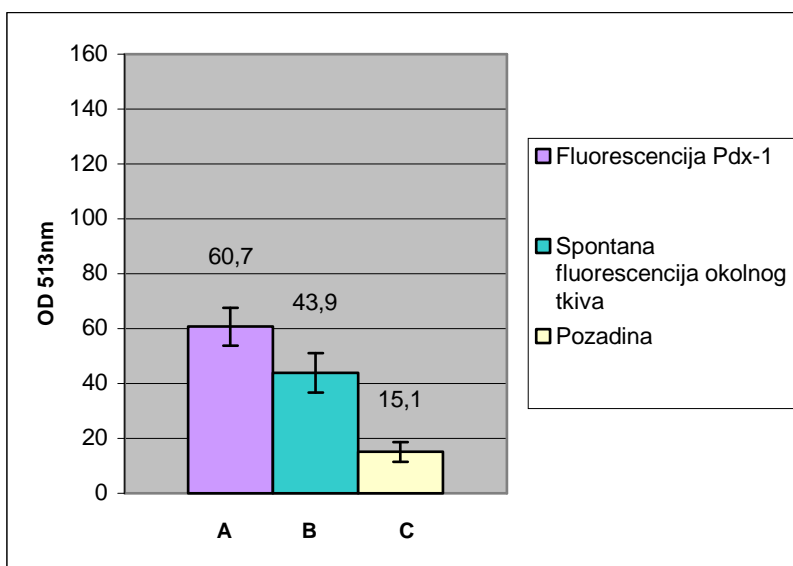
Slika 17. Histološki prerez limfnog vora dijabeti nog miša tretiranog koštanom srži. Citoplazme stanica su pozitivne na Pdx-1.



Slika 18. Analiza histološkog prereza limfnog vora dijabeti nog miša tretiranog koštanom srži. Ja ina fluorescencije citoplazme stanica pozitivnih na Pdx-1 (A) u odnosu na spontanu fluorescenciju okolnog tkiva (B) i pozadine (C). Prema testu ANOVA ($F= 1973,89796$, $p<0,05$) zna ajno razli ito.



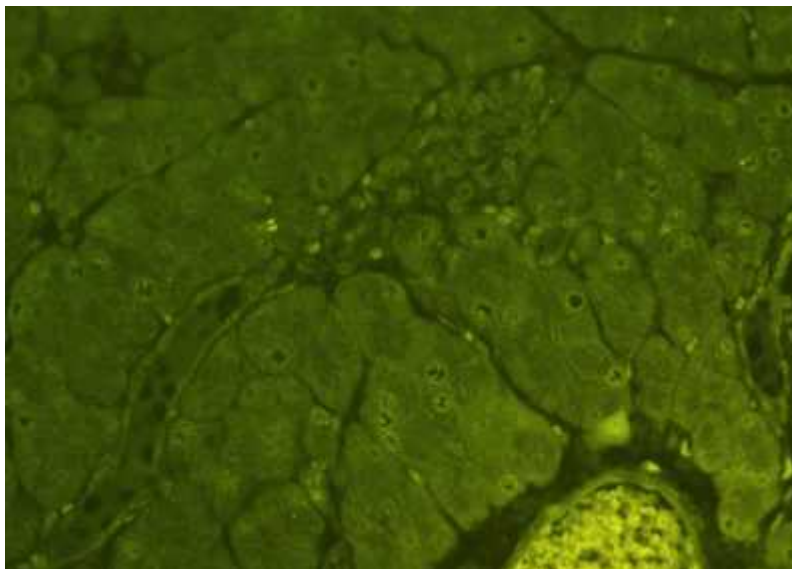
Slika 19. Histološki prerez slezene dijabeti nog miša tretiranog koštanom srži. Unutar tkiva se uo avaju stanice s citoplazmom pozitivnom na Pdx-1.



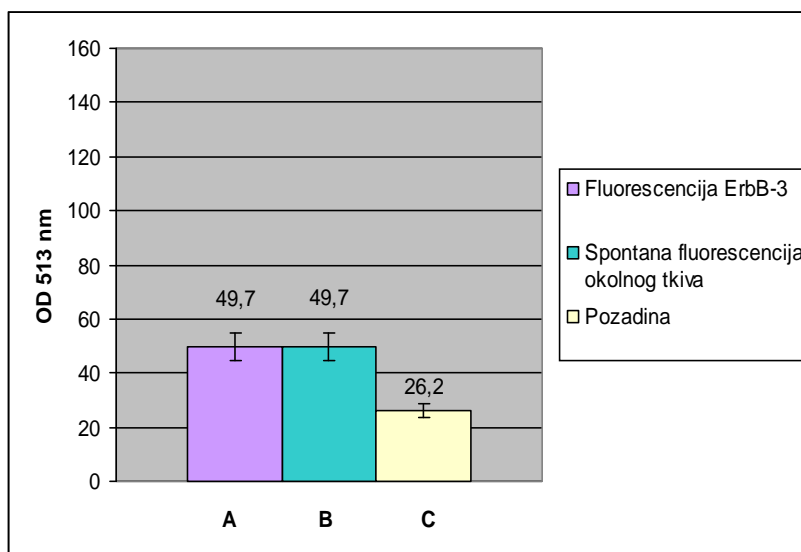
Slika 20. Analiza histološkog prereza slezene dijabeti nog miša tretiranog koštanom srži. Ja ina fluorescencije citoplazme stanica pozitivnih na Pdx-1 (A) u odnosu na spontanu fluorescenciju okolnog tkiva (B) i pozadine (C). Prema testu ANOVA ($F=1178,79836$, $p<0,05$) zna ajno razli ito.

