

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Medicinska kemija

Dominika Došen

Karakterizacija ependimalnih stanica leđne moždine oposuma u razdoblju u
kojem se gubi sposobnost regeneracije

Diplomski rad

Rijeka, 2015.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Medicinska kemija

Dominika Došen

Karakterizacija ependimalnih stanica leđne moždine oposuma u razdoblju u
kojem se gubi sposobnost regeneracije

Diplomski rad

Rijeka, 2015.

Mentor rada: izv.prof.dr.sc. Miranda Mladinić Pejatović

Diplomski rad obranjen je dana _____

pred povjerenstvom:

1. _doc.dr.sc._____ Antonija Jurak Begonja _ (predsjednik)
2. _doc.dr.sc._____ Ivana Munitić _____ (član)
3. _izv.prof.dr.sc. Miranda Mladinić Pejatović (član)

Rad ima 52 stranica, 16 slika, 0 tablica i 36 literaturnih navoda

Sažetak

Danas više od 40 milijuna osoba širom svijeta pati od ozljeda leđne moždine, a za trajno oštećenje živčanog tkiva i gubitak senzomotoričkih i autonomnih funkcija još uvijek ne postoji nikakav za lijek. Novu nadu za razvoj strategija za liječenje ovih ozljeda daju matične stanice, koje se u leđnoj moždini nalaze u ependimalnoj zoni oko središnjeg kanala, te u zidovima mikrovaskulature. U ovom radu promatrane su ependimalne stanice leđne moždine oposuma i to tijekom razdoblja kada ovaj tobolčar gubi sposobnost regeneracije moždinskog tkiva nakon ozljede. Rezultati su pokazali da su ependimalne stanice leđne moždine oposuma, u periodu kada je regeneracija moguća, pozitivne na transkripcijski faktor ATF3, nedavno otkriven biljeg aktivnih matičnih/praroditeljskih stanica leđne moždine. Kod životinja koje su izgubile sposobnost regeneracije, ATF3 signal nije više prisutan u ependimalnoj regiji, već je ograničen na rijetke stanice koje oblažu krvne žile leđne moždine. Pokazali smo da su stanice s pozitivnim ATF3 jezgrama također pozitivne na SOX2 i vimentin, koji su standardni biljezi matičnih stanica, te da su proliferativne. Ne eksprimiraju biljege karakteristične za mlade niti za zrele živčane stanice. Pokazali smo da se broj matičnih ependimalnih proliferativnih stanica smanjuje tijekom razvoja oposuma, kada regeneracija tkiva leđne moždine nakon ozljede prestaje biti moguća, te da i kod mladih životinja koje još uvijek imaju sposobnost regeneracije, postoji razlika u njihovom broju u dijelovima leđne moždine koji su različito razvijeni.

Karakterizacija ependimalnih matičnih stanica prva je stepenica u istraživanju njihove uloge u regeneraciji živčanog tkiva leđne moždine nakon ozljede, te u razvoju novih strategija u kojima bi se ove stanice mogle iskoristiti za nadomjestak oštećenih ili odumrlih živčanih stanica nakon ozljede.

Summary

Today more than 40 million people worldwide suffer from spinal cord injury, and still there is no cure for damage of nervous tissue leading to permanent loss of sensomotoric and autonomic functions. Stem cells, which are in the spinal cord located in the ependymal zone around the spinal central channel and in the walls of the microvasculature, provide a new hope for the development of new strategies for the spinal cord injury treatment. In this work, spinal cord ependymal cells were analyzed in opossum, during the period when this marsupial is losing the ability to regenerate spinal tissue after injury. The results have shown that, during the period when regeneration is possible, opossum spinal cord ependymal cells, are positive to transcription factor ATF3, which has been discovered recently as a marker for the active ependymal stem cells. In the animals which have lost the ability to regenerate, the ATF3 signal is no longer present in the ependymal region, but is limited to the rare cells around the blood vessels of the spinal cord. We have shown that the ependymal cells with positive ATF3 nuclei were also positive to SOX2 and vimentin, which are standard markers for stem cells, and that they are proliferative. They haven't expressed markers that are characteristic for the young and the mature neurons. We have shown that the number of ependymal proliferative stem cells are reduced during development of the opossum, in period when regeneration of spinal tissue after injury ceases to be possible. In young animals which still have the ability to regenerate spinal cord after injury, there is a difference in the number of ATF3 positive cells in different spinal cord regions, in concordance with their different developmental stage.

Characterization of the ependymal stem cells is the first step in the study of their role in regeneration of the spinal tissue after injury, and gives hope for the development of new strategies in which these cells could be used for replacement of damaged or dead neurons after injury.

Ključne riječi: regeneracija, ozljeda leđne moždine, endogene spinalne matične stanice, opossum, središnji živčani sustav

Key words: regeneration, spinal cord injury, endogenous spinal stem cells, opossum, central nervous system

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Ozljeda leđne moždine	1
1.2. Anatomija leđne moždine	1
1.3. Sposobnost regeneracije leđne moždine	4
1.4. Patofiziologija ozljede leđne moždine	5
1.5. Matične stanice leđne moždine.....	7
1.6. ATF3 kao novi biljeg endodermalnih matičnih stanica leđne moždine.....	8
1.7. Oposum kao životinjski model u istraživanjima regeneracije leđne moždine	9
2. Cilj rada	10
3. Materijali i metode	11
3.1. <i>Monodelphis domestica</i> - životinjski model za istraživanje regeneracije tkiva leđne moždine.....	11
3.2. Izolacija i rezanje leđne moždine oposuma, <i>Monodelphis domestica</i>	12
3.3. Primarna protutijela korištena u imunofluorescentnim obojanjima	13
3.4. Protokol za imunofluorescentno bojanje prereza leđne moždine	14
3.5. Mikroskopiranje tkiva.....	15
3.6. Brojanje ATF3, SOX2 i Ki67 pozitivnih stanica (jezgri)	15
3.7. Statistička analiza rezultata	16
4. Rezultati	17
4.1. ATF3 je prisutan u jezgri endodermalnih stanica oposuma u razdoblju kada postoji sposobnost regeneracije leđne moždine.....	17
4.2. ATF3 pozitivne jezgre endodermalnih stanica brojnije su u manje razvijenom torakalno-lumbarnom dijelu leđne moždine 5 dana starog oposuma	20
4.3. ATF3 pozitivne endodermalne stanice su SOX2 pozitivne.....	23
4.4. Intenzitet SOX2 imunofluorescentnog signala smanjuje se tijekom razvoja oposuma	26

4.5. Ependimalne stanice su pozitivne na vimentin kod životinja koje imaju sposobnost regeneracije leđne moždine	28
4.6. Ependimalne stanice leđne moždine imaju sposobnost proliferacije, koja se tijekom razvoja smanjuje	29
4.7. ATF3 pozitivni signal prisutan je i u pericitima spinalnih krvnih žila (čak i kod starijih životinja)	31
4.8. ATF3 pozitivne ependimalne stanice nisu DCX pozitivne.....	32
4.9. ATF3 pozitivne ependimalne stanice nisu NeuN pozitivne.....	34
5. Rasprava	35
6. Zaključak.....	37
7. Literatura.....	38

1. UVOD

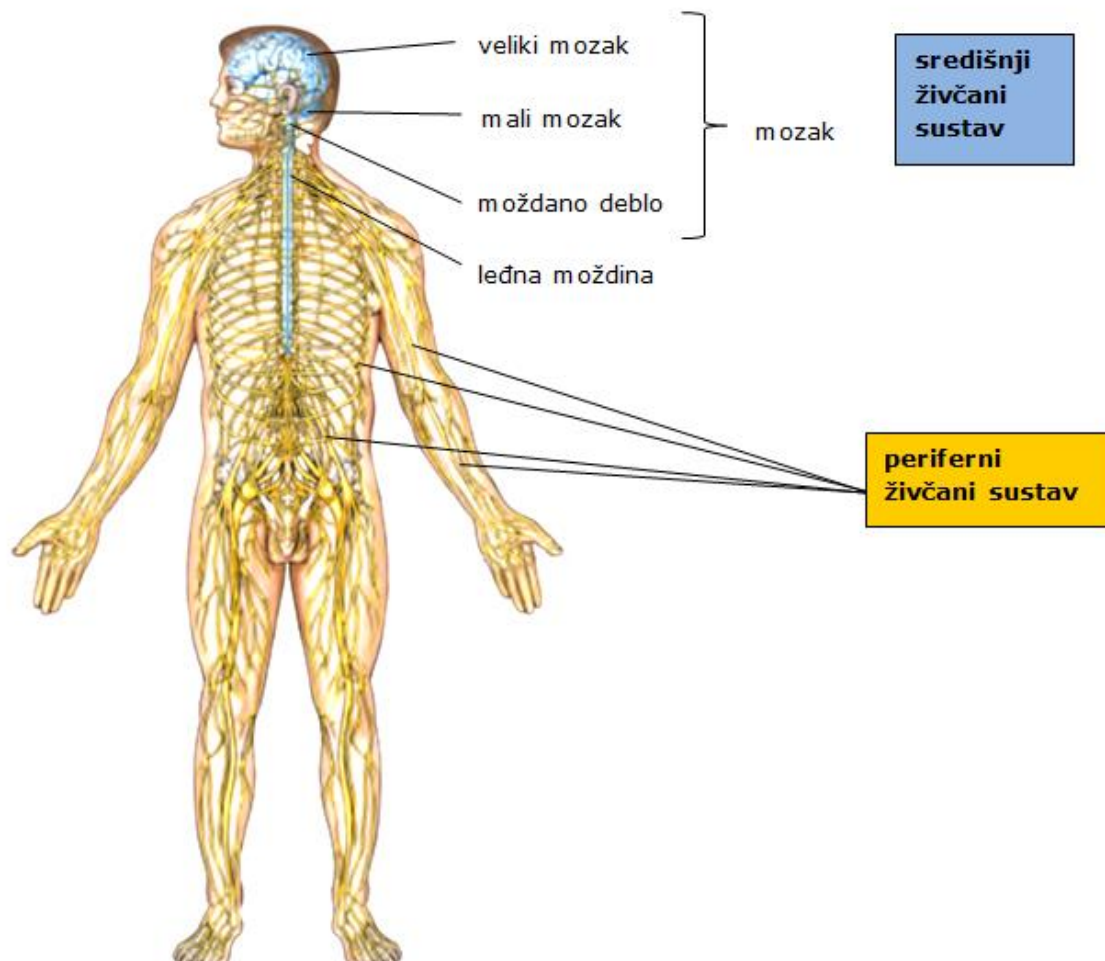
1.1. Ozljeda leđne moždine

Ozljeda leđne moždine izaziva fizičko oštećenje živčane strukturne i okolnih krvnih žila¹, te najčešće dovodi do trajnog gubitka senzomotoričkih i autonomnih funkcija²⁻⁴. Baš kao i ozljeda mozga, te razne neurodegenerativne bolesti, ozljeda leđne moždine predstavlja veliki izazov neuroznanosti^{5,6}, koja još uvijek nije dala odgovor na pitanje kako nadomjestiti i regenerirati odumrle i oštećene živčane stanice.⁷ Ozljede leđne moždine mogu biti uzrokovane mehaničkom traumom (nagnječenje ili prerez) ili pak biti posljedica bolesti, kao što su rak, osteoporoza, spinalna stenoza, infekcija, krvožilni poremećaji i drugo.⁷ One najčešće izazivaju ireverzibilne i iznimno teške posljedice za pacijente kojih danas ima više od 40 milijuna širom svijeta, s porastom incidencije svake godine.⁷ U Republici Hrvatskoj, broj pacijenata uvelike se povećao tijekom rata u razdoblju od 1990. do 1992. godine.⁸

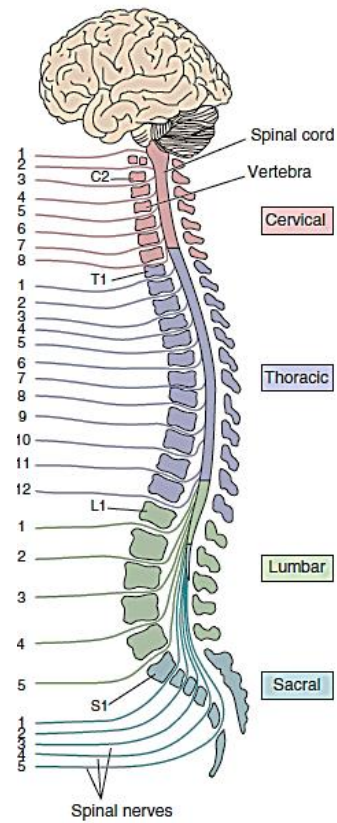
1.2. Anatomija leđne moždine

Leđna moždina predstavlja anatomsku i funkcionalnu sponu između mozga i ostalih organa u tijelu.⁹ Zajedno s mozgom čini središnji živčani sustav (SŽS).⁹ Leđna moždina provodi informacije iz perifernih organa, kao što su koža, zglobovi, mišići i drugi organi, do mozga i obratno.⁹ Informacije putuju putem moždinskih (spinalnih) živaca, koji su pak dijelovi perifernog živčanog sustava (PŽS)⁹. Oni izlaze iz leđne moždine kroz utore između kralježaka (slika 1).⁹ Svaki moždinski živac povezan je s leđnom moždinom pomoću dvije grane, koje se nazivaju dorzalni i ventralni korijen⁹. Postoji 30 moždinskih živaca, koji se prema mjestu na kojem izlaze iz leđne moždine nazivaju: cervikalni (C 1-8, vratni), torakalni (T 1-12, grudni), lumbarni (L 1-5, slabinski), te sakralni (S 1-5, krsni) živci (slika 2).⁹

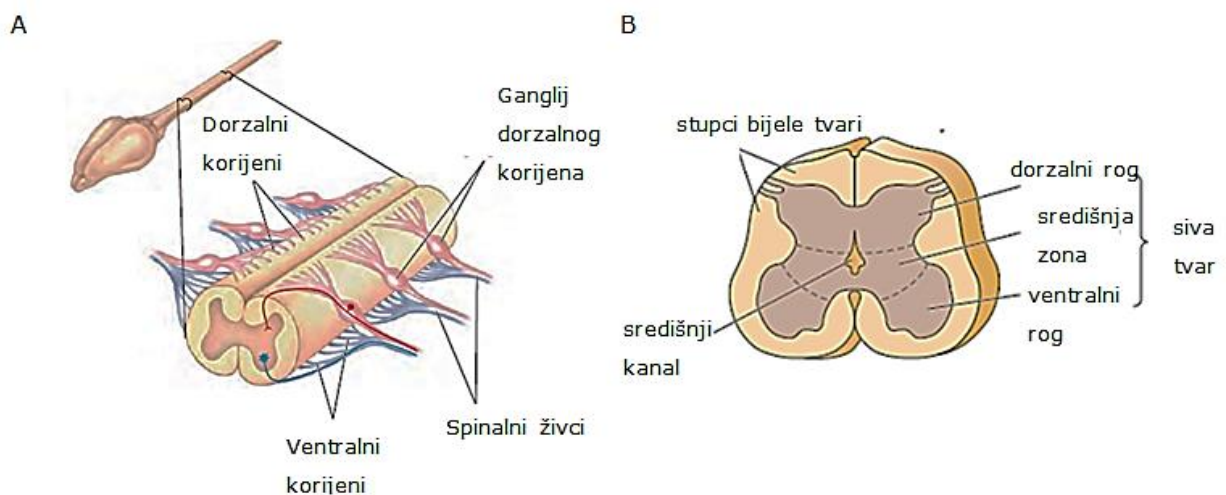
Na poprečnom presjeku leđne moždine njezina siva tvar, u kojoj se nalaze živčane stanice, ima oblik leptira ili slova H.⁹ Gornji dio leptirova krila se zove dorzalni rog, a donji ventralni.⁹ Između dorzalnog i ventralnog roga nalazi se središnji dio u kojem se nalazi središnji kanal leđne moždine, kojim struji cerebrospinalni likvor.⁹ Sve preostalo tkivo čini bijela tvar koja se sastoji od glija stanica i stupaca aksona koji se protežu uzduž leđne moždine⁹ (slika 3A,B). Živčane stanice sive tvari započinju analizu senzornih informacija, te imaju ključnu ulogu u koordinaciji pokreta i jednostavnih refleksa⁹.



Slika 1. **Osnovna anatomska podjela živčanog sustava.** Živčani sustav sastoji se od dva dijela: središnjeg živčanog sustava (SŽS-a) i perifernog živčanog sustava (PŽS-a). SŽS sastoji se od mozga i leđne moždine. Tri glavna dijela mozga su veliki i mali mozak te moždano deblo. PŽS sastoji se od živaca i živčanih stanica koje se nalaze izvan mozga i leđne moždine. Preuzeto od Bear, Connors, & Paradiso (2007).



Slika 2. **Organizacija leđne moždine.** Leđna moždina je podijeljena na cervikalni, torakalni, lumbarni i sakralni dio, a iz nje izlaze moždinski živci, koji se imenuju sukladno mjestu iz kojeg izlaze. Preuzeto od Bear, Connors, & Paradiso (2007).



Slika 3.(A) **Makroskopska anatomija leđne moždine.** Leđna moždina je zaštićena kostima kralježnice, a kroz utore kralježnjaka izlaze živčana vlakna i to i na dorzalnoj i na ventralnoj strani moždine (dorzalni i ventralni korijeni). Takvi korijeni spajaju se u spinalne živce koji prolaze kroz tijelo.(B) **Skica poprečnog presjeka leđne moždine.** Središnji dio leđne moždine je siva tvar u kojoj se nalaze živčane stanice i koja ima oblik leptira. Dijeli se na dorzalne i ventralne rogove, a okružuje ju bijela tvar (glija stanice i živčana vlakna). Uski središnji kanal ispunjen je cerebrospinalnom tekućinom. Preuzeto od Bear, Connors, & Paradiso (2007).

