

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Mirela Tinjić

6425/N

**PROLIFERACIJA NEURALNIH MATIČNIH STANICA U
HIDROGELOVIMA**

ZAVRŠNI RAD

Modul: Imunologija za nutricioniste

Mentor: izv. prof. dr. sc. Lidija Šver

Zagreb, 2015.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za matične stanice i Laboratoriju za neurogenetiku i razvojnu genetiku pri Hrvatskom institutu za istraživanje mozga na Medicinskom fakultetu u Zagrebu, u sklopu Glowbrain projekta, financiranog od strane Europske komisije.

Zahvaljujem voditelju projekta, dr.sc. Srećku Gajoviću, na ukazanoj prilici da budem dio *Glowbraina*.

Zahvaljujem dr.sc. Mariji Lovrić koja je osmislila ovaj rad te pomogla pri izradi svojim znanstvenim i stručnim savjetima.

Zahvaljujem dr.sc. Lejli Ferhatović Hamzić na pomoći i strpljenju prilikom rada u laboratoriju.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

PROLIFERACIJA NEURALNIH MATIČNIH STANICA U HIDROGELOVIMA

Mirela Tinjić, 6425/N

Sažetak: Matične stanice su trenutno glavna nada za oporavak i obnovu ozljeđenog tkiva mozga. Vrsta matičnih stanica kojima se daje prednost kod ozljeda mozga su neuralne matične stanice. Proučavanje i shvaćanje interakcija između neuralnih matičnih stanica i biomaterijala može unaprijediti opstanak i prožimanje sa ozljeđenim ili oboljelim predjelima središnjeg živčanog sustava. Zbog svoje biokompatibilnosti, hidrofilnog karaktera i mehaničkih svojstava te strukturalne raznolikosti, hidrogelovi se često koriste za regeneraciju živčanog tkiva. Cilj ovoga rada bio je utvrditi da li se metakrilirana gelan guma (MGG) može koristiti kao dobar hidrogelni nosač neuralnih matičnih stanica, što bi joj omogućilo niz primjena u neuroznanosti. Kako bismo to provjerili, uklopili smo mišje neuralne stanice u hidrogelove gelan gume i izmjerili stupanj umnažanja (proliferacije) stanica dva dana nakon uklapanja. Varijacije u preživljenju i drastično opadanje broja stanica je pokazalo da 1%-tni MGG nije pogodan za neuralne matične stanice.

Ključne riječi: matične stanice, neuralne matične stanice, hidrogel, metakrilirana gelan guma

Rad sadrži: 23 stranica, 10 slika, 36 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica

Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *Izv. prof. dr .sc. Lidija Šver*

Rad predan: rujan, 2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Nutrition
Department of Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

PROLIFERATION OF NEURAL STEM CELLS IN HIDROGELL

Mirela Tinjić, 6425/N

Abstract: Stem cells are currently the main hope for recovery and reconstruction of injured brain tissue. Type of stem cells preferable in brain injury are neural stem cells. The study and understanding of the interactions between neural stem cells and biomaterials can improve survival and fusion with injured or diseased areas of the central nervous system. Because of its biocompatibility, the hydrophilic character, the mechanical properties and structural diversity, hydrogels are widely used for regeneration of nerve tissue. The aim of this research is to examine whether methacrylated gellan gum (MGG) can be used as a good hydrogel carrier of neural stem cells, which would provide a range of possibilities of applications in neuroscience. To test this, we match mice neural cells in hydrogel gellan gum and measure the degree of multiplication (proliferation) cells five days after switching. Variations in survival and declining cells showed that 1% MGG is not suitable for neural stem cells.