EKSPRESIJA ErbB-3

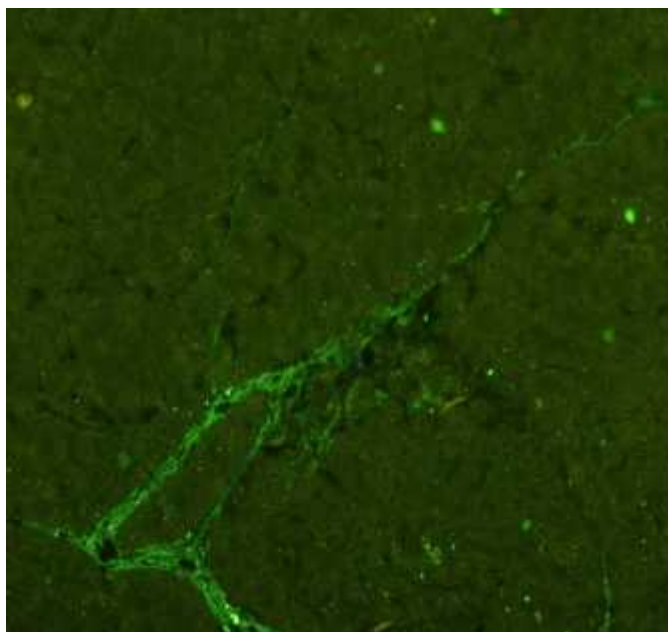
Histološki prerezi tkiva guštera e dijabeti nih miševa i miševa koji su primili stanice koštane srži tretirani su specifi nim protutijelom za ErbB-3 (Goat Polyclonal IgG) te sekundarnim protutijelom za detekciju fluorescencije (Rabbit anti-goat IgG-FITC). Na prerezima dijabeti nih miševa ne uo avaju se strukture koje eksprimiraju ErbB-3 (Slika 21.) dok se na prerezima miševa tretiranih koštanom srži uo ava dio tkiva s pozitivnim signalom (Slika 23.). Analiza slike prereza dijabeti nog tkiva pokazuje isklju ivo spontanu fluorescenciju (Slika 22.) dok je analizom slika tkiva miševa tretiranih koštanom srži uo eno pove anje ja ine fluorescencije tkiva pozitivnog na ErbB-3 u odnosu na spontanu fluorescenciju okolnog tkiva (Slika 24.).



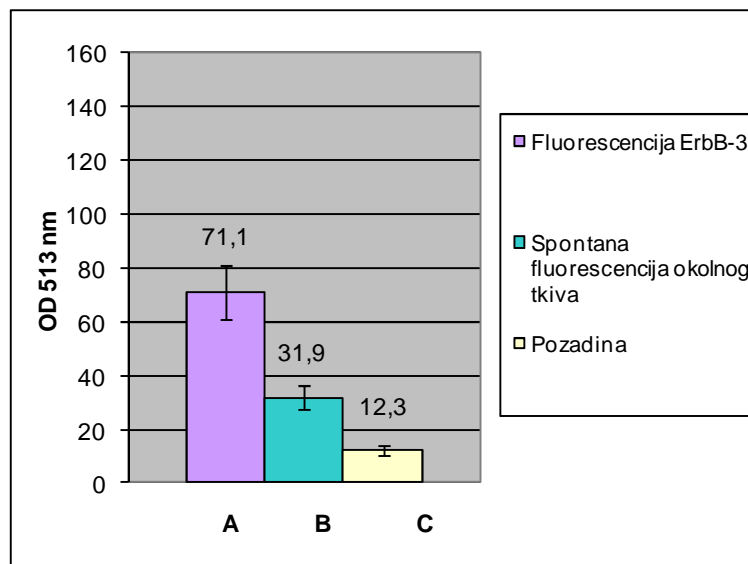
Slika 21. Histološki presjek tkiva guštera e dijabeti nog miša . Nema vidljive ekspresije ErbB-3.



Slika 22. Analiza histološkog prereza tkiva guštera e dijabeti nog miša. Na prerezu su prisutne isklju ivo spontana fluorescencija (A i B) te fluorescencija pozadine (C). Prema testu ANOVA ($F= 473,59796$, $p<0,8$) nije zna ajno razli ito.



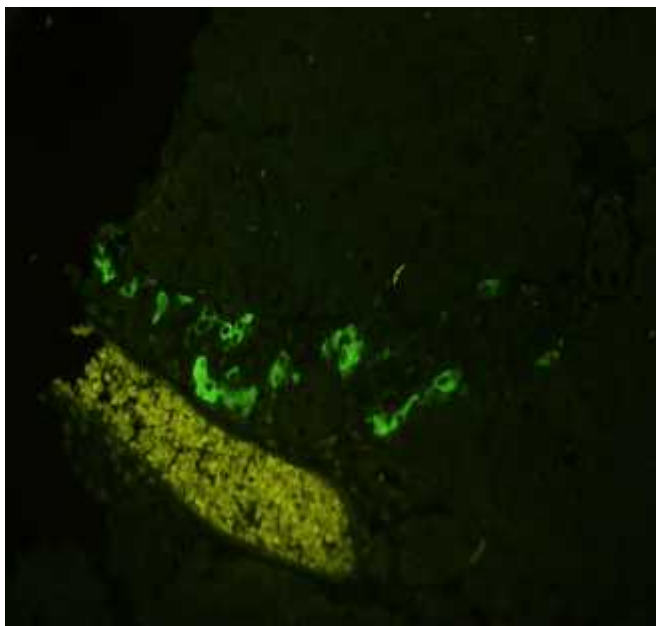
Slika 23. Histološki presjek tkiva guštera e dijabeti nog miša tretiranog koštanom srži. Uo a va se dio tkiva pozitivan na ekspresiju ErbB-3.



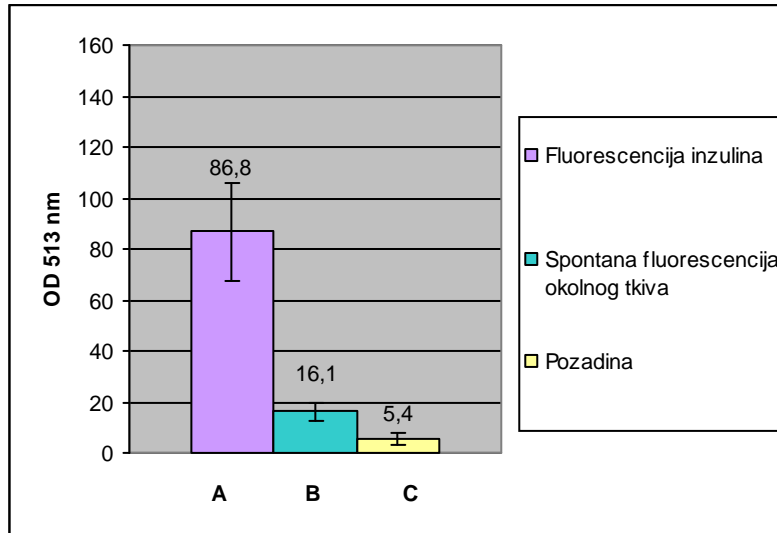
Slika 24. Analiza histološkog prereza guštera e dijabeti nog miša tretiranog koštanom srži. Ja ina fluorescencije tkiva pozitivnog na ErbB-3 (A) u odnosu na spontanu fluorescenciju okolnog tkiva (B) i pozadine (C). Prema testu ANOVA ($F=16783,25796$, $p<0,05$) zna ajno razli ito.