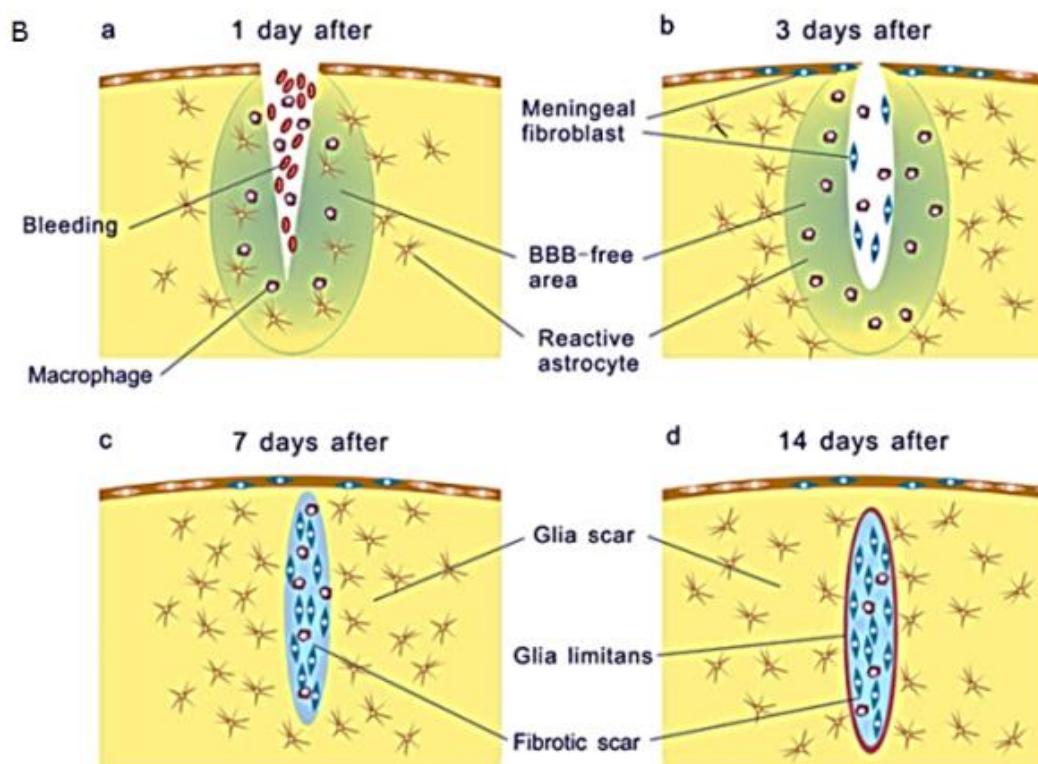
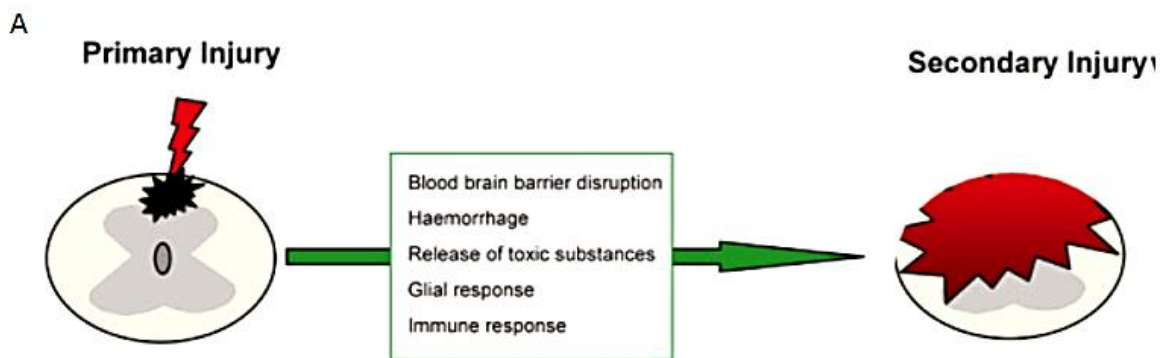
1.3. Sposobnost regeneracije leđne moždine

Središnji živčani sustav ptica i sisavaca ima izuzetno malu ili nikakvu sposobnost funkcionalne regeneracije nakon ozljede^{6,10}. Suprotno njemu, PŽS kojeg čine živci, gangliji i živčane stanice izvan SŽS-a^{9,10}, ima sposobnost potpune regeneracije nakon ozljede.¹⁰ Isto tako, aksoni živčanih stanica SŽS-a sisavaca tijekom fetalnog razvoja mogu rasti i uspješno se regenerirati nakon ozljede, baš kao što je slučaj i kod odraslih beskralježnjaka ili nižih kralježnjaka, poput riba i vodozemaca.⁵ Iako se još uvijek ne razumiju u potpunosti molekularni i stanični čimbenici i mehanizmi koji kontroliraju sposobnost, odnosno nesposobnost regeneracije živčanih stanica,^{5,9} zanimljivo je da značajnu razliku između SŽS-a i PŽS-a sisavaca ne predstavljaju živčane stanice, već okolne glija stanice.⁹ Na primjer, u PŽS-u glija stanice koje proizvode mijelin su Shwannove stanice, dok u SŽS-u ovu ulogu imaju oligodendrociti.^{1,9} I jedne i druge proizvode mijelin i stvaraju membranske slojeve koji električki izoliraju živčane izdanke, aksone.^{1,9} Pokazano je da imaju odlučujuću ulogu u kontroli regeneracije, odnosno inhibicije rasta aksona.⁹ Tako oligodendrociti nakon ozljede SŽS-a otpuštaju NOGO molekulu koja ima posebno važnu ulogu u inhibiciji regeneracije živčanih vlakana, a koja nije pronađena u Shwannovim stanicama.^{9,11} Stvaranje glijalnog ožiljka na mjestu lezije, koji predstavlja fizičku i kemijsku barijeru za rast živčanih vlakana, predstavlja također jedan od uzroka nemogućnosti regeneracije SŽS-a nakon ozljede.⁵

Zna se da se mogućnost regeneracije ozljeđenog moždinskog tkiva, u cilju potpunog oporavka lokomotornih funkcija, naglo smanjuje nakon rođenja.^{7,12} Odrastanjem, živčane stanice postaju post-mitotične (gube sposobnost diobe), pa nakon ozljede odrasle leđne moždine ne dolazi do obnove izgubljenih živčanih stanica, niti je moguća regeneracija i ponovni rast oštećenih živčanih vlakana.

1.4. Patofiziologija ozljede leđne moždine

Prilikom ozljede leđne moždine dolazi do oštećenja živčanog tkiva, te do oštećenja krvno-moždane barijere i istjecanja stanica krvi u okolno živčano tkivo.¹³ U satima i danima nakon primarne ozljede, razvija se sekundarna stanična degeneracija koja uništava okolne živčane i glija stanice.¹³ (slika 4 A i B). Naime, leukociti, makrofazi i limfociti otpuštaju različite citokine,³ poput interleukina-1, izoforme transformirajućeg čimbenika poticanja rasta beta (TGF- β , od engl. Transforming growth factor beta)¹, koji potiču upalnu reakciju u ozljeđenom moždinskom tkivu, te dolazi do stvaranja ciste i do aktivacije glija stanica^{13,14}. Glavnu ulogu u staničnom odgovoru na ozljedu leđne moždine imaju reaktivni astrociti koji okružuju leziju.¹⁵ Astrociti su najbrojnije glija stanice u SŽS-u, koje ispunjavaju prostor između živčanih stanica i reguliraju kemijski sadržaj izvanstaničnog prostora, mada njihova važnost i uloga još uvijek nije u potpunosti razjašnjena.^{9,15} U području lezije stvaraju se dva tipa ožiljkastog tkiva: jedan je glija ožiljak koji se sastoji od glija prekursorskih stanica, aktiviranih astrocita i mikroglija stanica (endogene imunološke stanice SŽS-a koje poput fagocita uklanjaju ostatke odumrlih ili degenerirajućih živčanih stanica⁹), te drugi tip koji se sastoji od fibroblasta iz okolnih meningealnih i perivaskularnih stanica (fibrotični ožiljak).¹³ Reaktivni astrociti imaju zaštitničku ulogu u rekonstrukciji krvno - moždane barijere, te stvaranjem ožiljka sprječavaju istjecanje krvi i serumskog sadržaja u parenhim SŽS-a.^{1,15} Slično astrocitima, i fibroblasti dolaze na područje lezije, otpuštajući kolagen tipa IV, fibronektin i laminin¹³, te tako sprječavaju daljnju infiltraciju leukocita.¹³ Reaktivni astrociti i fibroblasti zajedno stvaraju gustu filamentoznu membranu koja u potpunosti sprječava rast i regeneraciju oštećenih aksona.^{13,16}



Slika 4. (A) **Mehanizami uključeni u sekundarnu ozljedu leđne moždine.** Među procesima koji pridonose sekundarnom oštećenju moždinskog tkiva nakon ozljede su: oštećenje krvno moždane barijere, krvarenje, otpuštanje otrovnih tvari, te glijalni i imunološki odgovor. Preuzeto od Ferretti, Zhang, & O'Neill, (2003) (B) **Shematski prikaz nastajanja ožiljka nakon ozljede mišjeg mozga.** (a) Prvog dana nakon ozljede SŽS-a, krvno moždana barijera (KMB ili

BBB, od engl. blood brain barrier) je uništena, te u to područje ulaze makrofazi. (b) Trećeg dana nakon ozljede, reaktivni astrociti se nakupljaju oko područja lezije. Fibroblasti iz oštećenih moždanih ovojnica ulaze u područje lezije. (c) Tjedan dana nakon ozljede, fibroblasti proliferiraju i otpuštaju molekule izvanstaničnog matriksa stvarajući fibrotički ožiljak. (D) Nakon dva tjedna, reaktivni astrociti zatvaraju područje lezije oblikujući glija opnu. Preuzeto od Kawano et al.(2012).

1.5. Matične stanice leđne moždine

U neuroznanosti se danas velika pozornost pridaje istraživanjima na matičnim i progenitorskim stanicama⁷ za koje se smatra da bi mogle biti osnova novih strategija u liječenju ozljeda leđne moždine, mozga, te za liječenje neurodegenerativnih bolesti^{5,6}. Smatra se da bi matične stanice mogle biti izvor čimbenika rasta koji bi mogli potaknuti rast aksona, te eventualno pružiti mogućnost nadomjestka odumrlih živčanih stanica.⁷ Za razliku od mozga u kojem su dobro karakterizirane stanične niše koje su izvor matičnih stanica, njihova je prisutnost u leđnoj moždini još uvijek upitna.¹⁷ Nedavno je otkriveno da se potencionalno skladište spinalnih živčanih matičnih i progenitorskih stanica nalazi u zidovima mikrovaskulature (perivaskularnim nišama), te u moždanim ovojnicama u obliku pericita¹⁷ (stanica koje eksprimiraju mezenhimalne staminalne markere), te u endodimalnoj zoni koja okružuje središnji kanal leđne moždine.^{7,18} Kod sisavaca, uključujući i ljude, proliferacija endodimalnih stanica čest je događaj tijekom embrionalnog i ranog postnatalnog razvoja, no nakon rođenja naglo zamire.⁷ Smatra se da endodimalne stanice imaju važnu ulogu u usmjeravanju stanične migracije tijekom razvoja SŽS-a.⁹ Pokazalo se da nakon ozljede leđne moždine odraslih sisavaca, endodimalne stanice započinju proliferaciju i migraciju⁷, te sudjeluju u stvaranju glijalnog ožiljka,^{4,19} te na taj način spriječavaju daljnje širenje tkivnog oštećenja i gubitka preživjelih živčanih stanica.²⁰ Smatra se da bi se endogene spinalne živčane matične i progenitorske stanice mogle koristiti u svrhu regenerativnog liječenja ozljeda leđne moždine.^{4,7,19,21} Prednost takvog pristupa pred drugim metodama koje se

baziraju na unošenju matičnih stanica porijeklom iz drugih izvora (tkiva ili jedinki), bio bi eliminacija problema imunološkog odbacivanja heterolognih matičnih stanica.^{4,7} Molekularni mehanizmi koji kontroliraju proliferaciju i aktivaciju matičnih progenitorskih stanica leđne moždine u normalnim i patološkim uvjetima uglavnom su nepoznati.^{19,22} Njihovo istraživanje otežava činjenica da nema specifičnog biljega kojima se ove stanice mogu obilježiti i pratiti tijekom aktivacije i migracije.^{19,22}

1.6. ATF3 kao novi biljeg endodimalnih matičnih stanica leđne moždine

Transkripcijski čimbenici koji reguliraju stvaranje i rast živčanih matičnih progenitorskih stanica su još uvijek nedovoljno poznati, no zna se da važnu ulogu ovdje imaju geni iz Sox obitelji, naročito gen Sox2.^{19,23} Nedavno se pokazalo da je Aktivirajući transkripcijski čimbenik 3 (ATF3, od engl. Activating transcription factor 3) uključen u signalne mehanizme koji kontroliraju aktivaciju spinalnih matičnih stanica, te je vrlo koristan biljeg za identifikaciju i kvantifikaciju aktiviranih i migrirajućih matičnih stanica.¹⁹ ATF3 je član ATF/CREB obitelji transkripcijskih faktora koji se aktiviraju u različitim tkivima kao odgovor na stres.²⁴ Ovaj gen regulira gensku transkripciju na dva načina: 1) vežući se kao homodimer na specifična DNA mjesta, te sprječavajući transkripciju, ili pak 2) vežući se kao heterodimer sa Jun proteinima na specifična DNA mjesta, aktivirajući transkripciju.² Kod štakora je ekspresija ATF3 u endodimalnim progenitorskim stanicama dinamički regulirana, tako što prilikom aktivacije ovih stanica ATF3 prelazi iz citoplazme u staničnu jezgru.¹⁹ U daljnim istraživanjima potrebno je odrediti ulogu ATF3 u kontroli aktivacije spinalnih matičnih stanica, a ovaj transkripcijski faktor mogao bi pomoći u otkrivanju ostalih unutar- i izvanstaničnih čimbenika koji kontroliraju aktivaciju spinalnih matičnih stanica.⁷

1.7. Oposum kao životinjski model u istraživanjima regeneracije leđne moždine

Sivi kratkorepi tobolčar, južnoamerički oposum *Monodelphis domestica*, je vrlo koristan u istraživanjima koja nastoje otkriti molekularne i stanične mehanizme koji kontroliraju mogućnost regeneracije živčanog tkiva nakon ozljede.^{11,25} Za razliku od placentarnih sisavaca, novorođeni tobolčari su vrlo nerazvijeni, a svoj potpuni fetalni razvoj dovršavaju izvan majke²⁶. Majka oposuma nema tobolac, već mlade drži pričvršćene na svoje dojke iz kojih kontinuirano dobivaju majčino mlijeko, koje je izvor potrebnih hranjivih tvari i zaštitnih protutijela.²⁵ Oposumi se rađaju sa vrlo nerazvijenim mozgom i leđnom moždinom, te po razvojnom stadiju odgovaraju 14-16 dana starom embriju štakora.^{5,27} Takva iznimna postnatalna nerazvijenost je prednost u istraživanjima regeneracije živčanog tkiva²⁸, jer mladunci u prva dva tjedna života zadržavaju sposobnost potpune regeneracije leđne moždine nakon ozljede^{10,28}. Mladunčad je toliko sitna da se cijeli SŽS može održavati u kulturi danima, pa čak i tjednima.⁵ U moždinskom tkivu u kulturi nastavlja se refleksna aktivnost, živčane stanice nastavljaju proliferirati, s minimalnom staničnom smrću.⁵

Kod odraslih oposuma, kao i kod drugih sisavaca, SŽS se ne može regenerirati.^{10,28} Prijelomno razdoblje u kojem dolazi do promjene mogućnosti regeneracije tkiva leđne moždine nakon ozljede je u ranim danima postnatalnog života.^{10,28} Tako 12.-tog dana postnatalnog razvoja, regeneracija prestaje biti moguća u cervikalnim dijelovima leđne moždine.^{10,28} Manje zreli lumbarni dijelovi imaju sposobnost regeneracije sve do 17.-tog postnatalnog dana.^{10,28} Oposum se pokazao kao vrlo koristan model u istraživanju gena koji kontroliraju sposobnost živčane regeneracije.¹⁰ Velika prednost ovog životinjskog modela je ta što u istoj životinji postoje i zreli (cervikalni) i nezreli (lumbarni) dijelovi leđne moždine, koji se razlikuju u mogućnosti regeneracije nakon ozljede, te omogućavaju uspoređivanje molekularnog sastava regenerirajućeg i neregenerirajućeg tkiva.¹⁰