Keywords: stem cells, nural stem cells, hydrogel, methacrylated gellan gum

Thesis contains: 23 pages, 10 figure, 36 references

Original in: Croatian

Final work inprintedand electronic (pdf format) version is depositedin: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *PhD. Lidija Šver*, Associate Professor

Thesis delivered: September, 2015

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Matične stanice	2
2.1.1. Matične stanice prema mogućnostima promjene.....	2
2.1.2. Matične stanice prema podrijetlu.....	3
2.1.3. Istraživanja na životinjama	4
2.1.4. Terapeutska upotreba ljudskih matičnih stanica	5
2.2. Neuralne matične stanice	5
2.2.1. Pluripotentnost neuralnih matičnih stanica.....	6
2.2.2. Neurogeneza	7
2.3. Biomaterijali u tkivnom inženjerstvu	8
2.3.1. Hidrogelovi	9
2.3.2. Metakrilirana gelan guma (MGG)	10
2.4. MTS tetrazol test.....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. Materijali.....	13
3.2. Metode rada	13
3.2.1. Izolacija i seciranje moždanog tkiva miša	13
3.2.2. Odvajanje neuralnih matičnih stanica i nasađivanje na hranjivu podlogu.....	14
3.2.3. Pasaža embrionalnih neurosfera	14
3.2.4. Uklapanje stanica u hidrogel.....	15
3.2.5. Statistika.....	15
4. REZULTATI.....	16
5. RASPRAVA	18
6. ZAKLJUČAK.....	19
7. LITERATURA	20

1. UVOD

Moždani udar je glavni uzrok oduzetosti kod odraslih (Lloyd-Jones i sur., 2009). Prema svjetskoj organizaciji za moždani udar (engl. *World Stroke Organization*, WSO,) prosječno 15 milijuna ljudi diljem svijeta svake godine doživi moždani udar (Mackayn i Mensah, 2004; WSO, 2012). Do sada ne postoji učinkovit tretman za obnovu mozga nakon ovakve vrste ozljede (Shenglian i sur., 2013).

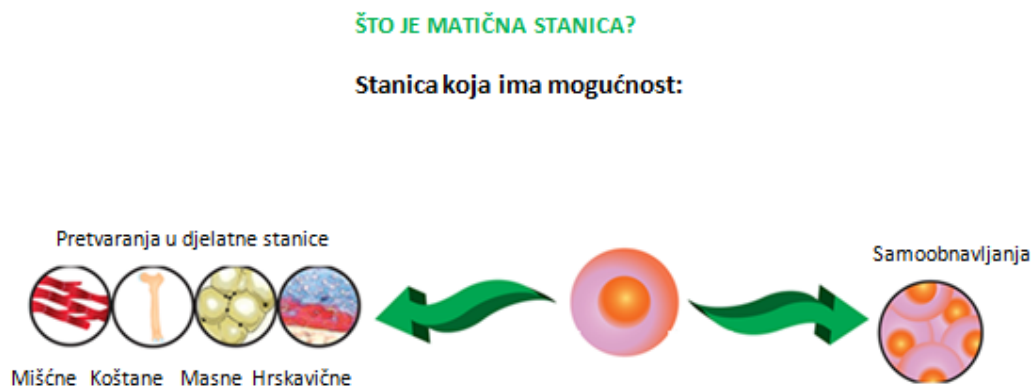
Razumijevanje građe mozga zasnivalo se na tradicionalnom stavu da u mozgu nakon rođenja ne nastaju nove živčane stanice te da je njihov gubitak tijekom života trajan i nenadomjestiv. Nakon spoznaje da u odraslom mozgu nastaju nove živčane stanice, koje se uključuju u djelovanje mozga, otvaraju se novi terapijski pristupi (Gajović, 2012). Matične stanice su trenutno glavna nada za oporavak i obnovu ozljeđenog tkiva mozga, ali potrebno je još mnogo istraživanja kako bi se pokazao njihov dugoročni učinak (Zhang i sur., 2013). Vrsta matičnih stanica kojima se daje prednost kod ozljeda mozga su neuralne matične stanice zbog svojih posebnih svojstava. Poznato je da biopodudarni biomaterijali imaju važnu ulogu u preživljenju i množenju transplatiranih matičnih stanica pružajući mehaničku podršku (Hwang i sur., 2014). Proučavanje interakcija između neuralnih matičnih stanica i biomaterijala može unaprijediti naše shvaćanje njihove samoobnove i svojstva diferencijacije kako bi se mogao osmisliti biološki sustav koji bi pružio učinkovitu ugradnju, opstanak i prožimanje s ozljeđenim ili oboljelim predjelima središnjeg živčanog sustava (Discher i sur., 2009).