EKSPRESIJA INZULINA

Histološki prerezi guštera e miševa koji su primili stanice koštane srži tretirani su specifi nim protutijelom za inzulin (Anti-h/m/b Insulin Purified Rat Monoclonal IgG_{2A}), te sekundarnim protutijelom za detekciju fluorescencije (Anti-rat IgG Fluorescein Conjugated Goat F(ab')₂). Nakon tretiranja prereza uo en je velik broj manjih stanica s velikom jezgrom grupiranih na periferiji Langerhansovih oto i a. Uo ava se i zna ajna pojava fluorescencijskih signala u tim stanicama što upu uje na ekspresiju inzulina (Slika 25.). Analizom slika tretiranih histoloških prereza uo eno je i zna ajno pove anje ja ine fluorescencije perifernih stanica u odnosu na spontanu fluorescenciju okolnog tkiva (Slika 26.).



Slika 25. Histološki prerez tkiva guštera e dijabeti nog miša tretiranog koštanom srži. Slika prikazuje Langerhansov oto i s periferno položenim stanicama pozitivnim na inzulin.



Slika 26. Analiza histološkog prereza tkiva guštera e dijabeti nog miša tretiranog koštanom srži. Ja ina fluorescencije tkiva pozitivnog na inzulini (A) u odnosu na spontanu fluorescenciju okolnog tkiva (B) i pozadine (C). Prema testu ANOVA ($F=2573,59766$, $p<0,05$) zna ajno razli ito.

4.3.3. Usporedba ekspresije Nanog-a, Pdx-1, ErbB-3 i inzulina nakon 7., 14. i 28. dana

Radi utvrđivanja stupnja diferencijacije stanica koštane srži kroz vremensko razdoblje od 28 dana promatrane su tri skupine dijabetičkih miševa (šećerna bolest izazvana djelovanjem aloksana). Sve tri skupine su primile 24h nakon tretmana aloksanom 1×10^6 stanica koštane srži. Prva skupina miševa je žrtvovana nakon 7 dana, druga skupina nakon 14 dana, a treća skupina nakon 28 dana. Kao kontrolne skupine uzeti su miševi koji nakon tretmana aloksanom nisu primili stanice koštane srži i potpuno zdravi, netretirani miševi. Žrtvovanim miševima su izvađene gušterače i slezena te su napravljeni histološki prerezi. Prerezi su tretirani monoklonskim protutijelom specifičnim za pojedini promatrani marker te sekundarnim protutijelom potrebnim za detekciju fluorescencije. Analizom histoloških prereza napravljena je usporedba ekspresije pojedinog markera nakon 7., 14. i 28. dana radi utvrđivanja stupnja ekspresije matičnih stanica prema pankreasnoj liniji.

EKSPRESIJA NANOG-A

Na prerezima prve skupine miševa žrtvovanih nakon 7 dana uočava se mali broj stanica pozitivnih na ekspresiju Nanog-a koje su vjerojatno rezultat endogenog samooporavka. Prerezi druge skupine miševa žrtvovanih nakon 14 dana pokazuju trostruko veći broj stanica pozitivnih na Nanog u odnosu na miševе žrtvovane nakon 7 dana. Na prerezima skupine miševa žrtvovanih nakon 28 dana ne uočava se ekspresija Nanog-a (Slika 27.).

EKSPRESIJA PDX-1

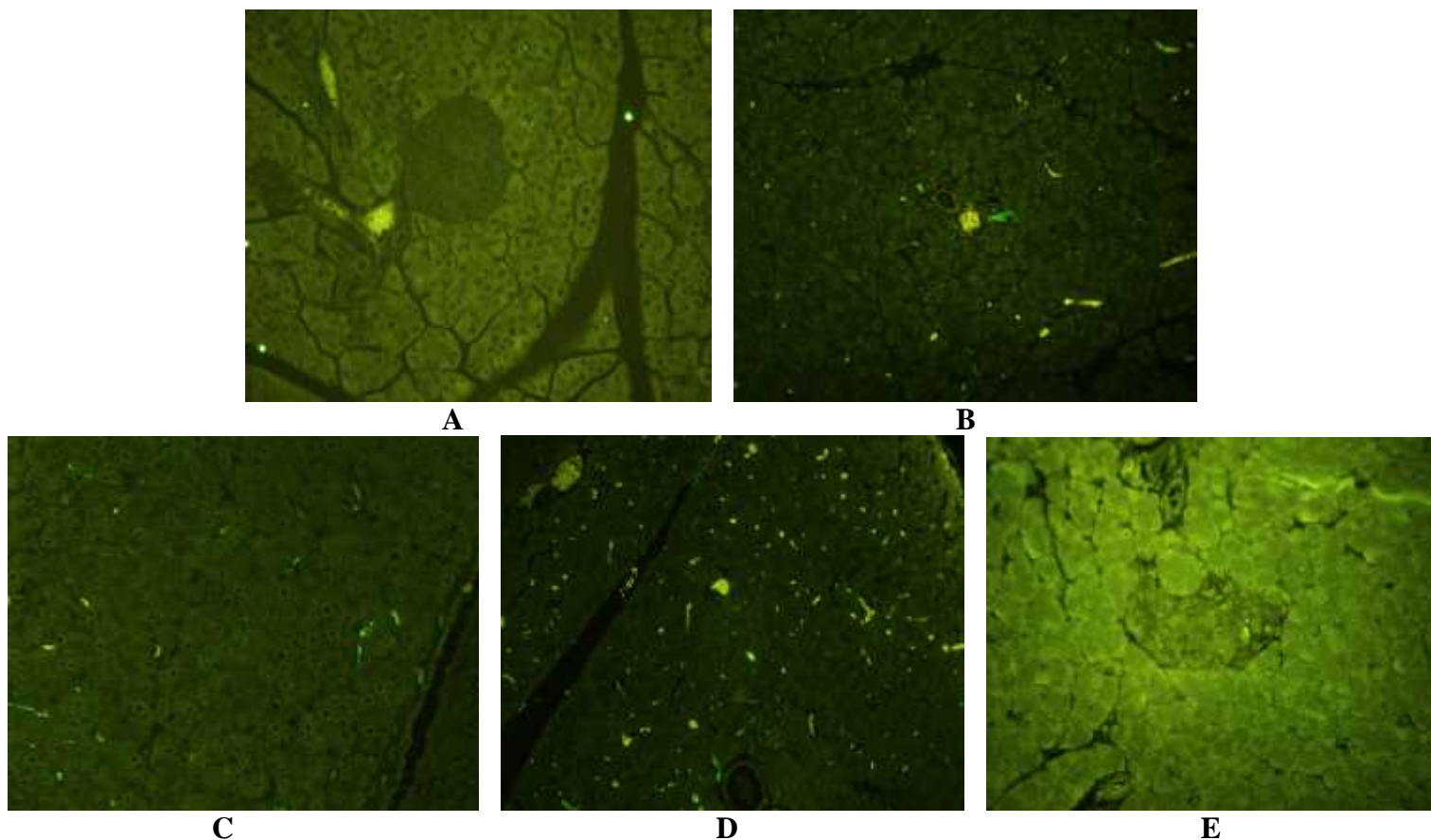
Na prerezima prve skupine miševa žrtvovanih nakon 7 dana uoava se nekoliko stanica unutar Langerhansovog otočića koje pokazuju pozitivan signal u obliku laganog zelenog obojenja citoplazme. Na prerezima druge skupine miševa žrtvovanih nakon 14 dana uoava se velik broj stanica koje pokazuju ekspresiju Pdx-a kroz cijeli Langerhansov otočić, a najviše njih na periferiji. Na prerezima miševa žrtvovanih nakon 28 dana nema vidljive ekspresije Pdx-1 u gušteraici. Radi boljeg kontrasta prerezi su dodatno obojani propidijevim jodidom (Slika 28.).