2. CILJ RADA

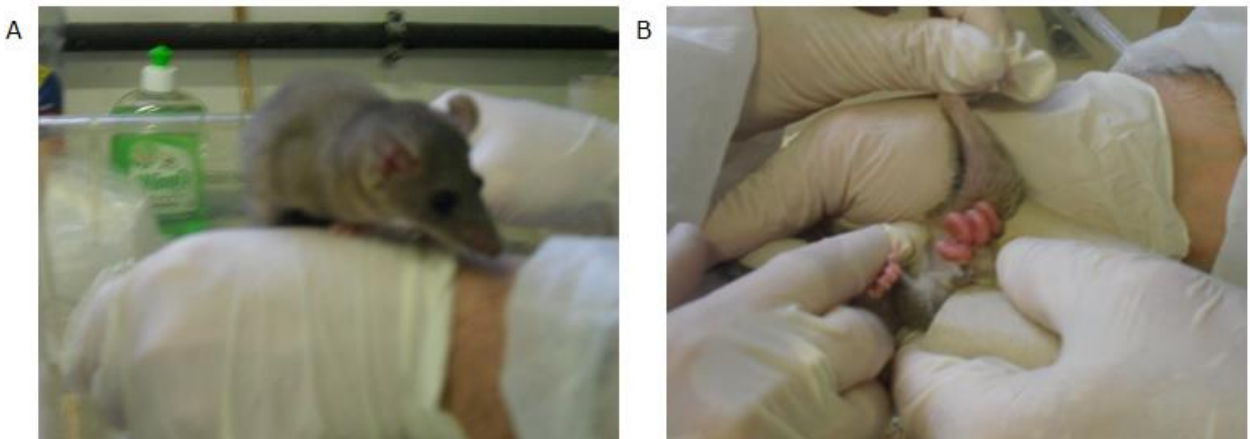
Ovim istraživanjem željelo se pridonijeti razumijevanju molekularnih i staničnih mehanizama koji upravljaju regeneracijom živčanog tkiva leđne moždine nakon ozljede. Konkretno, istraživale su se ependimalne matične stanice leđne moždine sisavaca, te ekspresija ATF3 transkripcijskog čimbenika u njima. Istraživanje se odvijalo na in vitro eksperimentalnom životinjskom modelu, na oposumu (*Monodelphis domestica*), tijekom razdoblja u kojem životinja gubi sposobnost regeneracije živčanog tkiva. U radu su korištene metode stanične biologije koje omogućavaju vizualizaciju proliferativnih živčanih matičnih stanica.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. *Monodelphis domestica* - životinjski model za istraživanje regeneracije tkiva leđne moždine

U ovom radu korišten je južnoamerički sivi kratkorepi oposum, *Monodelphis domestica*, u postnatalnoj dobi od 5, 10 i 17 dana. Odjel za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci posjeduje koloniju ovih životinja, koja se privremeno nalazi u vivariju Sveučilišta u Trstu, u Italiji (dok ne budu spremni uvijeti za njihovo održavanje na Odjelu za biotehnologiju u Rijeci). U prostoriji vivarija, s kontroliranim uvjetima temperature i vlažnosti (27°C; 60% vlažnosti), te sa 14:10 satnim mijenjanjem ciklusa svijetla/tame, smješteni su oposumi u polikarbonskim kutijama. Hrana i voda daju se ad libitum (po volji). 13-tog dana gestacijskog razdoblja, majke rađaju legla od 5 do 12 mladunaca, koji potom ostanu pričvršćeni na majčine dojke na trbuhu sve do 14-tog postnatalnog dana, nakon kojeg se počinju povremeno odvajati od majke (slika 5). Mladunci se potpuno odvajaju od majke u 60-65 postnatalnom danu, te dostižu spolnu zrelost u 5-tom mjesecu života.^{6,27}

Za ovo istraživanje mladunci su žrtvovani na Sveučilištu u Trstu, gdje je izvršena disekcija leđne moždine i fiksacija, te rezanje tkiva (kako je dalje opisano). Tako pripremljeno tkivo je prevezeno na Odjel za biotehnologiju u Rijeci (dozvola Ministarstva za poljoprivredu Republike Hrvatske), gdje su rađeni eksperimenti imunobojanja (dakle isključivo rad na prerezima fiksiranog tkiva leđne moždine mladih oposuma). Niti jedan pokus nije rađen *in vivo*.

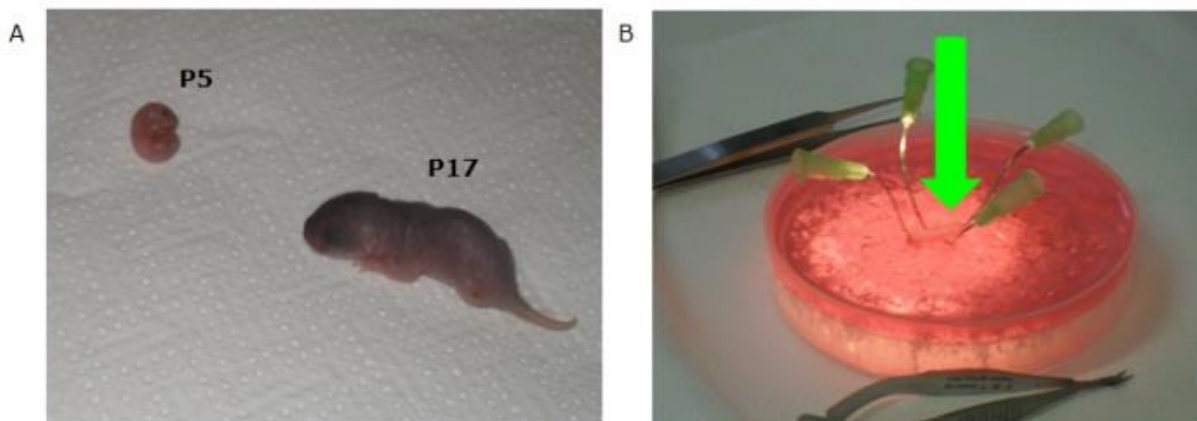


Slika 5. **Oposum Monodelphis domestica** .(A) Odrasla ženka oposuma *Monodelphis domestica*. (B) Leglo mladunaca starih 5 dana (P5), pričvršćenih na majčine dojke na trbuhu.

3.2. Izolacija i rezanje leđne moždine oposuma, *Monodelphis domestica*

Izolacija i rezanje tkiva leđne moždine mladih oposuma izvedena je na neonatalnim oposumima vrste *Monodelphis domestica* u vivariju Sveučilišta u Trstu, u skladu sa smjernicama Nacionalnog instituta zdravlja i Talijanskog akta D.Lgs. 27/1/92 no. 116 (prateći direktive Europske komisije no. 86/609 i 93/88). Pokusi su odobreni od strane Etičkog povjerenstva za pokuse na životinjama Odjela za biotehnologiju u Rijeci. Nastojalo se maksimalno smanjiti broj i patnja životinja korištenih u pokusima.

Mladunci stari 5, 10 ili 17 dana su odvojeni pažljivo od majke. Životinje su žrtvovane brzom dekapitacijom. Disekcija leđne moždine izvedena je u petrijevim zdjelicama preliveanim silikonom, u Krebsovoj otopini koja sadrži (u mM): NaCl (113), KCl (4.5), MgCl₂·7H₂O (1), CaCl₂ (2), NaH₂PO₄ (1), NaHCO₃ (25), glukoza (11), te uz stalan dovod kisika (95% O₂/ 5% CO₂, pH 7.4), na sobnoj temperaturi, uz pomoć mikroskopa za mikrokirurške postupke Leica M 651 (Njemačka) (slika 6). Odmah nakon disekcije, izolirano tkivo leđne moždine je fiksirano u 4%-tnom paraformaldehidu 12 sati na 4°C, a nakon toga pohranjeno u 30%-noj sukrozi na 4°C, radi krioprotekcije (zaštita od oštećenja tkiva uzrokovanih zamrzavanjem). Tako pripremljeno tkivo je rezano na prereze debljine 30 µm pomoću mikrotoma (Leica, Njemačka). Prilikom rezanja, vodilo se računa da se precizno odvoje cervikalni i lumbarno-torakalni dijelovi leđne moždine. Prerezi su čuvani u 1 x fosfatnom puferu (engleski: „phosphate buffer saline“, skraćénica PBS).



Slika 6. **Izolacija tkiva leđne moždine mladih oposuma *Monodelphis domestica*.** (A) Mladi oposumi stari 5 i 17 dana, odvojeni od majke. (B) Petrijeva zdjelica ispunjena silikonom, u kojoj se izvodi disekcija leđne moždine.

3.3. Primarna protutijela korištena u imunofluorescentnim obojanjima

Sljedeća primarna protutijela su korištena za imunofluorescentno bojanje: „doublecortin“ DCX (kozje, poliklonalno; 1:20; Santa Cruz Biotechnology, CA, SAD), NeuN (mišje monoklonalno; 1:50; Chemicon, Millipore, Billerica, MA), ATF3 (zečje poliklonalno; 1:200, Santa Cruz Biotechnology, CA, SAD), Sox2 (mišje monoklonalno; 1:1000, Abcam, SAD), vimentin (mišje monoklonalno; 1:200, Abcam, SAD) i Ki67 (zečje poliklonalno; 1:50/1:100, Abcam, SAD).

DCX (od engleske skraćenice za Doublecortin) je protein vezan za mikrotubule koji se eksprimira tijekom neurogeneze, te se koristi kao biljeg za mlade živčane stanice.^{29,30} NeuN (od engleske složenice za **Neuronal Nuclei**) je transkripcijski faktor Fox3 koji se specifično eksprimira u jezgrama neurona, te se koristi kao biljeg zrelih živčanih stanica³¹. ATF3 (od engleske skraćenice Activating Transcription Factor 3) je transkripcijski faktor čija uloga nije potpuno poznata, a nedavno je nađen u migrirajućim endodermalnim matičnim stanicama štakora¹⁹. Sox2 pripada Sox obitelji transkripcijskih faktora, a predstavlja univerzalni biljeg za prekursorske i matične stanice kralježnjaka.^{23,32} Vimentin pripada intermedijarnim filamentoznim proteinima i biljeg je matičnih stanica^{33,34}.

Protutijelo Ki67 je protein jezgre koji označava specifično proliferirajuće stanice.³⁵

3.4. Protokol za imunofluorescentno bojanje prereza leđne moždine

Korišten je takozvani „free-floating“ protokol u kojem prerezi tkiva „slobodno plivaju“ u otopinama za bojanje (za razliku od drugih protokola u kojima su prerezi pričvršćeni na stakalca). Pokusi su rađeni na prerezima cervikalnih i torakalno-lumbarnih dijelova leđnih moždina oposuma starih 5, 10 i 17 dana. Nakon što su prerezi 3 puta po 5 minuta isprani u fosfatnom puferu (PBS od engleskog phosphate buffer saline: 10XPBS, 0,1M, pH 7.4; sastav otopljen u 1000ml destilirane vode, H₂O: 76,78 mmol Na₂HPO₄ (bezvodni natrijev hidrogenfosfat); 26,67 mmol NaH₂PO₄ (bezvodni natrijev dihidrogenfosfat), 1539,83 mmol NaCl (natrijev klorid), prenešeni su u „blokirajuću otopinu“ (BO) koja sprječava nespecifično vezanje protutijela. BO sadrži: 5% normalnog kozjeg seruma (Chemicon, CA, SAD); 5%-tni albumin iz goveđeg seruma (Sigma-Aldrich, SAD) i 10%-tni Triton X-100, otopljene u 1xPBS-u. Serum u BO-i mora biti od iste životinjske vrste kao i sekundarno protutijelo. Prerezi leđne moždine inkubirani su u BO 1 sat na sobnoj temperaturi. Nakon toga, tkivo je inkubirano 24 sata na +4°C u 250 µl otopine koja sadrži primjereno primarno protutijelo ili više njih, adekvatno razrijeđenih u ABS-u. ABS (od engleskog Antibody solution) sadrži: 1% normalnog kozjeg seruma (Chemicon, CA, SAD); 5%-tni albumin iz goveđeg seruma (Sigma-Aldrich, SAD) i 10%-tni Triton X-100, otopljene u 1xPBS-u. Razrjeđenja koja su korištena u ovom radu su sljedeća: DCX 1:20; NeuN 1:50; ATF3 1:200; SOX2 1:1000; vimentin 1:200; Ki67 1:50/1:100. Sljedećeg dana, tkivo je isprano 3 x po 10 minuta u PBS-u. Nakon trećeg ispiranja, tkivo je inkubirano u otopini koja sadrži adekvatna sekundarna protutijela (proizvedena u životinjskim vrstama koje moraju biti drugačije od onih u kojima su proizvedena primarna protutijela), označena određenim fluorescentnim bojama (Alexa Fluor zeleno protutijelo; 488 nm excitacijska valna duljina ili crveno; 594 nm excitacijska valna duljina; Invitrogen, Milano, Italija). Sekundarna protutijela dodana su u razrjeđenju 1:500, a inkubacija je trajala 1

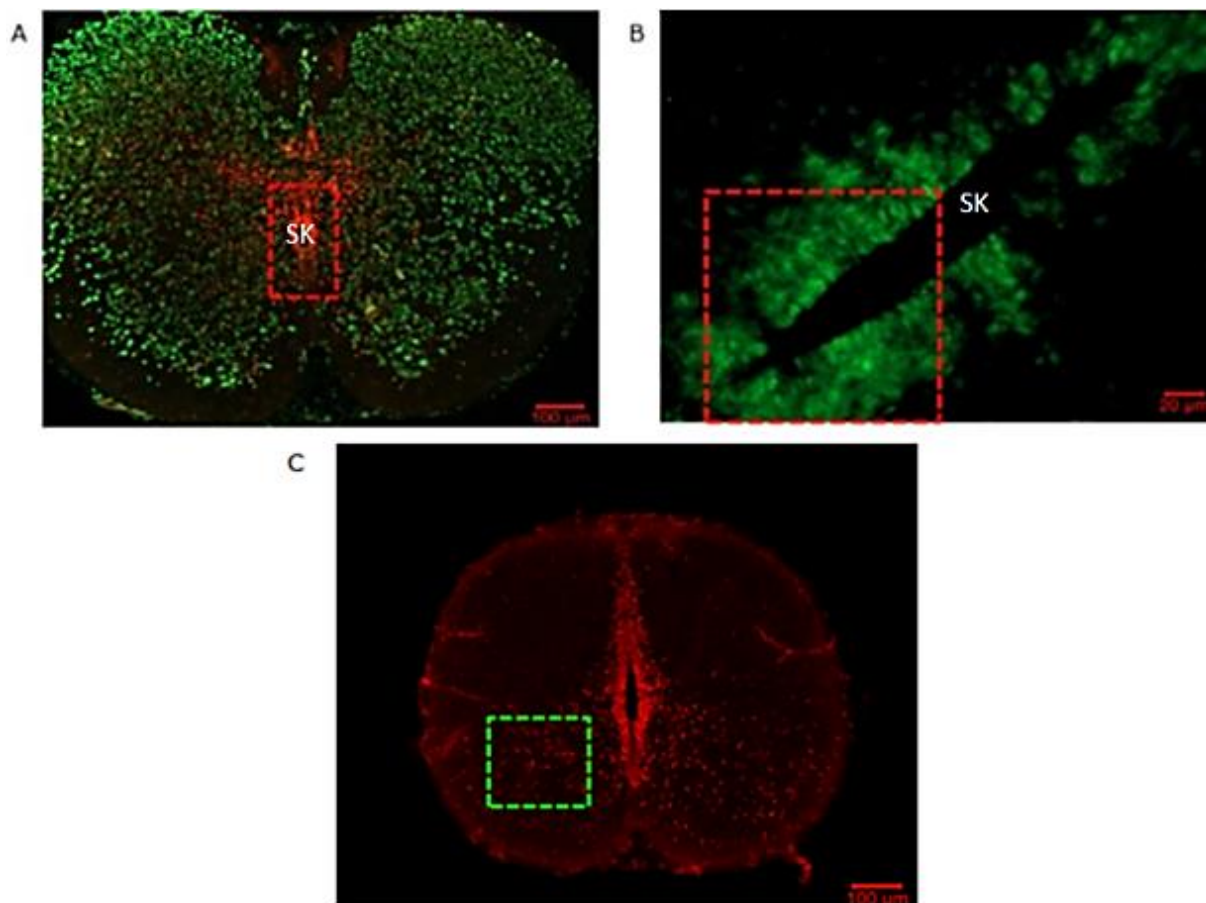
sat, na sobnoj temperaturi, u tami. Uzorci su potom ponovno ispirani (3 puta po 5 minuta) u PBS-u, kako bi se otkonila nevezana sekundarna protutijela. Na kraju, tkivo je bojano s 4,6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI, koji se jakim vezom veže za A-T regije u DNA, te stoga fluorescetno boji sve stanične jezgre), 20 minuta na sobnoj temperaturi, u tamnom prostoru. Nakon kratkog (nekoliko sekundi) ispiranja PBS-om i destiliranom vodom, prerezi su preneseni na Superfrost Plus (Menzer-Glaser, Braunschweig, Njemačka) predmetna mikroskopska stakalca i osušeni na zraku, na sobnoj temperaturi. Na kraju, tkivo je pokriveno pokrovnom otopinom (1-2 kapi DAKO Mounting medium, Carpinteria, CA, SAD), koja pojačava fluorescentni signal i usporava njegovo izbjeljivanje, te su položena pokrovna stakalca. Stakalca su čuvana u suhim kutijama na -20°C do mikroskopiranja.

3.5. Mikroskopiranje tkiva

Prerezi leđnih moždina imuno-fluorescentno obojeni, pregledani su, analizirani i snimljeni pomoću Zeiss Axio Observer Z1 fluorescentnog mikroskopa (Njemačka). Najzanimljiviji uzorci su analizirani pomoću Zeiss LSM 880 Airyscan konfokalnog mikroskopa (Njemačka), te Zen 2 (blue edition, Zeiss, Jena, Njemačka) računalnog programa.

3.6. Brojanje ATF3, SOX2 i Ki67 pozitivnih stanica (jezgri)

ATF3, SOX2 i Ki67 pozitivne stanice, odnosno njihove jezgre, brojane su u regijama od interesa: ependimalna regija oko središnjeg kanala (SK) (slika 7 A i B), te dijelovi dorzalnih ili ventralnih regija leđnih moždina (slika 7 C). Pozitivne jezgre unutar odabranih regija od interesa brojane su pomoću računalnih programa: CellProfiler (National Institutes of Health:NIH, SAD) i ImageJ (NIH, SAD). U svakom pokusu, zbog statističke prosudbe, analizirana su najmanje 3 različita prereza leđne moždine, dobivena od najmanje dvije različite životinje.