Cilj ovoga rada bio je provjeriti da li se metakrilirana gelan guma može koristiti kao dobar hidrogelni nosač neuralnih matičnih stanica što bi joj omogućilo niz primjena u neuroznanosti. Kako bismo to provjerili, uklopili smo mišje neuralne stanice u hidrogelove gelan gume i izmjerili stupanj umnažanja (proliferacije) stanica dva dana nakon uklapanja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Matične stanice

Čovjek svakodnevno gubi veliki broj različitih stanica koje moraju biti nadoknađene novima. U slučaju ozljede ili bolesti, potreba za novim stanicama je još više izražena. Dvije su mogućnosti obnove: dioba susjednih stanica koje su obavljale istu funkciju kao izgubljene stanice ili, češće, naše tijelo koristi stanice koje još nisu imale svoju ulogu, nediferenciranim stanicama koje, obzirom na današnje spoznaje, nazivamo matičnim stanicama.



Slika 1. Svojstva matičnih stanica (TSAOG, 2015)

Matične stanice posjeduju dva vrlo bitna svojstva: prvo je da one same ne vrše nikakvu djelatnu ulogu u organizmu, ali imaju sposobnost pretvoriti se (diferencirati) u djelatne stanice (npr. koštane stanice, masne stanice i mišićne stanice). Drugo svojstvo matičnih stanica je sposobnost samoobnavljanja, tj. stvaranja novih matičnih stanica koje se mogu koristiti u slučaju potrebe (Gajović, 2009). Matične stanice nužne su za normalno funkcioniranje odrasle osobe. Neke od njih se dijele brže jer je i potreba za njima veća (npr. krvotvorne matične stanice), dok druge miruju u tkivu i bit će potaknute na diferencijaciju samo po potrebi (npr. satelitske stanice u mišićnom tkivu). Pretvaranje obuhvaća niz promjena u kojima stanica postupno dobiva svoj identitet, prilagođava svoju građu i konačno počinje izvršavati svoju djelatnu ulogu (Slika 1).

2.1.1. Matične stanice prema mogućnostima promjene

Prema mogućnosti promjene, matične stanice dijelimo na:

Unipotentne prastanice (progenitorne matične stanice) imaju mogućnost prijeći samo u jednu vrstu stanica (npr. spermatogonalne stanice koje rezultiraju samo spermijima).

Multipotentne matične stanice se mogu diferencirati u stanice različitih tkiva (npr. neuralne matične stanice, matične stanice kože, krvotvorne stanice i druge).

Pluripotentne matične stanice su stanice iz kojih mogu nastati svi tipovi stanica zametnih listića (ektoderma, mezoderma i endoderma).

Totipotentne matične stanice se mogu diferencirati u sve tipove stanice, uključujući embrionalne stanice. One predstavljaju (sve)mogući izbor bilo kojih stanica koje bi bile potrebne našem tijelu.

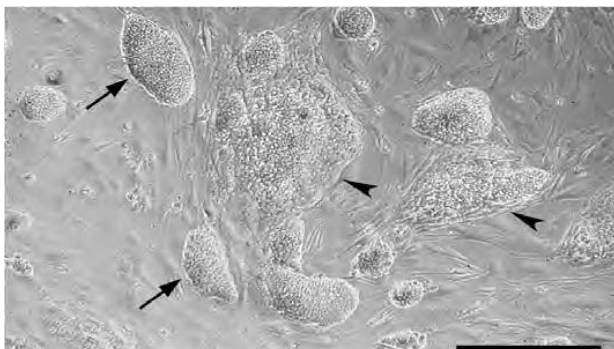
2.1.2. Matične stanice prema podrijetlu

Matične stanice se, također mogu podijeliti i prema podrijetlu, a jedna od podjela jest na adultne matične stanice i matične stanice fetalnog te embrionalnog podrijetla.