EKSPRESIJA ERBB-3

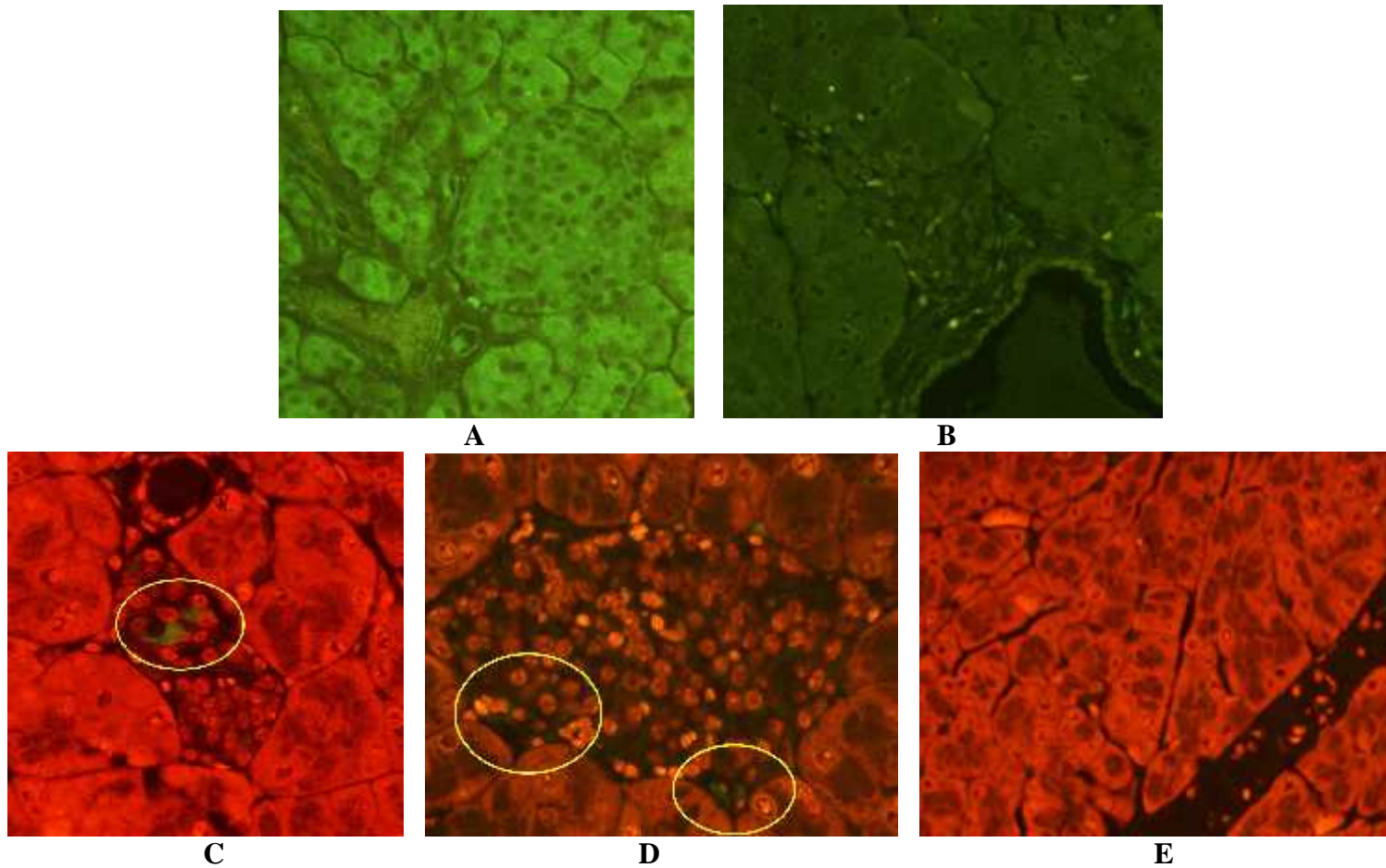
Prerezi prve skupine miševa žrtvovanih nakon 7 dana ne pokazuju ekspresiju ErbB-3. Na prerezima miševa žrtvovanih nakon 14 dana uoava se dio tkiva sa pozitivnim signalom. Na prerezima miševa žrtvovanih nakon 28 dana uoava se slaba ekspresija ErbB-3 u samo jednom dijelu tkiva gušteraice (Slika 29.).