Slika 7. **Regije od interesa u kojima su brojane ATF3, SOX2 i Ki67 pozitivne stanice ledne moždine.** Regije od interesa u kojima su brojane pozitivne jezgre, obojane ATF3, SOX2 i Ki67 protutijelima: crveni četverokut pokazuje regiju oko središnjeg kanala na A i B, a zeleni četverokut ventralnu regiju sive tvari ledne moždine (crveni četverokut) na C. Dimenzije regija od interesa: $23000 \mu\text{m}^2$ kod A, $11400 \mu\text{m}^2$ kod B, oko $32000 \mu\text{m}^2$ kod C. SK=središnji kanal

3.7. Statistička analiza rezultata

Podaci o intenzitetu imunobojanja, te o broju pozitivnih stanica (jezgri) izraženi su kao srednja vrijednost, s pripadajućim standardnim devijacijama. Rezultati su analizirani pomoću računalnog programa Statistica 12 (StatSoft, SAD). Za određivanje razlike između parametrijskih i ne-parametrijskih podataka koristio se test normalne raspodjele podataka. Dobivene vrijednosti statistički su

obrađene i analizirane jednosmjernom analizom (ANOVA) uz Tuckey HSD post hoc test. Odabrana statistička značajnost je iznosila $P < 0,05$.

4. REZULTATI

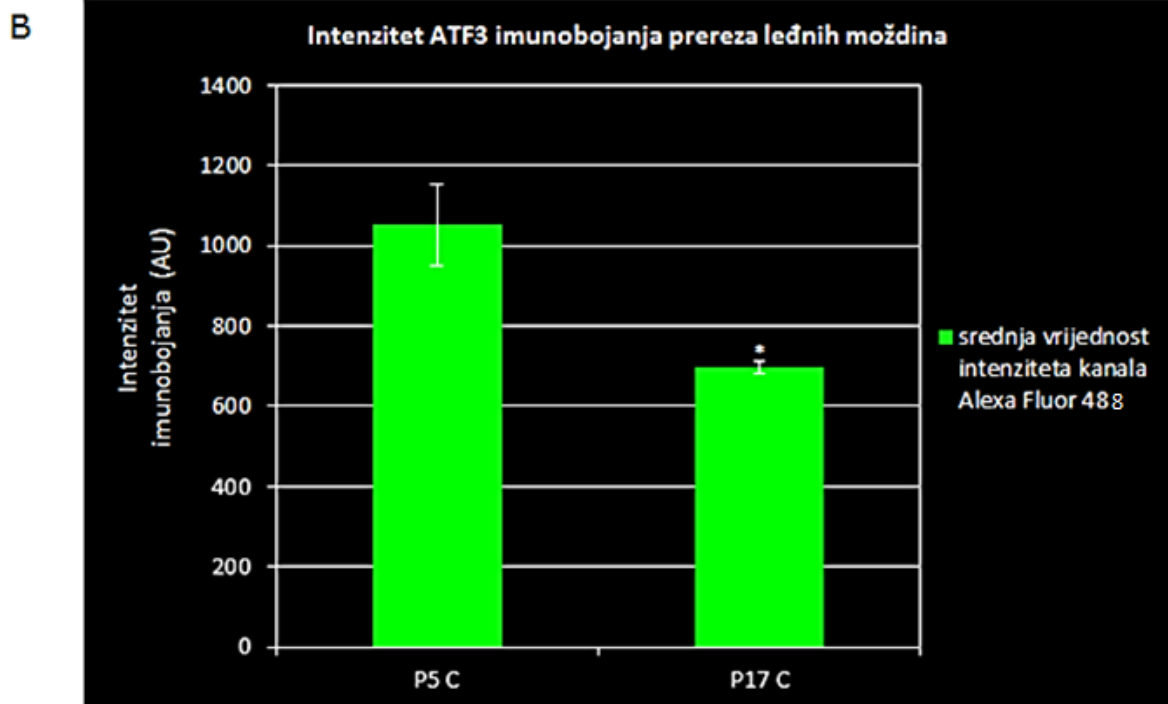
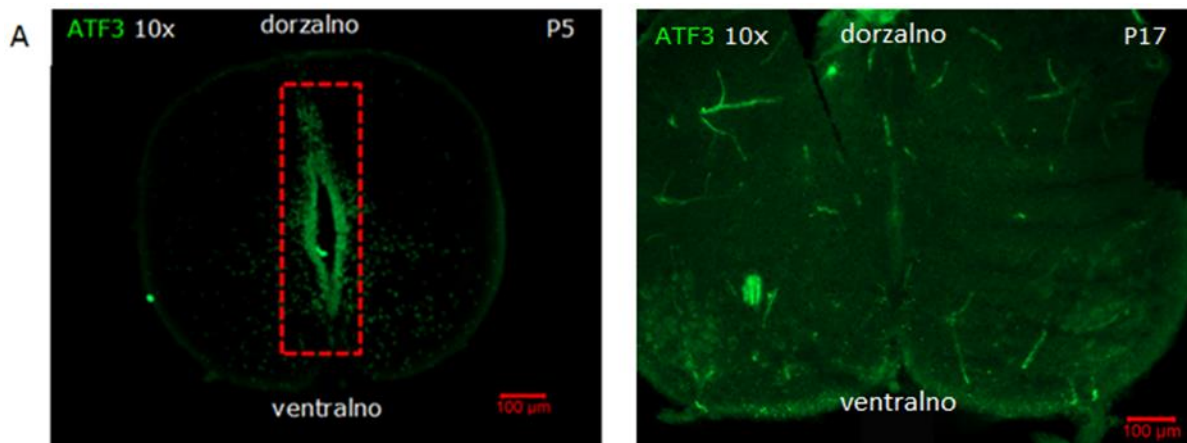
4.1. ATF3 je prisutan u jezgri ependimalnih stanica oposuma u razdoblju kada postoji sposobnost regeneracije leđne moždine

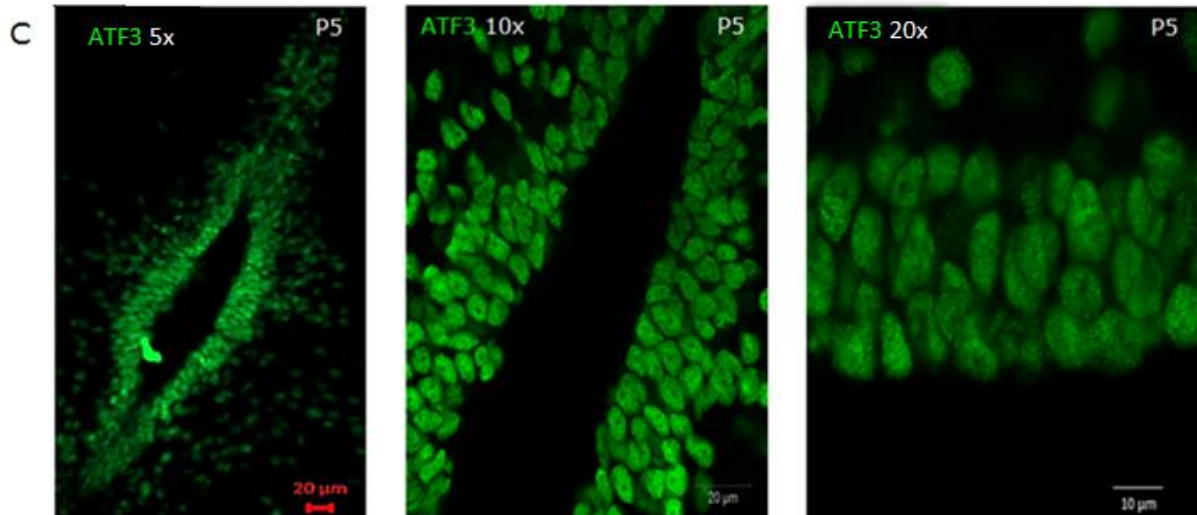
Prijašnja istraživanja su pokazala da je ATF3 eksprimiran u matičnim stanicama leđne moždine štakora, te da se može naći u citoplazmi ukoliko su stanice mirujuće, ili pak u njihovoj jezgri ukoliko su stanice aktivne i migrirajuće.¹⁹ U ovom istraživanju željeli smo otkriti da li i oposum eksprimira ATF3 transkripcijski faktor u stanicama (matičnima?) leđne moždine, te da li se situacija mijenja tijekom razdoblja u kojem tkivo leđne moždine gubi sposobnost regeneracije nakon ozljede.

Imunobojanje s ATF3-specifičnim protutijelom otkrilo je prisutnost ovog proteina u jezgarama ependimalnih stanica oposuma, smještenima oko središnjeg kanala leđne moždine, te u određenim stanicama ventralnog područja leđne moždine (i u sivoj i bijeloj tvari). Na Slici 8A prikazani su prerezi leđnih moždina oposuma starih 5 i 17 dana (postnatalni dan P5 i P17). Jako ATF3 imuno-bojanje uočeno je kod mladih životinja 5 dana starih (mogu potpuno funkcionalno regenerirati leđnu moždinu nakon ozljede) i to u ependimalnim stanicama koje okružuju središnji kanal leđne moždine. Ovakav signal nije bio prisutan u starijih životinja (P17) kod kojih se sposobnost regeneracije potpuno gubi.

Ova razlika je potvrđena kvantifikacijom intenziteta ATF3 imunobojanja na prerezima leđnih moždina životinja različite dobi: intenzitet imunobojanja ATF3-a je značajno smanjen kod oposuma starih 17 dana u odnosu na mlađe životinje, 5 dana stare (slika 8B). Srednja vrijednost intenziteta signala ATF3-a kod P5 oposuma iznosio je $1052,15 \pm 100,68$ AU, dok je kod P17 oposuma iznosio $696,36 \pm 15,13$ AU. Dobiveni rezultati su statistički značajni: $p=0,039$ ($p<0,05$).

Vrlo je zanimljivo da je ATF3 lokaliziran u jezgri endotelijalnih stanica mladih oposuma (slika 8C). Naime, prijašnji rezultati (na štakoru) su pokazali da je lokalizacija ATF3 proteina u matičnim stanicama vrlo dinamična, te da ovisi o stupnju mirovanja, odnosno aktivacije stanica.¹⁹ Slika endotelijalnih ATF3 pozitivnih stanica, snimljena konfokalnim mikroskopom, pokazuje ekskluzivno nuklearno imunobojanje stanica, koje su vrlo gusto pakirane u području oko središnjeg kanala kod 5 dana starih oposuma (slika 8C).

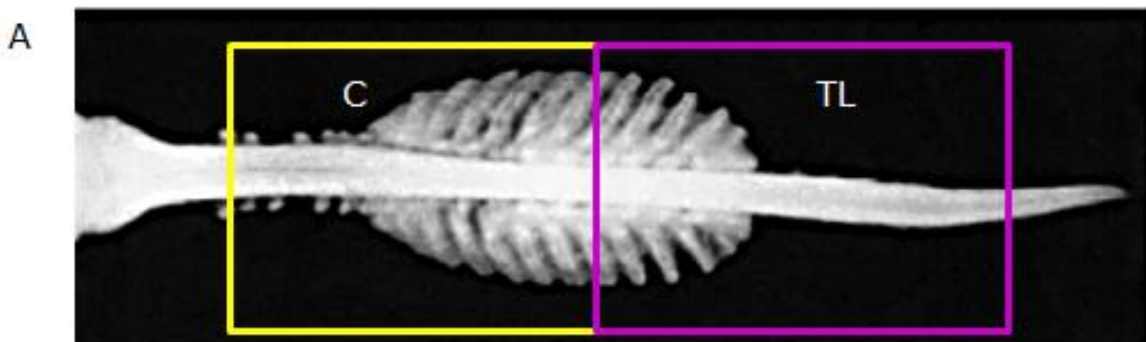




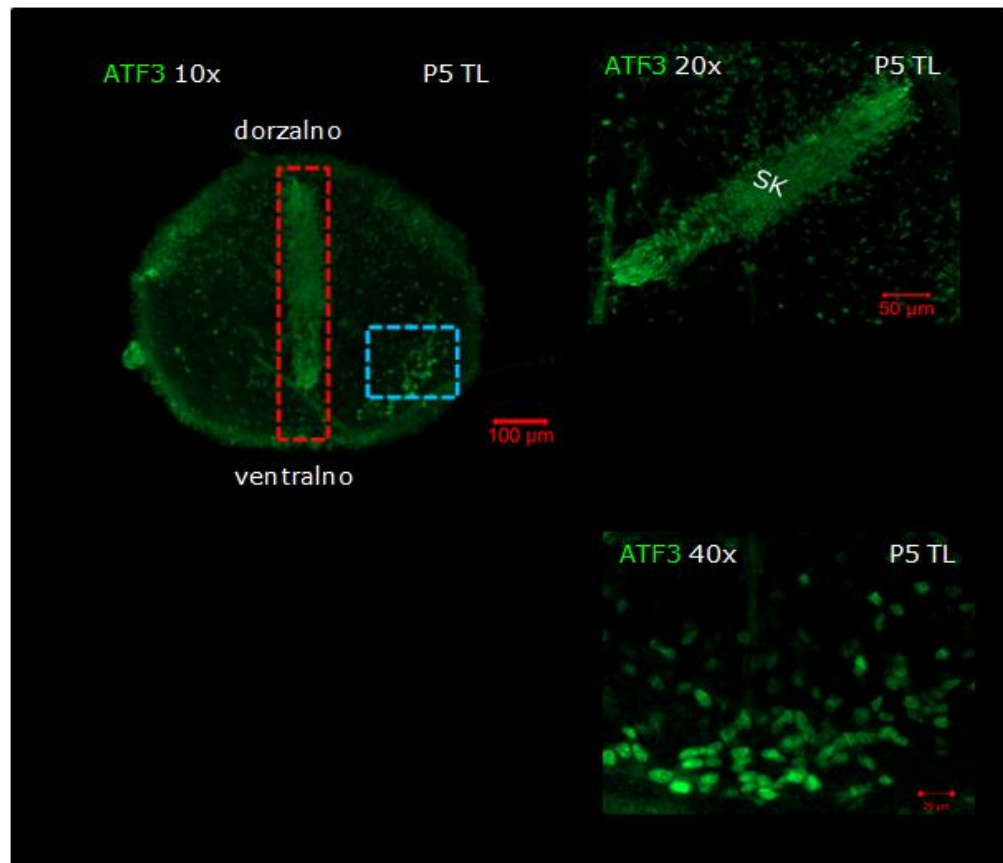
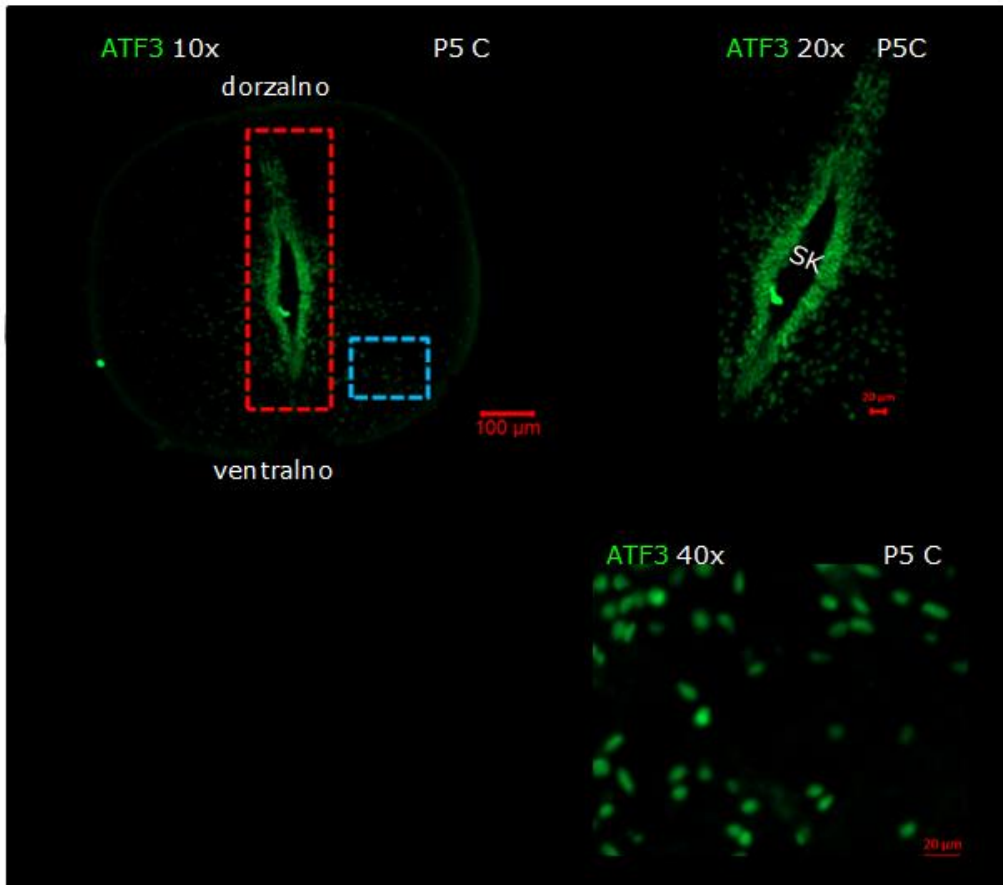
Slika 8. **ATF3 je prisutan u jezgri endotelijalnih stanica leđne moždine mladih oposuma.** (A) Poprečni presjeci leđne moždine (30 μm) P5 (lijevo; P= postnatalni dan) i P17 (desno), imuno-obojenih specifično s ATF3 (zeleno). Na slici lijevo označena je endotelijalna regija oko središnjeg kanala (SK)(crveni četverokut). ATF3 signal je vrlo jak kod mlađih životinja (P5, lijeva slika), a gotovo ne postoji u području oko središnjeg kanala kod starijih (P17, desna slika) životinja. (B) Histogram prikazuje razliku u jačini ATF3 imunobojanja u arbitrarnim jedinicama; engleski „arbitrary units“, AU na prerezima leđnih moždina P5 i P17 oposuma. Dobivene vrijednosti su: srednja vrijednost $\pm\text{SD}$ (tri različita prereza iz dvije različite leđne moždine). Podaci za P5 i P17 oposume se statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$; jednosmjerna analiza varijanci ili ANOVA i Tuckey HSD post-hoc test). (C) Primjer uvećanih slika endotelijalne zone prereza leđne moždine 5 dana starog oposuma (lijevo 5x, sredina 10x i desno 20x uvećanje), snimljenih konfokalnim mikroskopom. P5= postnatalni dan 5. P17= postnatalni dan 17.SK=središnji kanal. AU=engl.arbitrary unit. Mjerilo je 20 μm (lijevo i sredina), 10 μm (desno).