Adultne matične stanice se nazivaju još i somatske matične stanice, a nalaze se u tijelu odraslih. Adultne matične stanice mogu tvoriti različita tkiva jetre, kosti, gušterače. Na primjer, iz koštane srži se izoliraju hematopoetske matične stanice.

Matične stanice fetalnog podrijetla su stanice koje se izoliraju iz krvi pupkovine, ili iz samog ploda nakon pobačaja.

Matične stanice embrionalnog podrijetla se nazivaju još i embrionalne matične stanice (Slika 2). Pluripotentne matične stanice se izoliraju iz embrija u fazi blastociste, te se potom uzgajaju u kulturi stanica (Van Assche, 2002).



Slika 2. Mišje embrionalne matične stanice u kulturi. Strelice pokazuju nakupine nediferenciranih stanica, a glave strelica diferencirane stanice. Mjerna crta je 100 μm . (Gajović, 2009)

Matične stanice iz koštane srži sada spadaju u zastarjeli način liječenja teških bolesti. One su već prošle proces starenja i samim tim imaju manju sposobnost diferencijacije, a i veliki nedostatak im je što njihova nabava uključuje bolnu operaciju. S druge strane, matične stanice iz krvi pupkovine omogućuju bezbolnu primjenu te imaju veću mogućnost pretvaranja. Zadnjih godina raste broj banaka matičnih stanica čija je uloga pohranjivanje matičnih stanica iz krvi pupkovine za moguće korištenje pri liječenju pacijenta u budućnosti. Adultne matične stanice se mogu diferencirati u različite vrste tkiva kao i embrionalne stanice, ali embrionalne matične stanice se i brže razmnožavaju (Korica, 2015).

2.1.3. Istraživanja na životinjama

Zanimljivo je da su embrionalne matične stanice dobivene isključivo od zametaka sisavaca dok su pokusi na pticama i ribama bili samo djelomično uspješni. Prve su takve stanice bile iz zametka miša, potom štakora, hrčka, zeca, svinje, ovce, krave, konja i majmuna, a također i čovjeka.

Znanstvena primjena embrionalnih matičnih stanica vrlo je važna u eksperimentima kojima želimo unijeti genske preinake u genom stanica u kulturi. Od genetski promijenjenih embrionalnih matičnih stanica možemo stvoriti novu generaciju eksperimentalnih životinja (u većini slučajeva su to miševi) koje su nositelji unesene genske preinake. Osnovna je genska preinaka ona koja dovodi do onemogućavanja gena (engl. *loss of function, knock-out*). Njen rezultat je miš kojemu nedostaje bjelančevina koju proučavamo.

Takvi miševi razvijaju određene posljedice koje se ogledaju u promjeni njihovog fenotipa, te proučavanjem ovih posljedica zaključujemo što bjelančevina koja nedostaje čini u mišu, odnosno dobivamo uvid u ulogu onemogućenog gena (Gajović, 2009).

2.1.4. Terapeutska upotreba ljudskih matičnih stanica

Adultne krvotvorne matične stanice se dobivaju iz koštane srži donora ili od samih bolesnika (prije kemoterapije). Mogu se izolirati i iz krvi, ukoliko je tome prethodio tretman poticanja prolaska stanica iz koštane srži u krv. Krvotvorne fetalne matične stanice se izoliraju iz pupkovine, odmah nakon rođenja. Ukoliko nisu potrebne, mogu se pohraniti u banku krvi pupkovine.

Neuralne matične stanice iz ljudskog fetusa pokazuju terapijski učinak. Najveći nedostatak predstavlja upravo etičko pitanje njihove nabave (Van Assche, 2002).

Grana regenerativne medicine jedna je od najbrže rastućih grana medicine u 21. stoljeću. Sposobnost matičnih stanica da pomognu pri obnavljanju drugih stanica i tkiva otkrivena je nedavno, što pruža nove mogućnosti u liječenju mnogih bolesti, kao što su moždani udar, Alzheimerova bolest te tumora različitih vrsta. Danas se matičnim stanicama iz pupkovine pacijenta već liječe leukemija, mijeloproliferativna bolest, dijabetes, trisomija, Ulrich-Turnerov sindrom i druge bolesti (Korica, 2015).