EKSPRESIJA INZULINA

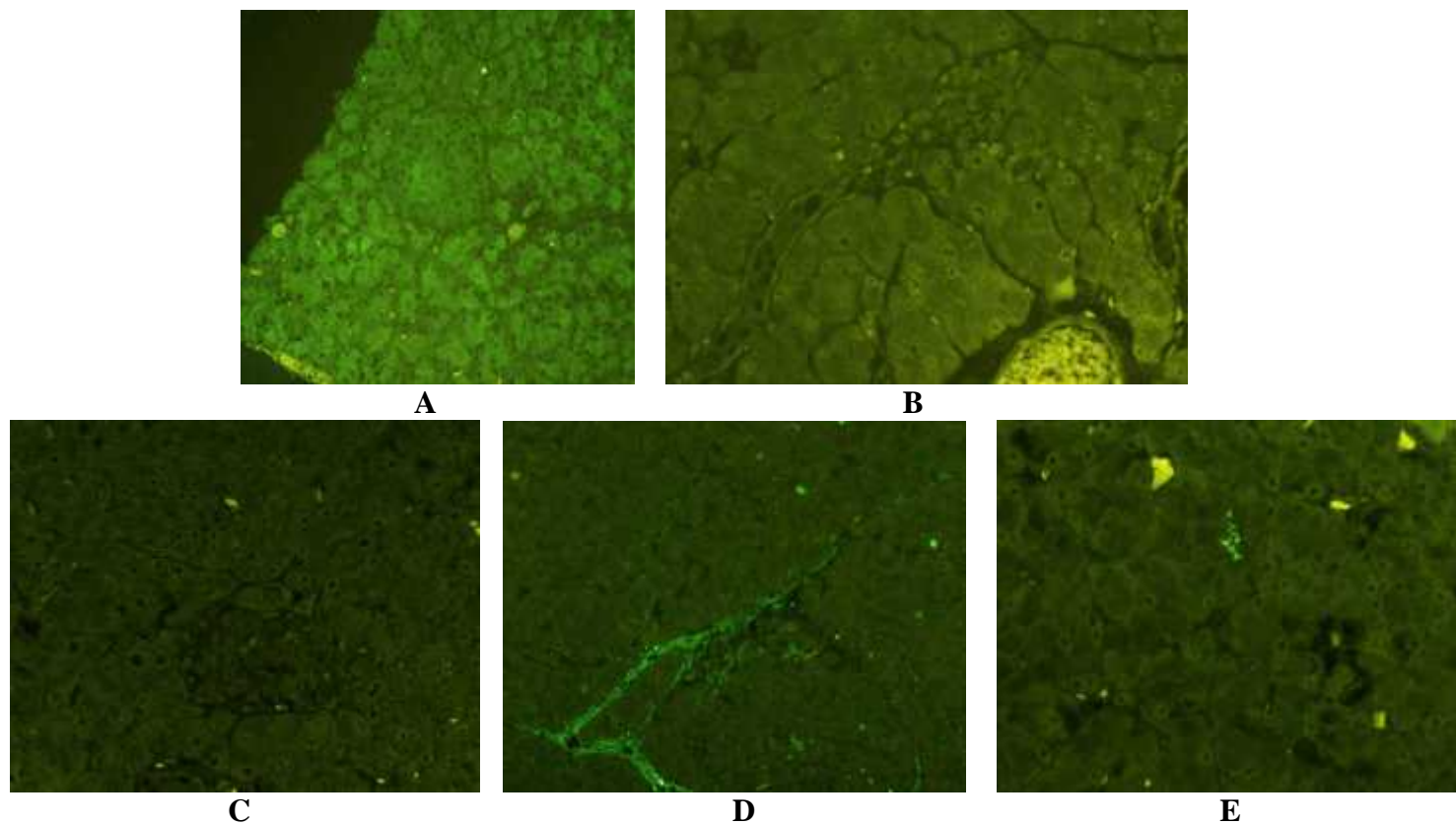
Na prerezima prve skupine miševa žrtvovanih nakon 7 dana uoava se mali broj povećanih β -stanica u središtu Langerhansovog otočića pozitivnih na ekspresiju inzulina. Na prerezima druge skupine miševa žrtvovanih nakon 14 dana na periferiji Langerhansovog otočića se uoavaju male stanice s velikom jezgrom pozitivne na ekspresiju inzulina. Na prerezima treće skupine miševa žrtvovanih nakon 28 dana vidi se cijeli Langerhansov otočić ispunjen malim stanicama sa velikom jezgrom koje pokazuju ekspresiju inzulina (Slika 30.).



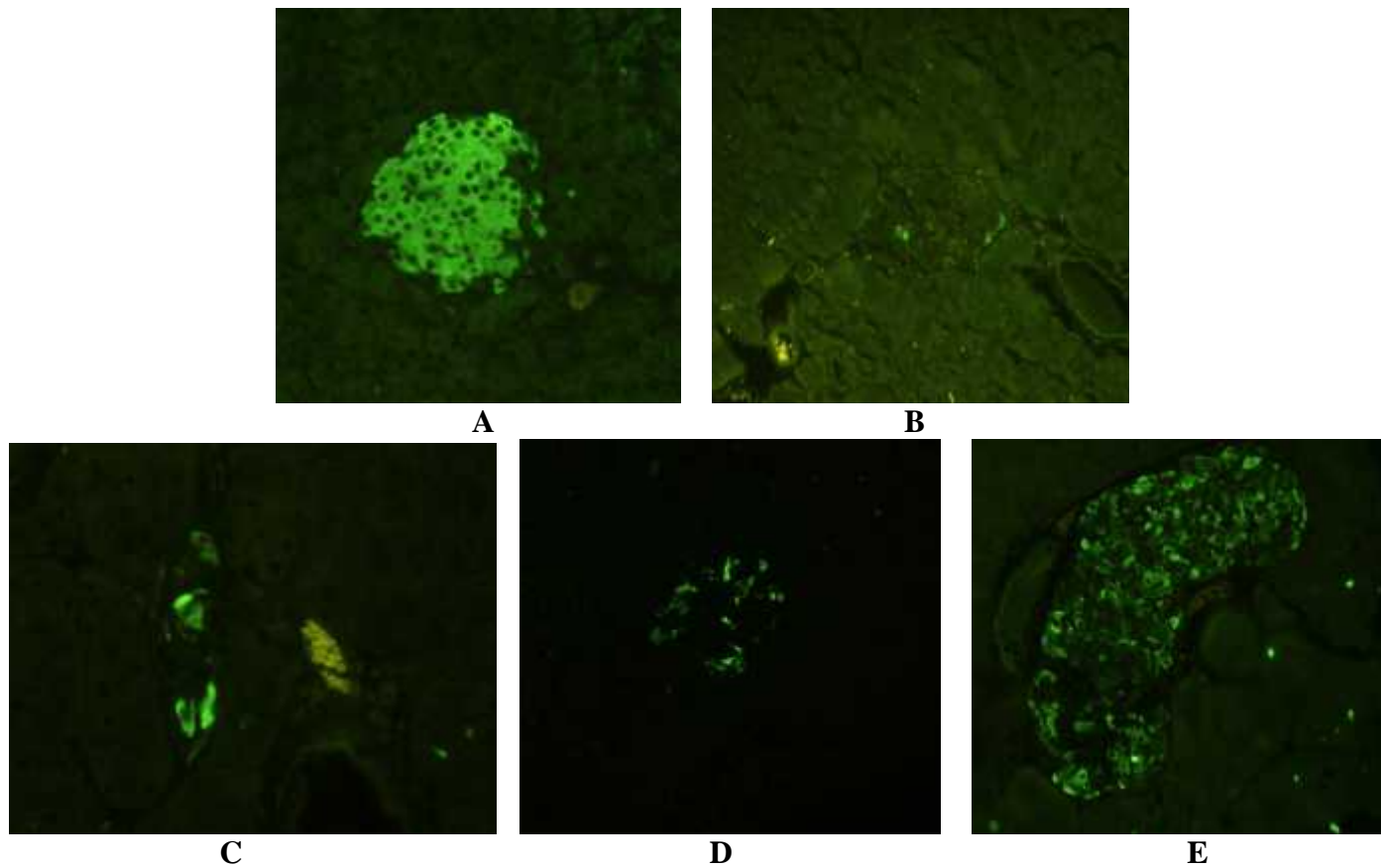
Slika 27. Histološki presjek tkiva guštera e zdravog miša (A), dijabeti nog miša (B) i miševa koji su primili stanice koštane srži žrtvovanih nakon 7 dana (C), 14 dana (D) i 28 dana (E). Na prerezu A nema vidljive ekspresije Nanoga dok je ekspresija na prerezu B rezultat endogenog samooporavka. Na prerezu D se unutar egzokrinog tkiva guštera e uo avaju stanice pozitivne na ekspresiju Nanoga u trostruko ve em broju u odnosu na prerez C. Na prerezu E nema uo ljive ekspresije Nanog-a.