4.2. ATF3 pozitivne jezgre endotelialnih stanica brojnije su u manje razvijenom torakalno-lumbarnom dijelu leđne moždine 5 dana starog oposuma

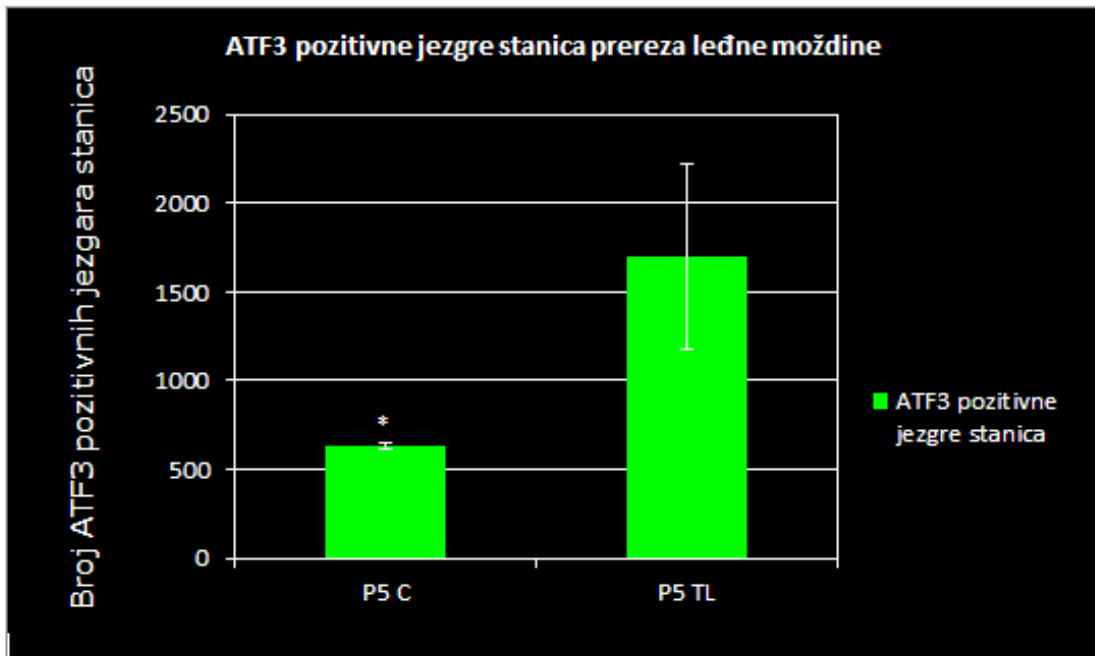
Kako leđna moždina pokazuje gradijent u razvoju (gornji cervikalni dio napredniji je, dok donji torakarno-lumbarni dio kasni u razvoju za nekoliko dana; slika 9A), postavili smo pitanje da li postoji razlika u broju ATF3 pozitivnih jezgara endotelialnih stanica u različitim dijelovima leđne moždine 5 dana starog oposuma. U tu su svrhu imuno-obojeni specifičnim ATF3 protutijelom prerezi cervikalnog, te torakalnog-lumbarnog dijela leđne moždine 5 dana starog oposuma (slika 9B). Rezultati su pokazali značajnu razliku u broju ATF3 pozitivnih endotelialnih stanica u različitim regijama leđne moždine, te u jačini mjenog signala (histogram 9C). Naime broj ATF3 pozitivnih stanica, te intenzitet ATF3 signala je veći u nerazvijenijem torakalno-lumbarnom dijelu leđne moždine, nego u razvijenijem, cervikalnom dijelu (slika 9B). ATF3 pozitivne stanice, odnosno njihove jezgre su brojane u 30 μm tankim prerezima leđne moždine, i to u središnjem području označenom crvenim pravokutnikom na slici 9B. Dobivene su sljedeće vrijednosti: $632,33 \pm 17,50$ ATF3 pozitivno imunobojenih stanica u cervikanom dijelu, te $1701,67 \pm 522,80$ u torakalno-lumbarnom dijelu. Dobiveni rezultati su statistički značajni: $p=0,024$, $p<0,05$.(histogram 9C).



B



C

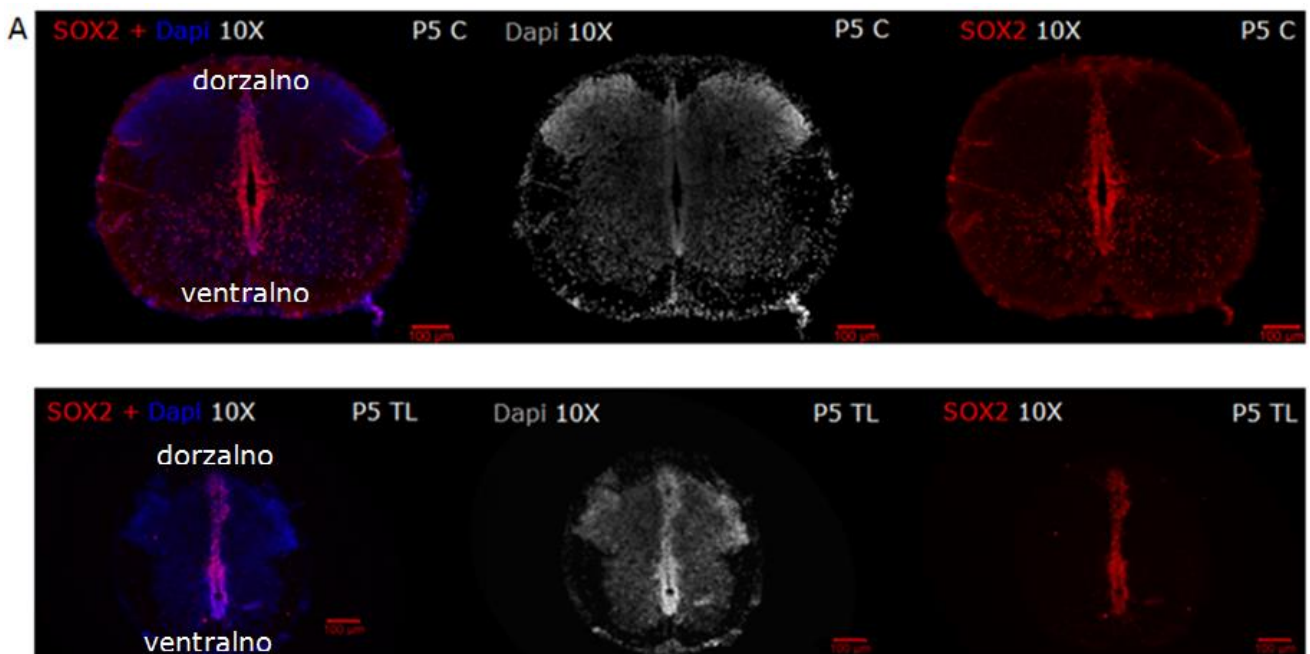


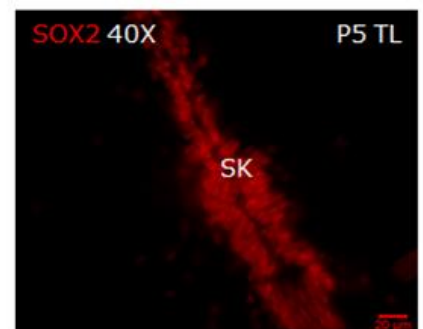
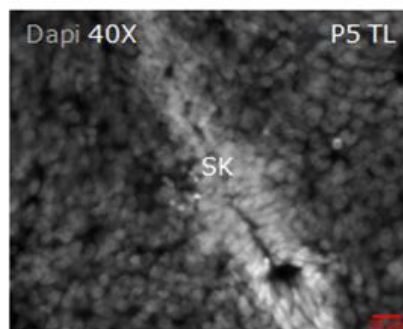
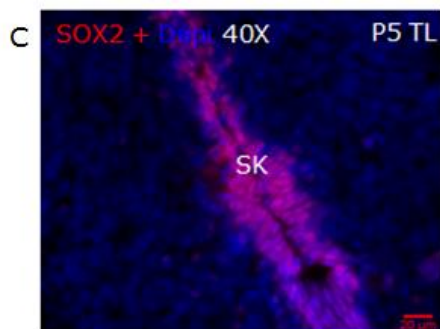
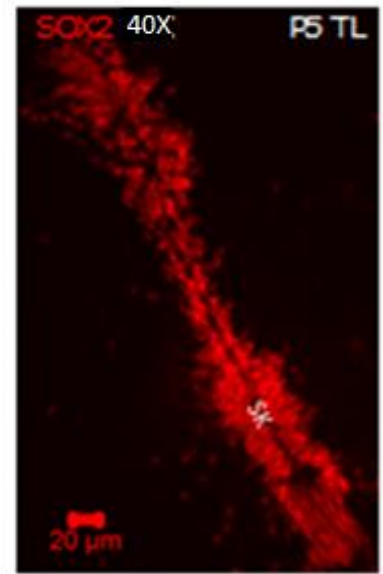
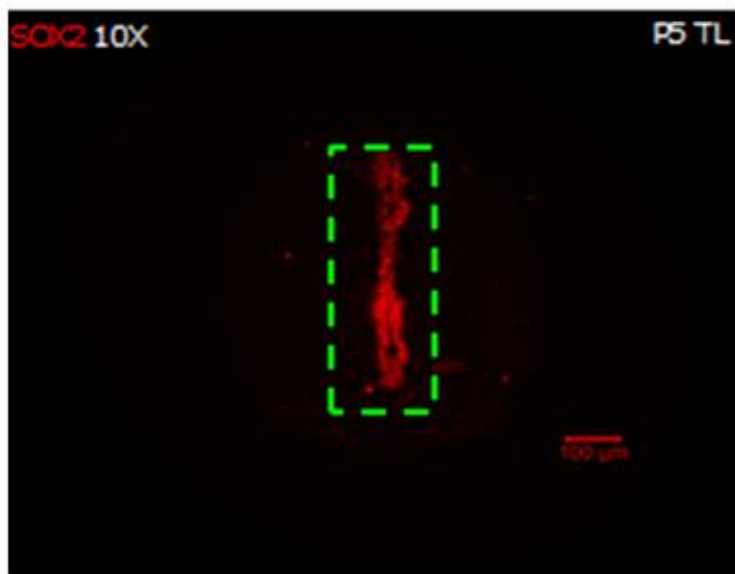
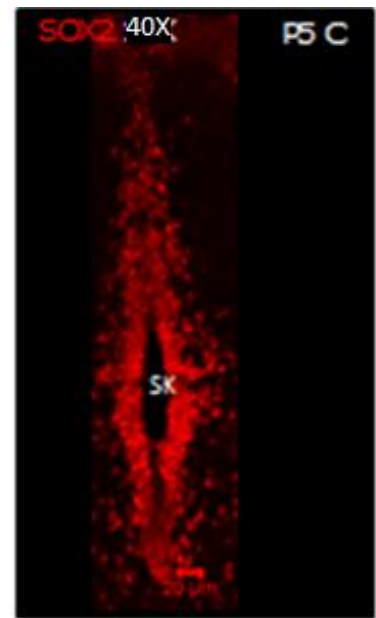
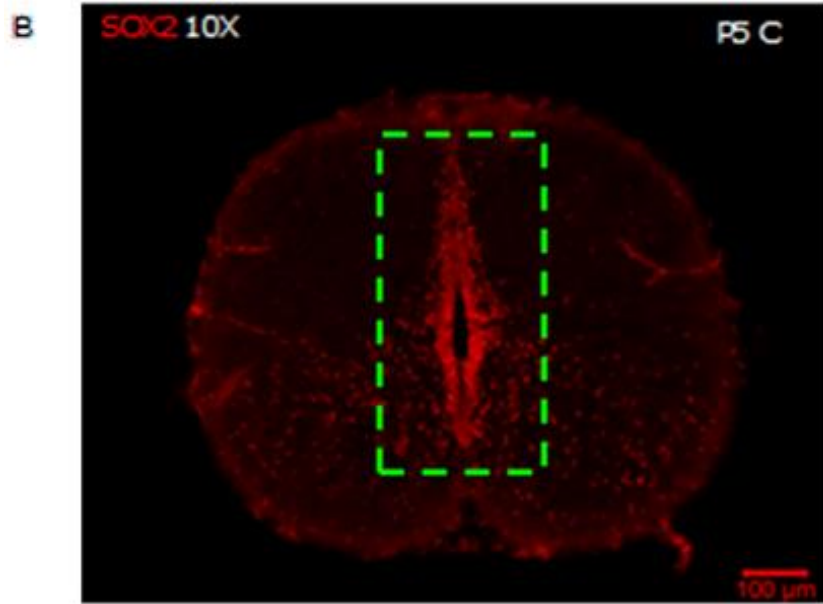
Slika 9. **Broj ATF3 pozitivnih ependimalnih stanica je veći u manje razvijenom torakalno-lumbarnom dijelu leđne moždine oposuma.** A) Fotografija izolirane leđne moždine novorođenog oposuma. Preuzeto od Mladinic & Wintzer (2002). Leđna moždina se dijeli na cervikalni (vratni) (približno označen žutim kvadratom), torakalno-lumbarni (grudno-slabinski) (približno označen ljubičastim kvadratom), te sakralni (krsni) dio. B) Poprečni presjeci (tanki 30 μ m) cervikalnog (gornje slike) i torakalno-lumbarnog (donje slike) dijela leđnih moždina 5 dana starog oposuma (P5), imuno-obojenim sa ATF3-om (zeleno). Uvećane slike njihovih ependimalnih (označena crvenim četverokutom) i ventralnih regija (označena plavim četverokutom) su pokazane desno. (C) Histogram pokazuje broj ATF3 pozitivnih jezgara u ependimalnoj zoni na prerezima različitih dijelova leđne moždine. Dobiveni podaci se statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$; jednosmjerna analiza varijanci ili ANOVA i Tuckey HSD post-hoc test). P5 C= prerez cervikalnog dijela leđne moždine oposuma u dobi od 5 dana. P5 TL= prerez torakalno-lumbarnog dijela leđne moždine oposuma u dobi od 5 dana. SK=središnji kanal. Mjerilo je 100 μ m s povećanjem od 10x kod B (cijeli poprečni prerez), 50 μ m s povećanjem od 20x kod B (P5 TL SK), 20 μ m s povećanjem od 20x (P5 C SK) i 40x (ventralni dio) kod B.

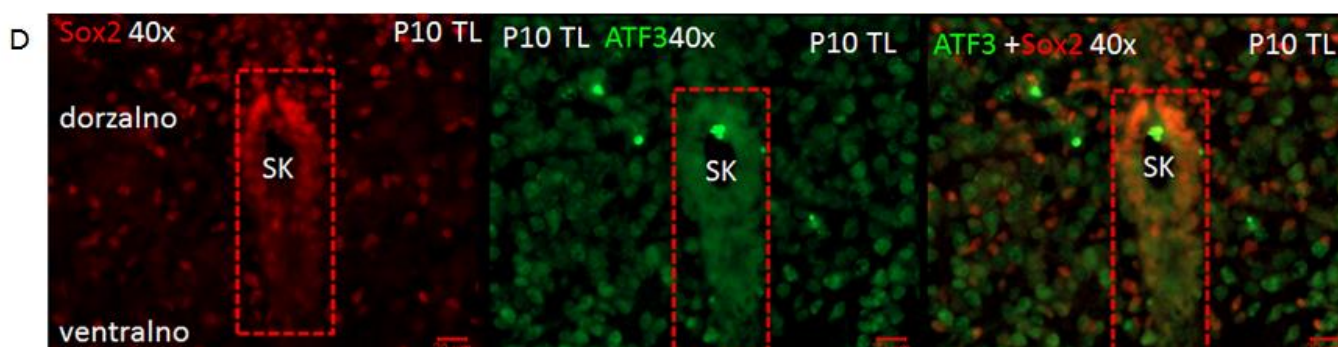
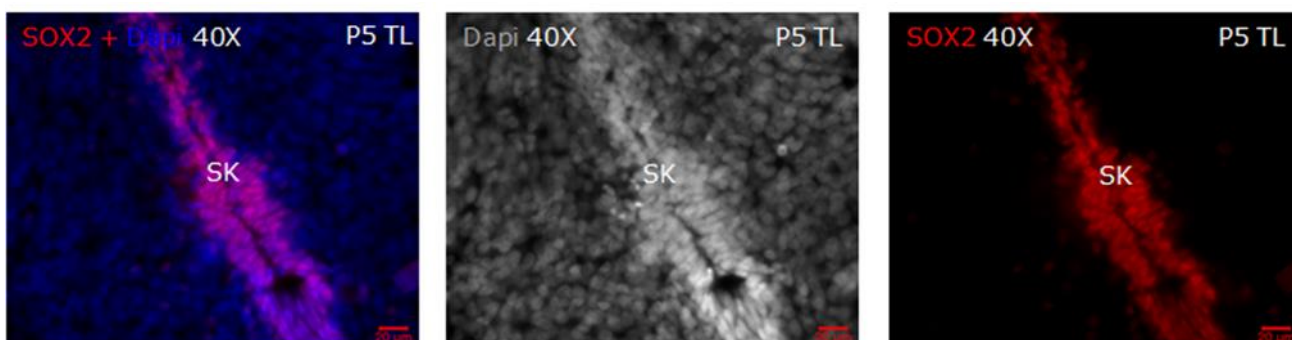
4.3. ATF3 pozitivne ependimalne stanice su SOX2 pozitivne

Rezultati prijašnjih istraživanja na štakoru pokazali su da su ATF3 pozitivne stanice i SOX2 pozitivne. SOX2 je transkripcijski faktor koji je eksprimiran u matičnim/praroditeljskim stanicama^{23,32}. Kako bi dokazali da su brojne ATF3-pozitivne stanice oposuma zaista matične stanice, istražili smo da li eksprimiraju SOX2.