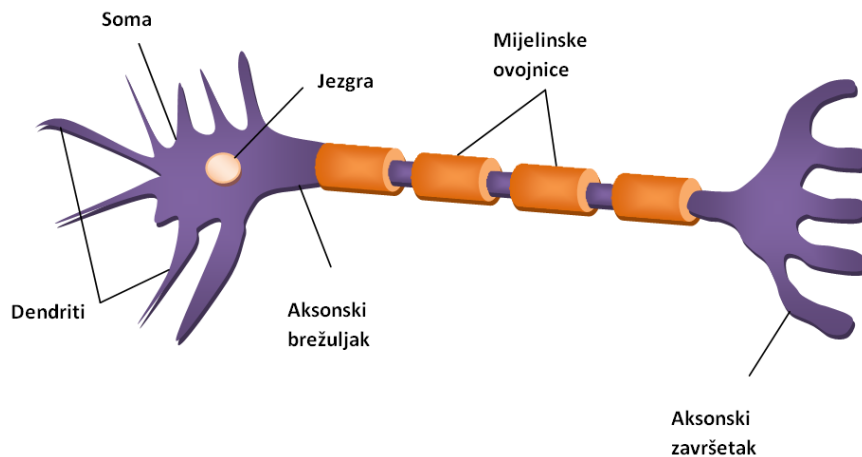
2.2. Neuralne matične stanice

Dugi niz godina se vjerovalo da je mozak statični organ čije se stanice ne mogu regenerirati nakon ozljede ili bolesti. No, novija istraživanja su dokazala regenerativni potencijal neuralnih matičnih stanica (NMS) u nizu eksperimentalno izazvanih ozljeda živčanog tkiva. Ovi pozitivni rezultati su dali nadu da će se u skoroj budućnosti ozljeda živčanog tkiva moći sanirati obnovom uz pomoć neuralnih matičnih stanica. Mala populacija matičnih stanica nađena je u i hipokampusu odraslih ljudi. Njihova funkcija još uvijek nije razjašnjena, no slična populacija stanica kod životinja ima važnu ulogu u postnatalnom rastu i obnovi živčanog tkiva od ozljeda, anoksije ili bolesti (English i sur., 2013).

2.2.1. Pluripotencija neuralnih matičnih stanica

Neuralne matične stanice su prvi izbor među matičnim stanicama, u slučajevima kada je potrebna obnova živčanog tkiva i to zbog mogućnosti razvitka u sve vrste odraslih neuralnih stanica: živčane stanice (neurone), oligodendrocite i astrocite (Kennea i Mehmet, 2002). Weiss i suradnici (1996) su pokazali da te stanice imaju mogućnost razmnožavati se *in vitro*.

Živčane stanice su strukturalna i funkcionalna jedinica živčanog sustava. To su specijalizirane stanice koje imaju jedinstvenu sposobnost stvaranja i provođenja električnih impulsa. Živčane stanice međusobno komuniciraju na mjestima gdje se dodiruju, ta mjesta nazivamo sinapse (FitzGerald i Folan-Curran, 2002). Neuroni vrše kontrolu ponašanja djelujući pojedinačno ili, češće, zajednički kao neuronske mreže koje su povezane u specijalizirane funkcionalne sustave. Općenito, sustavi nastaju kada skupine neurona ili neuronskih mreža sudjeluju u kontroli određenog oblika ponašanja. Živčana stanica se sastoji od tijela živčane stanice (soma), dendrita, aksona i presinaptičkih aksonskih završetaka (Slika 3) (Demarin i Trkanjec, 2008).