Slika 28. Histološki presjek tkiva guštera e zdravog miša (A), dijabeti nog miša (B) i miševa koji su primili stanice koštane srži žrtvovanih nakon 7 dana (C), 14 dana (D) i 28 dana (E). Prerez C prikazuje dvije stanice sa citoplazmom pozitivnom na Pdx-1. Na prerezu D se unutar Langerhansovog oto i a uo ava velik broj periferno položenih stanica pozitivnih na ekspresiju Pdx-1. Na prerezima A, B i E nema uo ljive ekspresije Pdx-1.



Slika 29. Histološki presjek tkiva guštera e zdravog miša (A), dijabeti nog miša (B) i miševa koji su primili stanice koštane srži žrtvovanih nakon 7 dana (C), 14 dana (D) i 28 dana (E). Na prerezima A, B i C nema vidljive ekspresije ErbB-3 dok se na prerezima D i E vidi dio tkiva pozitivan na ekspresiju ErbB-3.



Slika 30. Histološki presjek tkiva guštera e zdravog miša (A), dijabeti nog miša (B) i miševa koji su primili stanice koštane srži žrtvovanih nakon 7 dana (C), 14 dana (D) i 28 dana (E). Prerez A prikazuje zdrav Langerhansov oto i u potpunosti ispunjen -stanicama. Prerez B prikazuje oto i sa preostalim -stanicama nakon djelovanja aloksana. Na prerezu C se uo avaju pove ane -stanice unutar Langerhansovog oto i a pozitivne na ekspresiju inzulina. Na prerezu D se vide male stanice s velikom jezgrom položene periferno. Prerez E prikazuje u potpunosti ispunjen Langerhansov oto i sa stanicama pozitivnim na ekspresiju inzulina.

5. RASPRAVA

Iznimna ozbiljnost šeerne bolesti oituje se u brojki od 200 milijuna trenutno oboljelih ljudi u svijetu koja e se prema podacima do 2030. godine povisiti na više od 300 milijuna oboljelih (Noguchi, 2007). Trenutno dostupni na ini lije enja podrazumijevaju doživotnu samokontrolu oboljele osobe, potpunu angažiranost oko vlastitog zdravlja, a naposljetku i ovisnost o egzogenom uzimanju inzulina. U svijetu se radi veliki broj istraživanja kojima bi se pronašao trajniji na in lije enja ove bolesti koji bi oboljelim osobama omogu io produljenje i poboljšanje kvalitete života.

Zbog izrazito važnog svojstva mati nih stanica da se mogu diferencirati u sve tipove stanica u tijelu napravljen je veliki broj istraživanja o mogu nostima njihovog korištenja u terapijske svrhe. Istraživanja se uglavnom rade na miševima ili štakorima zbog lakog baratanja i potpune kontrole tijekom eksperimenta, a baziraju se na induciranom ošte enju nekog organa koje se onda pokušava sanirati transplantacijom mati nih stanica. Specifi no ošte enje guštera e postiže se nekim od citotoksi nih analoga glukoze koji uzrokuje specifi nu nekrozu -stanica te tako inducira dijabetes u organizmu u koji je iniciran (Lenzen, 2007). Napravljeni su istraživanja koja ukazuju da u stanju ošte enja nekog organa stanice ošte enog tkiva ekspimiraju određeni faktor na svojoj stani noj površini koji onda stanice koštane srži prepoznaju svojim receptorima i vežu se na njega (Papayannopoulou i sur., 2001). Ovo je vrlo važna pretpostavka na kojoj bi po ivala osnova terapije mati nim stanicama i njihovo naseljavanje u ošte ena tkiva. Nakon naseljavanja trebala bi uslijediti diferencijacija mati nih stanica u specifi ne stanice koje bi zamijenile ošte ene stanice i u potpunosti preuzele njihovu funkciju.

U našem istraživanju djelovanjem aloksana se uspostavlja dijabetičko stanje u miševa koji zatim razviju tipične simptome dijabetesa i hiperglikemije. Ošte enje guštera e se nastoji sanirati transplantacijom koštane srži singenog soja miševa. Prema pretpostavkama baziranim na diferencijaciji mati nih stanica prema pankreasnoj liniji (Korolija i sur., 2009) u prvom tjednu žrtvovanja rezultati bi trebali biti pozitivni samo na Nanog što bi upu ivalo na naseljavanje mati nih stanica unutar guštera e. U daljnjim tjednima žrtvovanja, ako se diferencijacija mati nih stanica zaista doga a trebala bi se javiti ekspresija Pdx-1, ErbB-3 i inzulina, a ekspresija Nanoga proporcionalno smanjiti.

Pra enjem inzulina njegova ekspresija bi se kroz etiri tjedna istraživanja trebala pove avati što bi ukazivalo na postepenu regeneraciju guštera e.

Pojava ekspresije Nanoga u tkivu dijabeti nih miševa koji nisu tretirani koštanom srži ide u prilog teoriji da unutar tkiva guštera e postoje progenitorske stanice koje se potaknute ošte enjem guštera e aktiviraju i diferenciraju u stanice pankreasne linije te tako poti u jednim dijelom samooporavak tkiva (Trucco, 2005). Razlog malog broja pozitivnih stanica nedovoljnih za zna ajniji samooporavak guštera e kod ljudi leži u daljnjoj autoimunoj reakciji organizma dijabeti ne osobe na novonastale -stanice (Trucco, 2005). U našem istraživanju gdje je ošte enje guštera e izazvano djelovanjem aloksana razlog vjerojatno leži u razvijenoj hiperglikemiji koja, uzrokuju i pojavu reaktivnih radikala kisika, štetno djeluje na sve organe, pa tako i na novonastale -stanice (Robertson i sur, 2003).