Rezultati su pokazali vrlo snažno SOX2 imuno-bojanje jezgara stanica u području identičnom kao i kod ATF3 bojanja. Dakle, pozitivni signal dobiven je u stanicama u području oko središnjeg kanala i cervikalnih i torakalno-lumbarnih dijelova leđnih moždina oposuma starih 5 dana (P5) (slika 10A,B,C). Također, uočene su SOX2 pozitivne stanice raštrkane u ventralnom dijelu leđne moždine (i bijela i siva tvar). Na primjeru prereza leđnih moždina oposuma starih 10 dana (P10), pokazano je preklapanje ATF3 i SOX2 signala u jezgrama ependimalnih stanica (slika 10D), što dokazuje da su ATF3 pozitivne stanice zaista matične stanice.





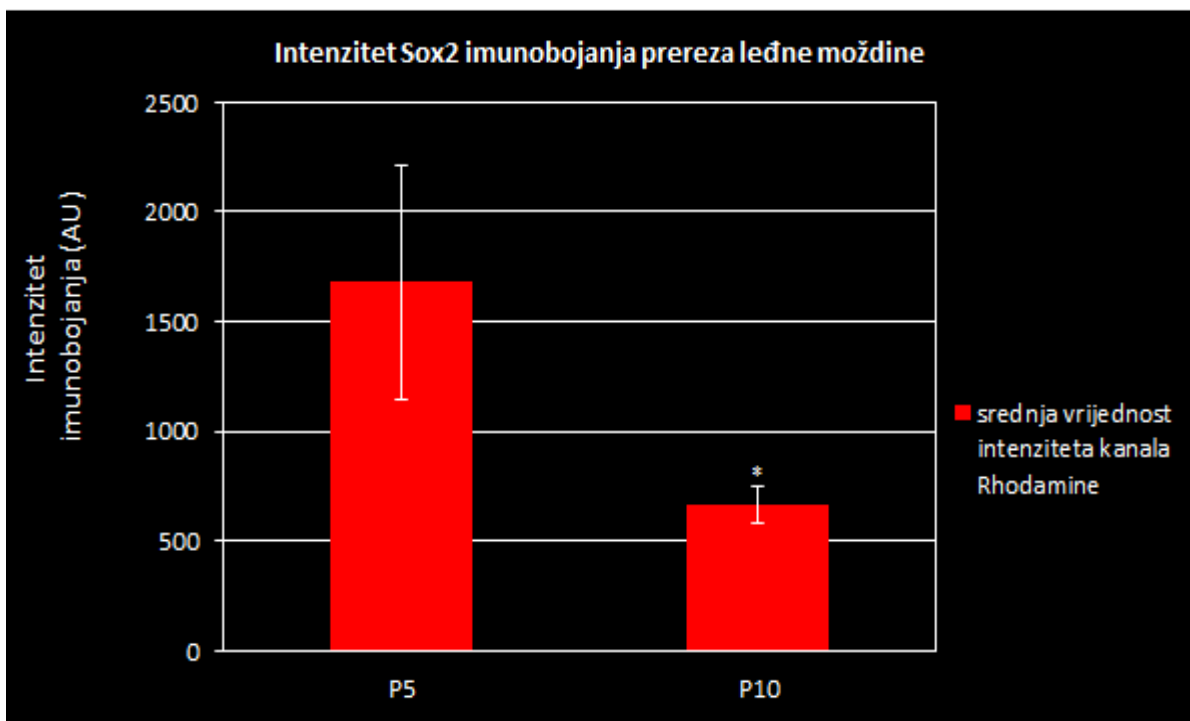


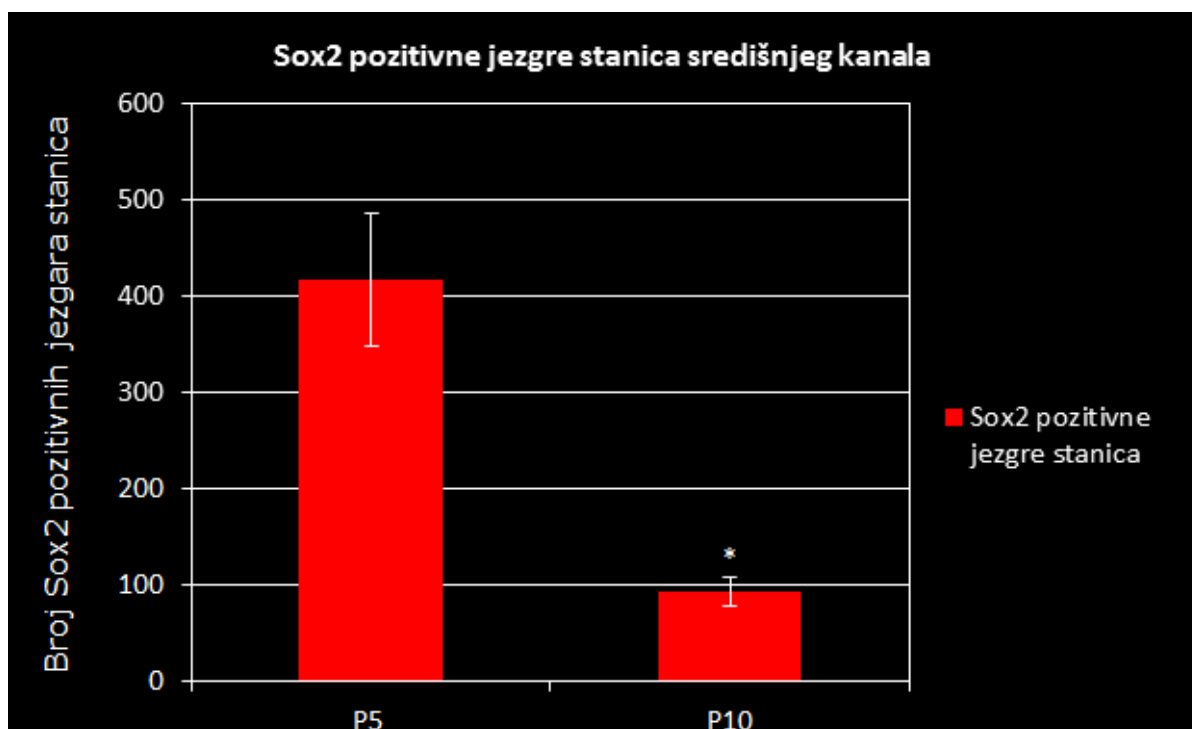
Slika 10. ATF3 i SOX2 imuno-signal se poklapaju u endodermalnim stranicama leđne moždine P5 oposuma. A) Poprečni prerezi (tanki 30 µm) leđnih moždina P5 C i P5 TL oposuma imunobojeni sa SOX2 (crveno; desno). Lijeva slika prikazuje zajedno SOX2 signal (crveno) i DAPI signal (plavo; boji DNA, dakle jezgre svih stanica). Srednji dio slike prikazuje samo DAPI bojanje (bijelo). B) Poprečni prerezi leđnih moždina P5 C i P5 TL oposuma imunobojeni sa SOX2 (crveno) i uvećane slike njihovih endodermalnih zona (zeleni pravokutnici). C) Povećane slike endodermalnih stanica P5 C i P5 TL prereza oposuma, imunobojenih sa SOX2 (crveno; desno). Lijevi dio prikazuje zajedno SOX2-a (crveno) i DAPI (plavo). Srednji dio prikazuje samo DAPI bojanje (bijelo). D) Povećane slike SOX2 (crveno) i ATF3 (zeleno) pozitivnih endodermalnih stanica. P5 C= prerez cervikalnog dijela leđne moždine oposuma starog 5 dana. P5 TL= prerez torakalno-lumbarnog dijela leđne moždine oposuma starog 5 dana. SK=središnji kanal. Mjerilo je 100 µm, s povećanjem od 10x kod A i B, , te 20 µm s povećanjem od 40x kod B(desno), C i D.

4.4. Intenzitet SOX2 imunofluorescentnog signala smanjuje se tijekom razvoja oposuma

Histogrami na slici 11 pokazuju jačinu SOX2 imunobojanja na prerezima leđnih moždina oposuma starih 5 i 10 dana (P5 i P10). Dobiveni su sljedeći rezultati: $1682,27 \pm 533,46$ AU za SOX2 signal kod P5 oposuma, te $661,55 \pm 84,57$ AU kod P10 oposuma. Ove vrijednosti su statistički značajno različite, $p=0,024$ ($p < 0,05$). Dakle, intenzitet SOX2 imunofluorescentnog signala opada tijekom razvoja oposuma.

Sljedeće, brojane su SOX2 pozitivne jezgre oko središnjeg kanala leđne moždine oposuma, te su dobiveni sljedeći rezultati: $417 \pm 69,30$ SOX2 pozitivnih jezgri kod P5 oposuma, te $93 \pm 15,62$ kod P10 oposuma. Dobivene vrijednosti statistički se značajno razlikuju, $p=0,003$ ($p < 0,05$).

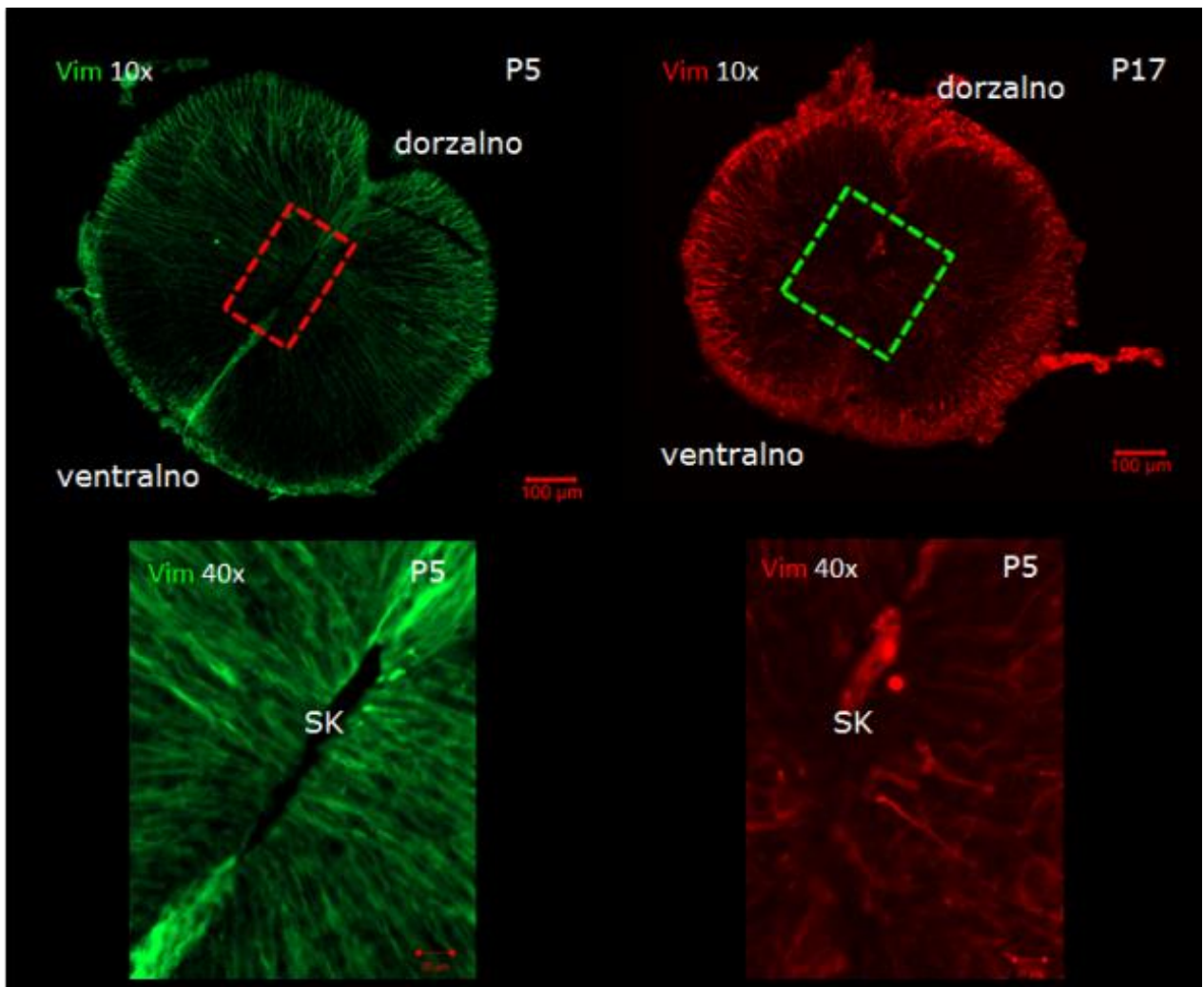




Slika 11. **Intenzitet signala SOX2 imunobojanja smanjuje se kod zrelijih neonatalnih oposuma.** Histogrami intenziteta SOX2 imunobojanja prereza leđnih moždina i SOX2 pozitivnih jezgara ependimalnih stanica oko središnjeg kanala. Dobivene vrijednosti su: srednja vrijednost \pm SD (tri različita prereza od dviju različitih leđnih moždina). Rezultati mjerenja intenziteta SOX2 imunobojanja kod P5 i P10 oposuma se statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$; jednosmjerna analiza varijanci ili ANOVA i Tuckey HSD post-hoc test). P5= postnatalni dan 5. P10= postnatalni dan 10. SK=središnji kanal. AU=engl. arbitrary unit.

4.5. Ependimalne stanice su pozitivne na vimentin kod životinja koje imaju sposobnost regeneracije leđne moždine

Vimentin je intermedijarni filamentozni protein koji se koristi kao biljeg matičnih stanica^{23,34}. Kako bi potvrdili da su ATF3 stanice matične, ispitali smo da li su imunopozitivne i na vimentin. Imunobojanje vimentinom dalo je filamentozni signal koji je bio intenzivan u ependimalnoj zoni 5 dana starih (P5) oposuma (slika 12, lijevo), te prisutan, no manje intenzivan kod 17 dana (P17) starih oposuma (slika 12, desno).



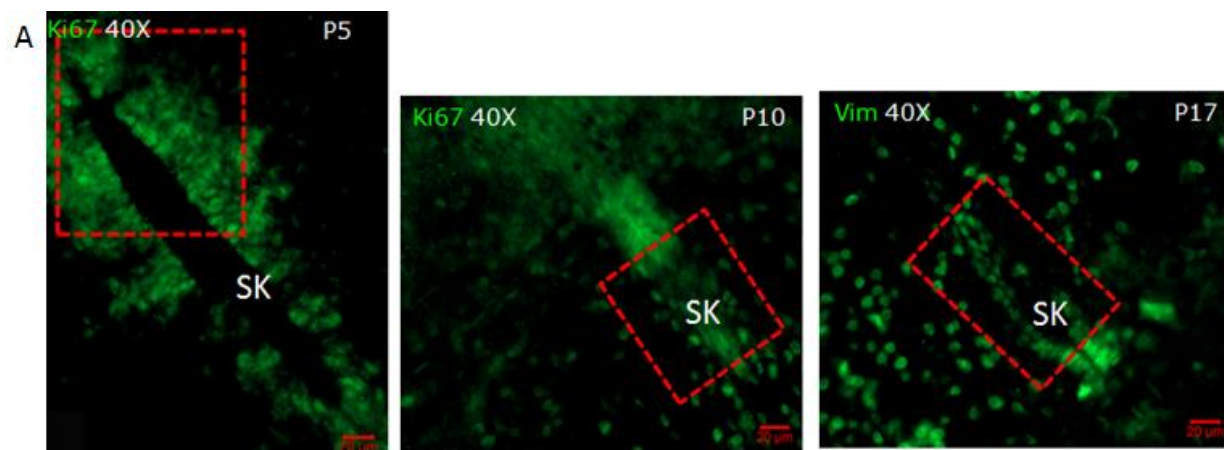
Slika 12 . **Imunobojanje vimentinom prereza leđnih moždina 5 i 17 dana starih oposuma.** Poprečni prerezi (30 μ m) leđnih moždina P5 i P17 oposuma imunobojani sa vimentinom i uvećane slike koje pokazuju ependimalnu zonu (crveni i zeleni četverokut). Imunobojanje vimentinom je na prerezu leđne

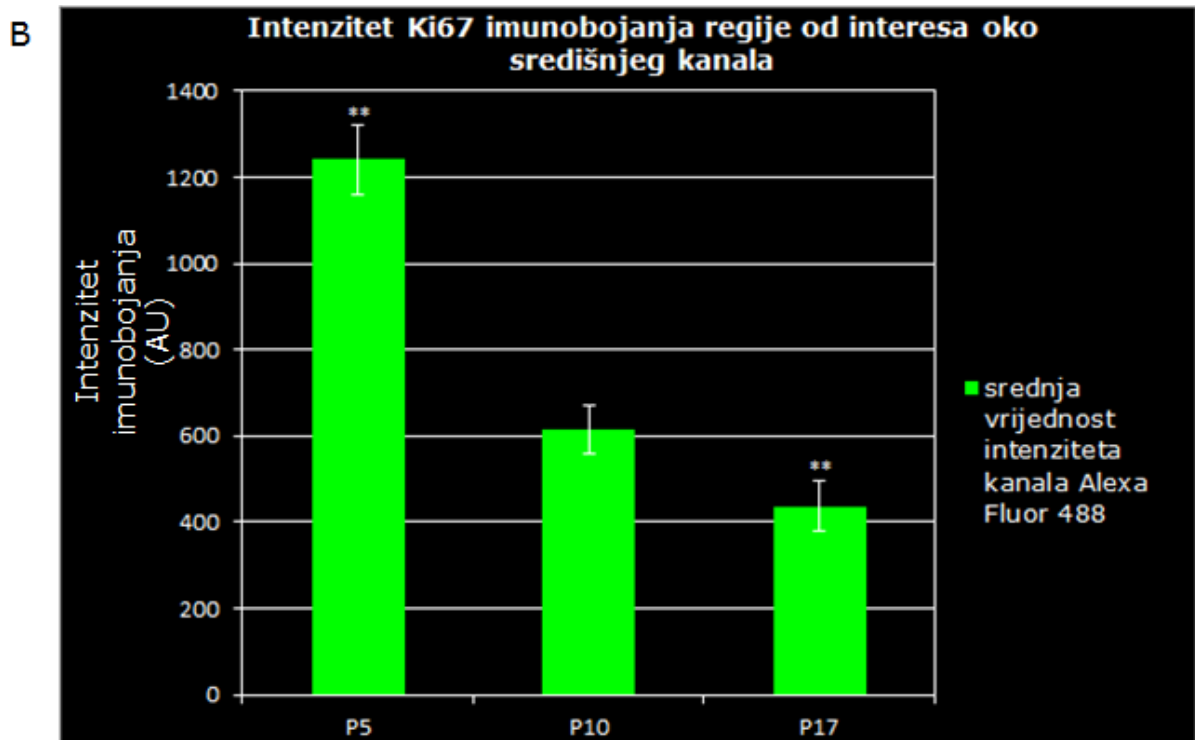
moždine P5 oposuma prikazano zeleno, dok je kod P17 oposuma crveno. P5= postnatalni dan 5. P17= postnatalni dan 17. SK=središnji kanal. Mjerilo je 100 μm s povećanjem od 10x i 20 μm s povećanjem od 40x (uvećana slika epidemalne zone).