Detekcija velike koli ine malih stanica s velikom jezgrom, pozitivnih na Nanog u prvom tjednu žrtvovanja ide u prilog teoriji da su to novonaseljene mati ne stanice u ošte enom tkivu. Smanjenje ekspresije Nanoga u nastavku istraživanja uz istodobnu pojavu markera specifi nih za stadije diferenciranih stanica (Pdx-1, ErbB-3 i inzulin) ukazuje na odvijanje odre enog stupnja diferencijacije u tkivu guštera e. Iako Trucco (2005) u svojoj studiji ne dobiva pozitivne rezultate za naseljavanje mati nih stanica u guštera i te dokazuje da novonastale stanice nisu porijeklom od mati nih stanica, postoje studije u kojima je dokazana migracija mati nih stanica i njihovo naseljavanje na mjesto ošte enja (Hess, 2003). Nadalje, postoje dokazi da se transplantirane mati ne stanice naseljavaju i izvan guštera e u druga tkiva poput jetre, slezene, adipoznog tkiva i koštane srži (Kojima, 2004), što se podudara s našim rezultatima u kojima smo dobili pozitivne stanice na Nanog, Pdx-1 i inzulin u tkivu slezene. Smatra se da je ovakva rasprostranjenost stanica koje izlu uju inzulin zapravo posljedica hiperglikemije (Kojima, 2004).

S obzirom da je Pdx-1 transkripcijski faktor izrazito važan za kontrolu ekspresije gena za inzulin, mjesto njegove detekcije trebalo bi biti unutar jezgre. Naši rezultati detektiraju citoplazmatsku pojavu ovog markera. Razlog takvim rezultatima je oksidativni stres koji je posljedica hiperglikemije.

Kaneto i sur. (2008) u svojem istraživanju dokazuju da oksidativni stres uzrokuje translokaciju Pdx-1 iz jezgre u citoplazmu što vodi k redukciji njegove aktivnosti kao transkripcijskog faktora za inzulin, a time i k smanjenju biosinteze inzulina.

Praćenjem broja stanica pozitivnih na inzulin tijekom četiri tjedna istraživanja uočava se sve veći broj stanica unutar Langerhansovih otočica i na kraju potpuno ispunjeni otočici nalik na zdrave. Ovakvi rezultati dokazuju da se regeneracija otočica zaista događa, međutim mehanizam same regeneracije još uvijek ostaje nepoznat. Iako su neki znanstvenici uspjeli potaknuti diferencijaciju matičnih stanica prema pankreasnoj liniji *in vitro* (Oh i sur., 2004), još uvijek nema dokaza da se one nakon transplantacije zaista mogu diferencirati u β -stanice *in vivo*. Teorije koje su predlagale mehanizam oporavka koji bi se zasnivao na fuziji matičnih stanica s preostalim β -stanicama nakon koje bi matične stanice preuzele njihovu ulogu su odbacene u studijama Ianusa (2002) i Lechnera (2004) koji su dokazali da do fuzije ne dolazi. S druge strane, sve je više istraživanja koje idu u prilog teoriji da se matične stanice ne diferenciraju već da potaknute signalima oštećenog tkiva lokalne molekule citokina i faktore rasta koji promiču oporavak tkiva i diferencijaciju progenitorskih stanica koje već postoje unutar tkiva gušterače (Gao i sur., 2008).

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti da transplantacija koštane srži ima povoljan učinak na oporavak dijabetičkog stanja miševa izazvanog aloksanom. S obzirom da nije došlo do značajnije promjene tjelesne mase i razine glukoze u krvi miševa te zbog prethodno navedenih rezultata za citoplazmatsku ekspresiju Pdx-1 nameće se pretpostavka da stanje hiperglikemije u organizmu onemogućava značajniji oporavak. Nadalje, napravljena su istraživanja o utjecaju hiperglikemije na transplantaciju koštane srži i već formiranih Langerhansovih otočica. Skupina miševa koja je prije same transplantacije primila tretmane inzulinom radi normaliziranja razine glukoze u krvi je pokazala znatno uspješnije rezultate transplantacije od skupine kojoj je izvedena transplantacija u stanju hiperglikemije (Laybut i sur., 2007). Iz toga je lako zaključiti da se hiperglikemija negativno odražava i na transplantirane matične stanice te vjerojatno ometa njihovu diferencijaciju i u inak.

injenica je da hiperglikemija uzrokuje i stanje oksidativnog stresa u organizmu uzrokuje poremećaj ekspresije gena u stanicama (Robertson i sur., 2003), što se može negativno odraziti i na sam postupak migracije transplantiranih matinih stanica prema mjestu oštećenja te na njihovo naseljavanje u oštećeno tkivo.

Dosadašnjim istraživanjima dokazano je da matine stanice potiču u oporavak dijabetičnog stanja, ali ostaje otvoreno pitanje o kakvom se mehanizmu radi. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdilo jesu li stanice pozitivne na Nanog zaista matine stanice naseljene iz transplantirane koštane srži. Nadalje, potrebno je utvrditi da li su stanice koje ispunjavaju oporavljene Langerhansove otočice porijeklom od transplantiranih matinih stanica ili od već prisutnih progenitorskih stanica u tkivu.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju imunohistokemijskih analiza tkiva gušterača i miševa te proučavanjem ekspresije Nanoga, Pdx-1, ErbB-3 i inzulina mogu se donijeti slijedeći zaključci:

1. Tretiranje miševa aloksanom uzrokovalo je razvitak tipičnih simptoma dijabetesa te smanjenje broja Langerhansovih otočića i β -stanica u tkivu gušterača tretiranih miševa u odnosu na tkivo zdravih miševa.
2. Tjelesna masa i razina glukoze u krvi kod skupina miševa tretiranih koštanom srži nisu pokazale statistički značajnu promjenu u odnosu na kontrolnu skupinu miševa.
3. Imunohistokemijskom analizom tkiva gušterača dijabetičkih miševa detektiran je signal za Nanog što upućuje na djelomičan samooporavak tkiva.
4. U gušterači i miševa tretiranih koštanom srži detektiran je statistički značajan porast broja stanica pozitivnih na Nanog u odnosu na gušteraču dijabetičkih miševa što upućuje na naseljavanje stanica koštane srži unutar tkiva gušterača i unutar Langerhansovih otočića.
5. Unutar tkiva gušterača i miševa tretiranih koštanom srži detektirani su pozitivni signali za Nanog, Pdx-1, ErbB-3 i inzulin što dokazuje prisutnost djelomično diferenciranih stanica specifičnih za razvojne stadije matičnih stanica prema pankreasnoj liniji. Navedeni rezultati upućuju na eventualnu mogućnost diferencijacije matičnih stanica *in vivo* u β -stanice Langerhansovih otočića.
6. U gušterači i miševa tretiranih stanicama koštane srži žrtvovanih nakon 28 dana uočavaju se Langerhansovi otočići u potpunosti ispunjeni stanicama koje ekspresiraju inzulin, izgledom vrlo slični Langerhansovim otočićima zdravog tkiva. Ovakvi rezultati dokazuju regenerativnu sposobnost stanica koštane srži, mehanizam same regeneracije još uvijek nije poznat.

7.LITERATURA

- Akashi K., Kondo M., Cheshier S., Shizuru J., Gandy K., Domen J., Mebius R., Traver D., Weissman I. L. (1999): Lymphoid development from stem cells and the common lymphocyte progenitors. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **64**: 1–12.
- Akashi K., Traver D., Miyamoto T., Weissman I. L. (2000): A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**: 193–197.
- American diabetes association. (2008): Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care* **31**: 55-60.
- Berne R. M., Levy M. N. (1993): Endokrini sustav: Metabolizam i hormoni guštera nih oto i a. U: *Fiziologija. Medicinska naklada, Zagreb*, str. 852-871.
- Bonig H., Priestley G. V., Papayannopoulou T. (2006): Hierarchy of molecular pathway usage in bone marrow homing and its shift by citokines. *Blood* **107(1)**: 9-86.
- Chambers I., Colby D., Robertson M., Nichols J., Lee S., Tweedie S., Smith A. (2003): Functional expression cloning of nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113(5)**: 643-655.
- Chen S., Borowiak M., fox J. L., Maehr R., Osafune K., Davidow L., Lam K., Peng L. F., Schreiber S. L., Rubin L. L., Melton D. (2009): A small molecule that directs differentiation of human ESCs into the pancreatic lineage. *Nature chemical biology* **5(4)**: 258-265.
- Gao X., Song L., Shen K., Wang H., Niu W., Qin X. (2008): Transplantation of bone marrow derived cells promotes pancreatic islet repair in diabetic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **371**: 132-137.
- Guyton A. C., Hall J. E. (2003): Inzulin, glukagon i še erna bolest. U: *Medicinska fiziologija. Medicinska naklada, Zagreb*, str. 884-898.

- Hess D., Li L., Martin M., Sakano S., Hill D., Strutt B., Thyssen S., Gray D. A., Bhatia M. (2003): Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat. Biotechnol.* **21(7)**: 755-756
- Ianus A., Holz G. G., Theise N. D., Hussain M. A. (2003): In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *The Journal of Clinical Investigation* **111(6)**: 843-850.
- Jackson K., Majka S. M., Wang H., Pocius J., Hartley C. J., Majesky M. W., Entman M. L., Michael L. H., Hirschi K. K., Goodell M. A. (2001): Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J. Clin. Invest.* **107**: 1-8.
- Johe K. K., Hazel T.G., Muller T., Dugich-Djordjevic M. M., McKay R.D. (1996): Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev.* **10**: 3129-3140.
- Junqueira L. C., Carneiro J., Kelley R. O. (1995): Žlijezde pridružene probavnoj cijevi. U: *Osnove histologije. Školska knjiga, Zagreb*, str. 314-337.
- Kalka C., Masuda H., Takahashi T., Kalka-Moll W. M., Silver M., Kearney M., Li T., Isner J. M., Asahara T. (2000): Transplantation of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 3422-3427.
- Kaneto H., Matsuoka T., Miyatsuka T., Kawamori D., Katakami N., Yamasaki Y., Matsuhisa M. (2008): PDX-1 functions as a master factor in the pancreas. *Frontiers in bioscience* **13**: 6406-6420.
- Kaneto H., Matsuoka T., Miyatsuka T., Kawamori D., Katakami N., Yamasaki Y., Matsuhisa M. (2008): PDX-1 functions as a master factor in the pancreas. *Frontiers in Bioscience* **13**: 6404-6420.
- Kojima H., Fujimiya M., Matsumura K., Nakahara T., Hara M., Chan L. (2004): Extrapancreatic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101(8)**: 2458-2463.
- Korolija M., Popović-Hadžija M., Hadžija M. (2009): Molecular mechanism in β -cell development: the role of PDX1, Ngn3 and Pax4 proteins. *Periodicum biologorum* **111(1)**: 59-63.

- Kritzik M. R., Krahl T., Good A., Gu D., Lai C., Fox H., Sarvetnick N. (2000): Expression of ErbB receptors during pancreatic islet development and regrowth. *Journal of endocrinology* **165**: 67-77.
- Lally F., Bone A. J. (2003): Animal models of type 1 diabetes. U: Textbook of diabetes. 3rd ed., Blackwell Science, Oxford, str. 19.1-19.17
- Laybutt D. R., Hawkins Y. C., Lock J., Lebet J., Sharma A., Bonner-Wier S., Weir G. C. (2007): Influence of diabetes on the loss of beta cell differentiation after islet transplantation in rats. *Diabetologia* **50**: 2117-2125.
- Lechner A., Yang Y., Blacken R. A., Wang L., Nolan A. L., Habener J. F. (2004): No Evidence for Significant Transdifferentiation of Bone Marrow Into Pancreatic β -Cells In Vivo. *Diabetes* **53**: 616-623.
- Lenzen S. (2007): The mechanisms of alloxan and streptozotocin induced diabetes. *Diabetologia* **51**: 216-226.
- Mayo W. W. (2005): Mayo Clinic o životu s dijabetesom. Medicinska naklada, Zagreb, str. 5-6.
- Noguchi H. (2007): Stem cells for the treatment of diabetes. *Endocrine Journal* **54(1)**: 7-16.
- Oh S., Muzzonigro T. M., Bae S., LaPlante J. M., Hatch H. M., Petersen B. E. (2004): Adult bone marrow-derived cells transdifferentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. *Laboratory Investigation* **84**: 607-617.
- Papayannopoulou T., Priestley G. V., Nakamoto B., Zfiropoulos V., Scott L. M. (2001): Molecular pathways in bone marrow homing: dominant role of $\alpha_4\beta_1$ over $\alpha_2\beta_1$ integrins and selectins. *Blood* **98(8)**: 2403-2411.
- Robertson R. P., Harmon J., Tran P. O., Tanaka Y., Takahashi H. (2003): Glucose toxicity in β -cells: Type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* **52**: 581-587.

Roy V., Verfaillie C.M. (1999): Expression and function of cell adhesion molecules on fetal liver, cord blood and bone marrow hematopoietic progenitors: implications for anatomical localization and developmental stage specific regulation of hematopoiesis. *Exp. Hematol.* **27**: 302–312.

Tang D., Cao L., Burkhardt B. R., Xia C., Litherland S. A., Atkinson M. A., Yang L. (2004): In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. *Diabetes* **53**: 1721-1732.

Trucco M. (2005): Regeneration of the pancreatic cell. *The journal of Clinical Investigation* **115(1)**: 5-12.