4.6. Ependimalne stanice leđne moždine imaju sposobnost proliferacije, koja se tijekom razvoja smanjuje

Kako bi identificirali proliferativne stanice, koristili smo protein Ki67, transkripcijski faktor koji se specifično eksprimira u jezgri stanica koje se dijele.³⁵ Odabrane su i analizirane regije od interesa u području oko središnjeg kanala leđnih moždina oposuma starih 5, 10 i 17 dana (P5, P10 i P17) (slika 13A). Analizom i statističkom obradom dobivene su sljedeće vrijednosti intenziteta signala Ki67 imunobojanja: $1240,52 \pm 80,17$ kod P5 oposuma, $614,55 \pm 57,56$ kod P10 oposuma, te $437,10 \pm 58,72$ kod P17 oposuma (slika 13B). Podaci se statistički značajno razlikuju: razlika između P5 i P10 oposuma je $p=0,0053$ ($p<0,05$) vjerojatna, te između P5 i P17 oposuma je $p=0,0026$ ($p<0,05$). Dakle, intenzitet Ki67 imunobojanja u ependimalnoj zoni leđne moždine oposuma opada tijekom razdoblja kada regeneracija nakon ozljede prestaje biti moguća.

Nije bilo moguće istovremeno obojiti ependimalne stanice ATF3 i Ki67 protutijelom, zbog njihove eksperimentalne nepodudarnosti (naime oba protutijela korištena u ovom radu su načinjena u zecu).

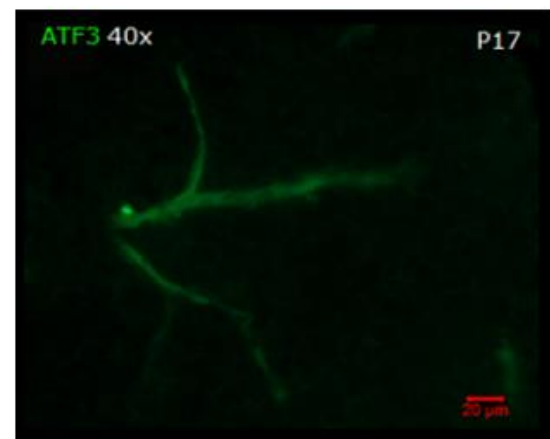
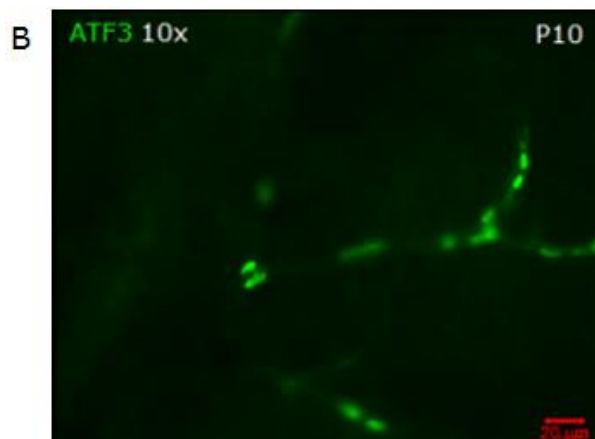
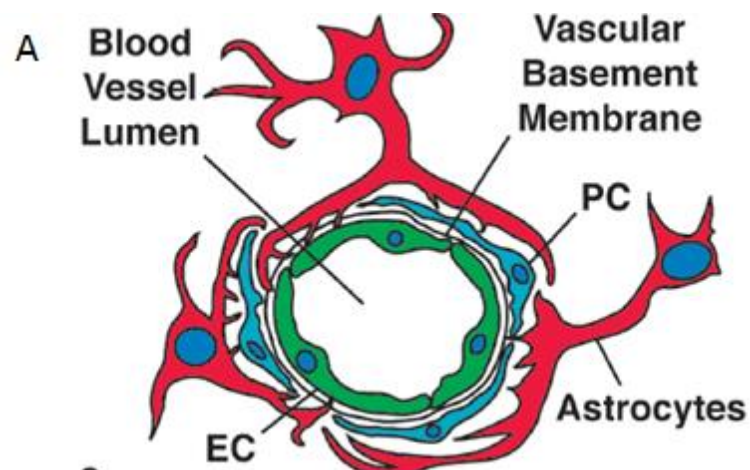


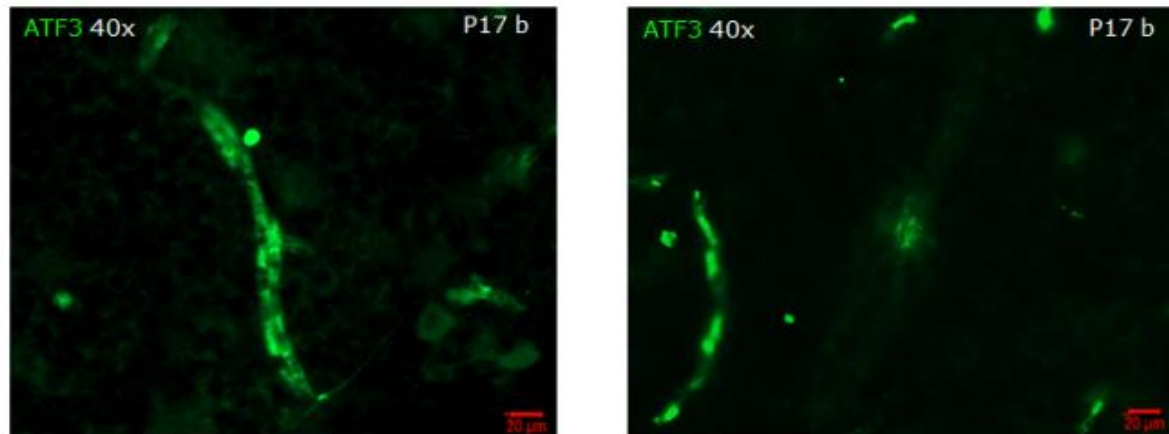


Slika 13. **Imunobojanje endodermalnih stanica leđnih moždina oposuma proliferativnim biljekom Ki67.** A) Primjeri slika endodermalnih regija leđnih moždina P5, P10 i P17 oposuma imunobojenih sa Ki67 (zeleno). Regije od interesa u kojima je mjerena jačina imuno-signala su obilježene crvenim četverokutima. B) Histogram pokazuje jačine Ki67 imunobojanja u endodermalnoj regiji od interesa, oko središnjeg kanala leđnih moždina P5, P10 i P17 oposuma. Rezultati dobiveni za P5 i P10, te za P5 i P17 oposome se statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$; jednosmjerna analiza varijanci ili ANOVA i Tuckey HSD post-hoc test), za razliku od rezultata za P10 i P17 oposum, kod kojih nema statistički značajne razlike. P5= postnatalni dan 5. P10= postnatalni dan 10. P17= postnatalni dan 17. SK=središnji kanal. AU=engl. arbitrary unit. Mjerilo i je 20 μm , a povećanje 40x.

4.7. ATF3 pozitivni signal prisutan je u pericitima spinalnih krvnih žila (čak i kod starijih životinja)

Za razliku od endodimalne zone leđnih moždina starijih životinja (P10 i P17) u kojima nema ATF3 imunobojanja, ATF3 signal je primjećen u nekim stanicama stijenki krvnih žila u području sive tvari leđne moždine (slika 14). Na slikama, snimljenima pomoću fluorescentnog mikroskopa, mogu se uočiti ATF3 pozitivne stanice, vjerojatno periciti, koji omataju kapilare.¹⁷ Periciti, zajedno sa endotelijem i astrocitima, tvore krvno-moždanu barijeru, a poznato je iz novijih istraživanja da imaju karakteristike matičnih stanica^{17,36} (slika 14 A i B).





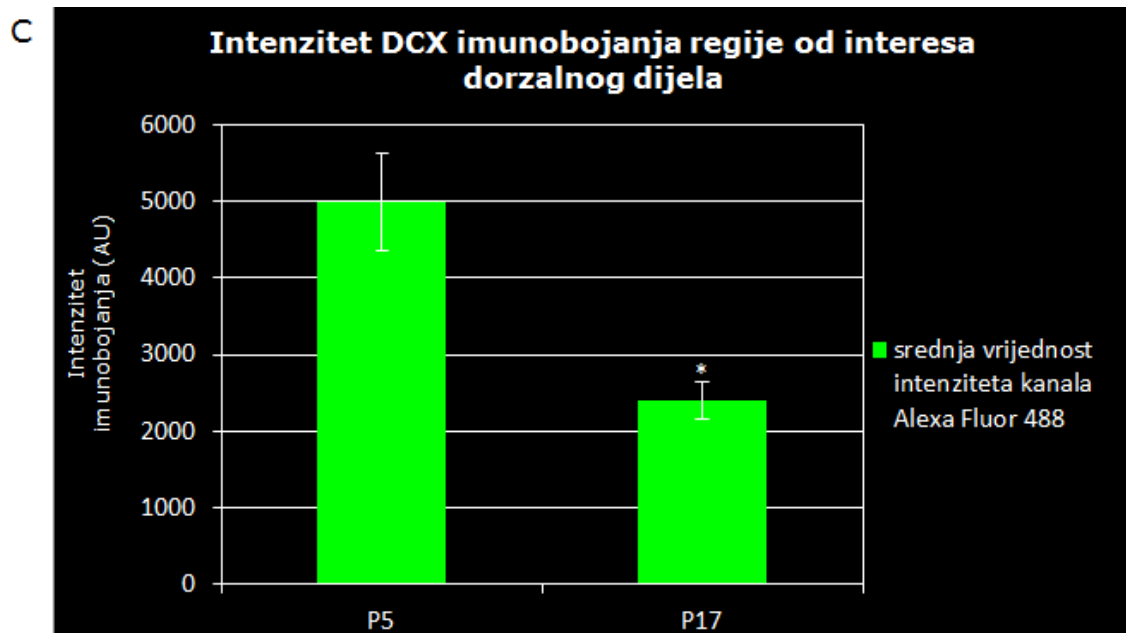
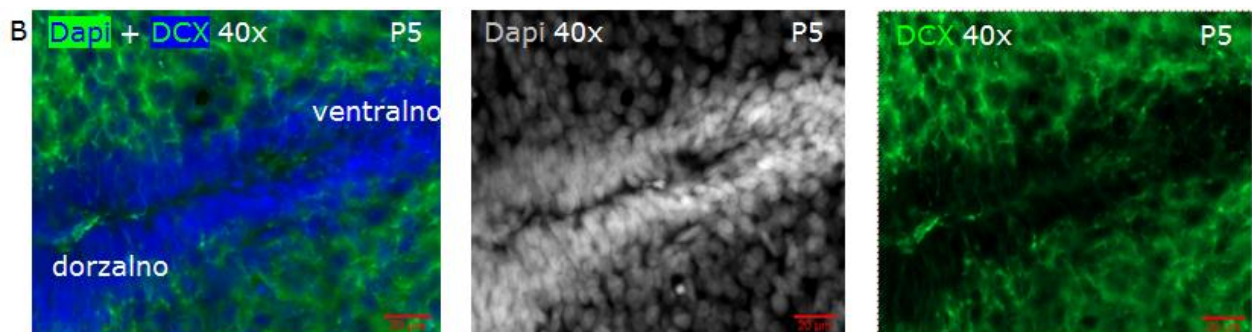
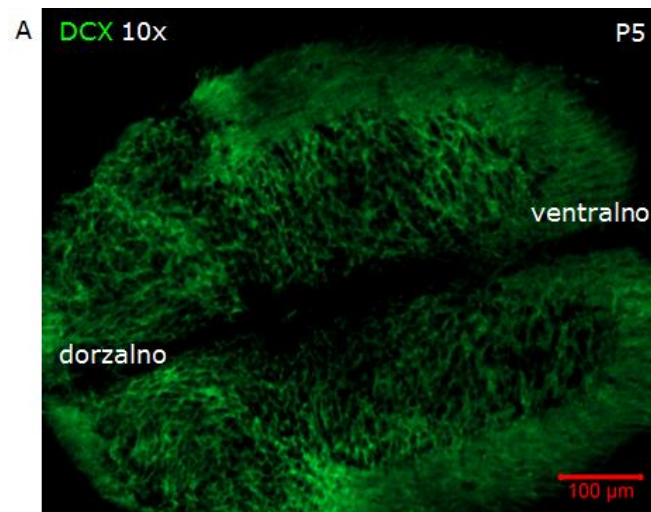
Slika 14. **Prisutnost ATF3 signala oko spinalnih krvnih žila oposuma.** A) Prikaz pojednostavljene skice poprečnog presjeka kapilare u mozgu, na kojem se vide periciti (PC, od engl. perycite) koji zajedno sa endotelijem i astrocitima tvore krvno-moždanu barijeru (KMB). Preuzeto od Bergers & Steven, (2005). B) Primjeri poprečnih prereza leđnih moždina P10 i P17 oposuma imunobojenih sa ATF3 protutijelom (zeleno), te povećane slike pozitivnih stanica krvnih žila. P10= postnatalni dan 10. P17= postnatalni dan 17. Mjerilo je 20 µm s povećanjem od 40x kod B.

4.8. ATF3 pozitivne endodimalne stanice nisu DCX pozitivne

Ispitali smo da li ATF3 pozitivne stanice imaju neka od obilježja mladih živčanih stanica. Koristili smo kao biljeg „doublecortin“ (DCX), protein koji je vezan za mikrotubule, te se nalazi u živčanim prekursorskim stanicama, te u mladim živčanim stanicama¹⁹.

U endodimalnoj zoni leđnih moždina 5 dana starog oposuma (P5), DCX imunobojanje nije dalo nikakav signal (slika 15A), iako je bio prisutan u okolnim područjima leđne moždine. Na slici koja pokazuje uvećanu endodimalnu zonu, vidljiv je izostanak DCX signala u stanicama koje okružuju središnji kanal (slika 15B). Intenzitet DCX signala je mjereno i analizirano u dorzalnom području leđne moždine 5 i 17 dana starih oposuma i dobivene su sljedeće vrijednosti: 4986,97

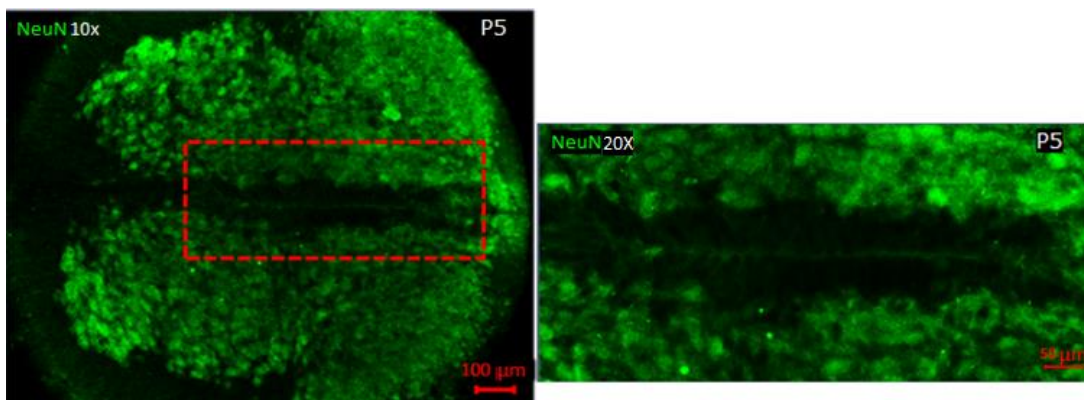
$\pm 642,43$ kod P5 oposuma, te $2395,18 \pm 245,43$ kod P17 oposuma. Podaci se statistički značajno razlikuju, $p=0,033$ ($p < 0,05$). Znači, intenzitet signala DCX opada kod razvijenijih oposuma (slika 15C).



Slika 15. **Ependimalne stanice nisu pozitivne na DCX.** A) Poprečni presjek leđne moždine P5 oposuma imunobojen sa DCX (zeleno). B) Ependimalna zona poprečnog prereza leđne moždine P5 oposuma obojena sa DCX-om (zeleno; desno). Lijevi dio prikazuje slike na kojima se vidi istovremeno DCX (zeleno) i DAPI (boja DNA, dakle jezgre svih stanica; plavo). Srednji dio prikazuje samo DAPI signal (bijelo). C) Histogram intenziteta DCX imunobojanja regije od interesa (dorzalni dio leđnih moždina) P5 i P17 oposuma. Dobiveni podaci se statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$; jednosmjerna analiza varijanci ili ANOVA i Tuckey HSD post-hoc test). P5= postnatalni dan 5. P17= postnatalni dan 17. AU = engl. arbitrary units. Mjerilo je 100 μm s povećanjem od 10x kod A, 20 μm povećanjem od 40x kod B.

4.9. ATF3 pozitivne ependimalne stanice nisu NeuN pozitivne

Na kraju, provjerili smo da li su ATF3 pozitivne ependimalne stanice pozitivne i na NeuN protein (Fox3 transkripcijski faktor koji je specifičan biljeg za zrele neurone)¹⁹. Kako smo i pretpostavili, ependimalna regija leđne moždine oposuma negativna je na NeuN, koji međutim vrlo intenzivno i specifično boji sivu tvar leđne moždine 5 dana starog oposuma (slika 16).



SLIKA 16. **NeuN imuno-bojanje leđne moždine 5 dana starog oposuma.** Poprečni prerez leđne moždine (30 μm) P5 oposuma imuno-obojen sa NeuN-om (zeleno) i uvećana slika ependimalne zone (crveni četverokut). P5= postnatalni dan 5. Mjerilo je 100 μm s povećanjem od 10x i 50 μm s povećanjem od 20X (desna slika).

5. RASPRAVA

U ependimalnoj regiji leđne moždine i u zidovima mikrovaskulature nalaze se niše živčanih matičnih / praroditeljskih stanica^{7,17,18}. Pokazalo se da ependimalne stanice imaju ulogu u usmjeravanju stanične migracije tijekom moždanog razvoja⁹, te da se aktiviraju nakon ozljede leđne moždine, s ciljem zaštite živčanih stanica od daljnjeg oštećenja i smrti.²⁰ Molekularni i stanični mehanizmi koji upravljaju regeneracijom živčanog tkiva nakon ozljede te kontroliraju aktivaciju matičnih stanica središnjeg živčanog sustava su još vrlo slabo poznati.^{19,22}

Životinjski model vrlo pogodan za istraživanje regeneracije leđne moždine je oposum, vrste *Monodelphis domestica*. Ovaj tobočar se rađa vrlo nerazvijen i ima mogućnost potpune funkcionalne regeneracije leđne moždine nakon ozljede,²⁶ što mu daje prednosti u odnosu na uobičajene životinjske modele poput štakora i miševa. Izolirano tkivo leđne moždine mladih oposuma može se održavati u kontroliranim *in vitro* uvjetima, što daje mogućnost istraživanja molekularnih čimbenika važnih za sposobnost regeneracije leđne moždine.⁵

U ovom radu promatrane su ependimalne stanice leđne moždine oposuma u razdoblju kada se sposobnost regeneracije gubi, a korištena je metoda imunobojanja specifičnim protutijelima. Jedan od analiziranih proteina bio je transkripcijski faktor ATF3, nedavno otkriveni biljeg za migrirajuće ependimalne stanice.¹⁹ Prijašnja istraživanja su pokazala da je ATF3 dinamički eksprimiran u matičnim stanicama leđne moždine štakora, pa se u fazi mirovanja ovih stanica nalazi u citoplazmi, dok se kod aktiviranih stanica nalazi u njihovoj jezgri.¹⁹ Željelo se otkriti ispoljava li se ATF3 i u matičnim ependimalnim stanicama oposuma, te je li dinamički eksprimiran kao kod štakora. Kod mlađih oposuma koji mogu u potpunosti funkcionalno regenerirati leđnu moždinu nakon ozljede, uočen je jak ATF3 signal u jezgrama ependimalnih stanicama, što po analogiji sa stanicama štakora, navodi na njihovu aktivnost. Za razliku od mladih životinja, kod starijih oposuma područje ependimalne zone nije pozitivno na ATF3. Ovi rezultati upućuju na to da bi aktivne spinalne ependimalne stanice mogle imati (važnu) ulogu u regeneraciji moždinskog tkiva nakon ozljede.

Stanice s pozitivnim ATF3 jezgrama su pozitivne na SOX2 i vimetin, koji su standardni biljezi matičnih stanica. Dakle, i kod oposuma, kao i kod štakora, endodermalna regija leđne moždine bi mogla biti izvor matičnih/praroditeljskih stanica, koje bi mogle imati važnu ulogu u regeneraciji živčanog tkiva. Pokazali smo da su ove matične stanice proliferativne, dakle aktivne, kod mladih životinja koje imaju sposobnost regeneracije moždinskog tkiva nakon ozljede. Pokazali smo da se broj matičnih i proliferirajućih stanica smanjuje tijekom razvoja oposuma, te da je različit u različito razvijenim dijelovima leđne moždine. Endodermalne matične stanice leđne moždine mladih oposuma ne pokazuju karakteristike živčanih stanica (ne ispoljavaju karakteristične neuronalne biljege kao što su DCX ili NeuN). Buduća istraživanja će pokazati da li se ove stanice diferenciraju u glija ili živčane stanice, te koji čimbenici takvu diferencijaciju određuju i kontroliraju.

Kod starijih oposuma, endodermalna regija nije pozitivna na ATF3, no signal je uočen u pojedinim stanicama mikrovaskulature, u području sive tvari. Te ATF3 pozitivne stanice vjerojatno su periciti, koji oblažu kapilare, tvoreći krvno moždanu barijeru¹⁷, a imaju neka od obilježja matičnih stanica³⁶. Buduća će istraživanja pokazati mogu li periciti biti izvor matičnih živčanih stanica u odraslih životinja, te mogu li pozitivno utjecati na ozljedu leđne moždine i regeneraciju tkiva.

Ovaj rad je početak istraživanja spinalnih endodermalnih matičnih stanica oposuma i njihove uloge u regeneraciji leđne moždine. Buduća će istraživanja pokazati koja je uloga ATF3 proteina u razvoju i aktivaciji matičnih stanica, te koliko on može biti ključan u procesu regeneracije živčanog tkiva. Ova otkrića mogla bi pomoći u razvoju strategija kojima bi se endodermalne matične stanice mogle koristiti u svrhu regenerativnog liječenja ozljeda leđnih moždina.

6. ZAKLJUČAK

Regeneracija ozljeđenog tkiva leđne moždine jedan je od izazova moderne neuroznanosti. Identifikacija matičnih/praroditeljskih stanica leđne moždine, te otkrivanje molekula i signalnih puteva koji kontroliraju njihovu aktivaciju, migraciju i diferencijaciju bit će ključni za razvoj strategija kojima će se pomoću ovih stanica nastojati regenerirati oštećeno moždinsko tkivo odraslih sisavaca nakon ozljede ili bolesti. Zanimljiv model u ovoj vrsti istraživanja je oposum, mali tobolčar koji se može održavati u laboratoriju, a koji je jedinstven po svojoj sposobnosti regeneracije leđne moždine nakon ozljede tijekom ranog postnatalnog razvoja. Otkrili smo da tek rođeni mladunci ove životinje imaju pregršt matičnih, proliferativnih stanica u ependimalnoj spinalnoj regiji, te da njihov broj opada odrastanjem životinje. Jezgre ependimalnih stanica pozitivne su na ATF3 transkripcijski faktor, čija uloga u aktivaciji matičnih stanica, te u regeneraciji živčanog tkiva tek treba biti otkrivena. Rezultati ovih istraživanja su osnova budućih studija u kojima će se nastojati okarakterizirati matične stanice leđne moždine, te otkriti koji su čimbenici odlučujući za prestanak sposobnosti regeneracije moždinskog tkiva nakon ozljede.

7. LITERATURA

1. Cregg, J. M. *et al.* Functional Regeneration Beyond the Glial Scar Jared. *Exp. Neurol.* 197–207 (2014). doi:10.1016
2. Chen, B. P., Liang, G., Whelan, J. & Hai, T. ATF3 and ATF3 delta Zip. Transcriptional repression versus activation by alternatively spliced isoforms. *J. Biol. Chem.* **269**, 15819–15826 (1994).
3. McDonough, A. & Martínez-Cerdeño, V. Endogenous proliferation after spinal cord injury in animal models. *Stem Cells Int.* (2012). doi:10.1155/2012/387513
4. Meletis, K. *et al.* Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol.* **6**, 1494–1507 (2008).
5. Mladinic, M., Muller, K. J. & Nicholls, J. G. Central nervous system regeneration: from leech to opossum. *J. Physiol.* **587**, 2775–2782 (2009).
6. Wheaton, B. J. *et al.* Weight-Bearing Locomotion in the Developing Opossum, *Monodelphis domestica* following Spinal Transection: Remodeling of Neuronal Circuits Caudal to Lesion. *PLoS One* **8**, (2013).
7. Mladinic, M. & Nistri, A. Dynamic expression of ATF3 as a novel tool to study activation and migration of endogenous spinal stem cells and their role in neural repair. *Neural Regen. Res.* **10**, 713 (2015).
8. Cord, S., Moslavac, S., For, H. & Rehabilitation, M. Functional skills after the rehabilitation of spinal cord injury patients : observation period of 3 years. (2015). doi:10.1038/sj.sc.3100465
9. Mark F Bear, Barry W Connors, M. A. P. in *Neuroscience: Exploring the brain* 86–88, 208, 211, 212 (Lippincott Williams & Wilkins, 2007).
10. Wintzer, M. *et al.* Strategies for identifying genes that play a role in spinal cord regeneration. *J. Anat.* **204**, 3–11 (2004).
11. Ferretti, P., Zhang, F. & O’Neill, P. Changes in spinal cord regenerative ability through phylogenesis and development: Lessons to be learnt. *Dev. Dyn.* **226**, 245–256 (2003).
12. Varga, Z. M., Schwab, M. E. & Nicholls, J. G. Myelin-associated neurite growth-inhibitory proteins and suppression of regeneration of immature mammalian spinal cord in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 10959–10963 (1995).

13. Kawano, H. *et al.* Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system. *Cell Tissue Res.* **349**, 169–180 (2012).
14. Tuszynski, M. H. & Steward, O. Concepts and methods for the study of axonal regeneration in the CNS. *Neuron* **74**, 777–791 (2012).
15. Faulkner, J. R. *et al.* Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J. Neurosci.* **24**, 2143–2155 (2004).
16. White, R. E. *et al.* Transforming Growth Factor Alpha (TGF α) Transforms Astrocytes to a Growth Supportive Phenotype after Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.* **19**, 15173–15187 (2011).
17. Bergers, G. & Song, S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro. Oncol.* **7**, 452–464 (2005).
18. Johansson, C. B. *et al.* Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* **96**, 25–34 (1999).
19. Mladinic, M., Bianchetti, E., Dekanic, A., Mazzone, G. L. & Nistri, A. ATF3 is a novel nuclear marker for migrating ependymal stem cells in the rat spinal cord. *Stem Cell Res.* **12**, 815–827 (2014).
20. Sabelstrom, H. *et al.* Resident Neural Stem Cells Restrict Tissue Damage and Neuronal Loss After Spinal Cord Injury in Mice. *Science (80-.)*. **342**, 637–640 (2013).
21. Barnabé-Heider, F. & Frisé, J. Stem cells for spinal cord repair. *Cell Stem Cell* **3**, 16–24 (2008).
22. Hugnot, J. The Spinal Cord Neural Stem Cell Niche. (2003).
23. Liu, K.-C. *et al.* The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis. *Cell. Signal.* **25**, 997–1003 (2013).
24. Chen, B. P., Wolfgang, C. D. & Hai, T. Analysis of ATF3, a transcription factor induced by physiological stresses and modulated by gadd153/Chop10. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1157–1168 (1996).
25. Samollow, P. B. The opossum genome: Insights and opportunities from an alternative mammal. *Genome Res.* **18**, 1199–1215 (2008).
26. Bartkowska, K., Gajerska, M., Turlejski, K. & Djavadian, R. L. Expression of TrkC Receptors in the Developing Brain of the Monodelphis opossum and Its Effect on the Development of Cortical Cells. *PLoS One* **8**, 1–14 (2013).

27. Wheaton, B. J., Callaway, J. K., Ek, C. J., Dziegielewska, K. M. & Saunders, N. R. Spontaneous development of full weight-supported stepping after complete spinal cord transection in the neonatal opossum, *Monodelphis domestica*. *PLoS One* **6**, (2011).
28. Mladinic, M. & Wintzer, M. Changes in mRNA content of developing opossum spinal cord at stages when regeneration can and cannot occur after injury. *Brain Res. Rev.* **40**, 317–324 (2002).
29. Klempin, F., Kronenberg, G., Cheung, G., Kettenmann, H. & Kempermann, G. Properties of Doublecortin-(DCX)-expressing cells in the piriform cortex compared to the neurogenic dentate gyrus of adult mice. *PLoS One* **6**, (2011).
30. Reiner, O. *et al.* The evolving doublecortin (DCX) superfamily. *BMC Genomics* **7**, 188 (2006).
31. Mullen, R. J., Buck, C. R. & Smith, a M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* **116**, 201–211 (1992).
32. Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P. & Pevny, L. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* **39**, 749–765 (2003).
33. Wang, X., Tsai, J.-W., LaMonica, B. & Kriegstein, A. R. A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex. *Nat. Neurosci.* **14**, 555–561 (2011).
34. Pekny, M. *et al.* Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. *J. Cell Biol.* **145**, 503–514 (1999).
35. Leuner, B., Glasper, E. R. & Gould, E. Thymidine analog methods for studies of adult neurogenesis are not equally sensitive. *J. Comp. Neurol.* **517**, 123–133 (2009).
36. Caplan, A. I. All MSCs Are Pericytes? *Cell Stem Cell* **3**, 229–230 (2008).

ZAHVALA

Zahvaljujem osoblju vivarija Sveučilišta u Trstu koje se brine o životinjama koje su se koristile u ovom radu. Pokusi su rađeni na Odjelu za biotehnologiju, Sveučilišta u Rijeci, u laboratoriju Odjela za molekularnu neurobiologiju pod vodstvom i mentorstvom izv.prof.dr.sc Mirande Mladinić Pejatović, a uz pomoć mag. biotech. in med. Nine Jurčić i mag. biol. mol. Ane Dekanić, kojima se zahvaljujem. Pokusi su financirani međunarodnim istraživačkim grantom CRP-ICGEB Research Grant Programme 2014 (MMP).

ŽIVOTOPIS

OSOBN E INFORMACIJE

Dominika Došen

📍 Krasica 80 a, 51224 Bakar (Hrvatska)

📞 +385 91 595 4921

✉ dominika_dosen@yahoo.com

Spol Žensko | Datum rođenja 13/02/1992 | Državljanstvo hrvatsko

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

10/2013–danas

Medicinska kemija

Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci
Ul. Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka (Hrvatska)
www.biotech.uniri.hr

fizikalno-organska i računska kemija, instrumentalne metode kemijske analize, kemometrija, koloidi, prijenos lijekova: načela i primjena, dizajn biološki aktivnih molekula računalnim metodama

14/05/2013–
27/06/2013

Ljetna škola (capture course) "Public health and pathophysiology"

Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci
Ul. Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka (Hrvatska)
www.biotech.uniri.hr

općeobrazovne vještine: engleski jezik

25/05/2013–

Stručna praksa u JGL farmaceutskoj kompaniji

07/06/2013

JADRAN-GALENSKI LABORATORIJ (JGL d.d.)

Svilno 20, 51000 Rijeka (Hrvatska)

proizvodnja

odjel polučvrstih oblika

10/2010–07/2013

Sveučilišna prvostupnica biotehnologije i istraživanja
lijekova

Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci

Ul. Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka (Hrvatska)

www.biotech.uniri.hr

stanična i molekularna biologija, kemija (analitička, opća,
bioanorganska, organska,), biokemija, farmakologija, medicinska
mikrobiologija, opća fiziologija i patofiziologija, imunologija,
kemoinformatika, opća toksikologija, osnove molekularne medicine

09/2006–05/2010

Srednja stručna sprema (opća gimnazija)

Prva riječka hrvatska gimnazija

Ul. Frana Kurelca 1, 51000 Rijeka (Hrvatska)

www.gimnazija-prva-hrvatska-ri.skole.hr

opći smjer

OSOBNÉ

VJEŠTINE

Materinski jezik

hrvatski

Ostali jezici

RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	

engleski	B2	B2	B1	B1	B1
talijanski	A2	A2	A2	A2	A1

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik

Zajednički europski referentni okvir za jezike

Komunikacijske vještine Dobre komunikacijske vještine dobivene tijekom srednjoškolskog obrazovanja i sveučilišnog studija

Poslovne vještine mikroskopiranje, imunofluorescentno bojanje

Digitalna kompetencija

SAMOPROCJENA

Informati on processing	Communi cation	Content creation	Safety	Problem solving
Samostalni korisnik	Samostalni korisnik		Samostalni korisnik	

Digitalne vještine - Ljestvica za samoprocjenu

Razumijevanje i korištenje osnovnih računalnih vještina:

- paket Microsoft Office: Word, Excel, PowerPoint Presentation
- Statistički program: Statistica 12 i MedCalc
- programski paketi za računalno modeliranje dizajna lijekova i enzimatske kinetike: PyMol, Avogadro, MarvinSketch, Tenua

Vozačka
dozvola B

DODATNE
INFORMACIJE

Seminar 21.6. 2012.: Sudjelovanje na SLING (ServingLife-science Information for the Next Generation) konferenciji, seminar "Information sources in Biotechnology", Sveučilišteu Rijeci, Hrvatska

Stipendija 2012-2015: stipendija grada Bakra