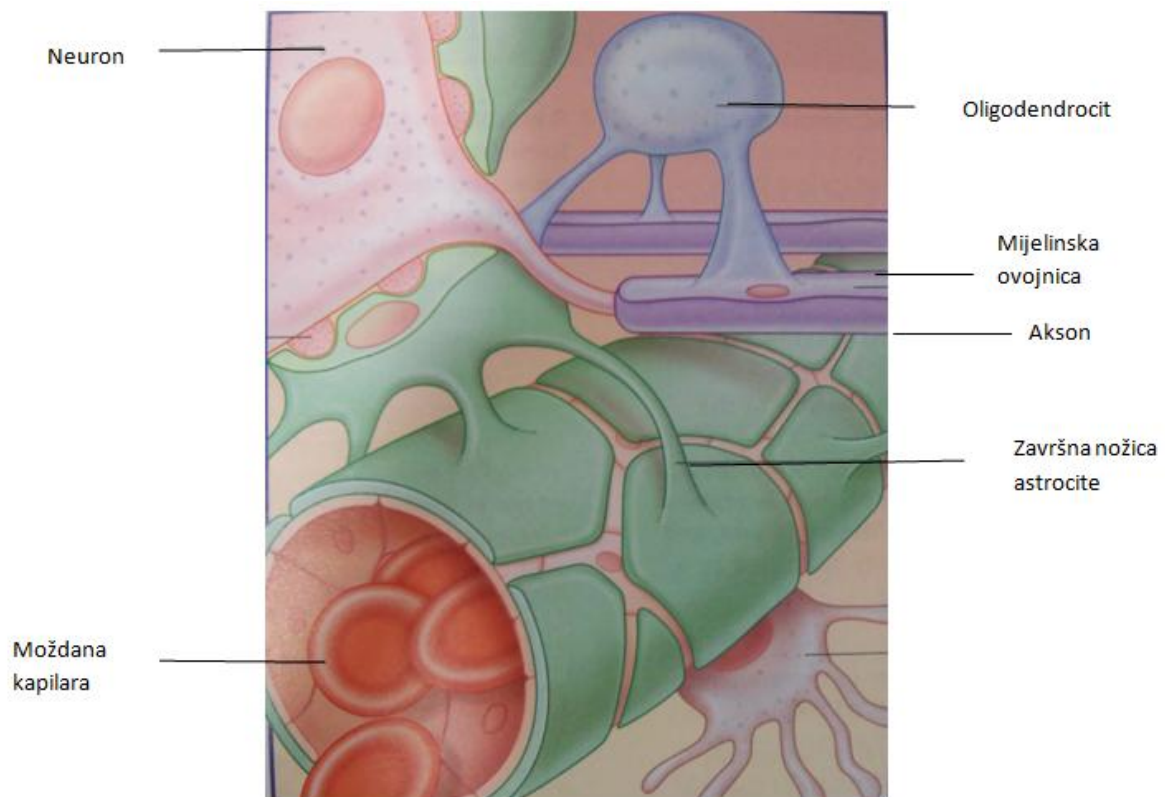


Slika 3. Građa živčane stanice (Runichoue, 2014)

Oligodendrociti su zaduženi za stvaranje mijelinskih ovojnica oko aksona u bijeloj masi mozga. U sivoj masi, one stvaraju satelitske stanice koje sudjeluju u izmjeni iona sa živčanim stanicama (FitzGerald i Folan-Curran, 2002).

Astrociti imaju važnu ulogu u održavanju homeostaze iona i pH vrijednosti izvanstanične tekućine, a završnim nožicama svojih protoplazmatskih izdanaka okružuju moždane kapilare

(Slika 4). Na taj način čine dio krvno-moždane barijere te sudjeluju u prijenosu tvari između kapilara i neurona. Nakon ozljede, astrociti se pretvaraju u reaktivnu gliju i na mjestu ozljede stvaraju glijalni ožiljak (Demarin i Trkanjec, 2008).



Slika 4. Astrociti sudjeluju u stvaranju krv – mozak barijere (FitzGerald i Folan-Curran, 2002)

2.2.2. Neurogeneza

Neurogeneza je postupak stvaranja novih neurona iz neuralnih matičnih stanica. Vjeruje se da je postupak neurogeneze, pod normalnim fiziološkim uvjetima, veoma ograničen.

Nekoliko unutarnjih i vanjskih faktora reguliraju rad neuralnih matičnih stanica, kao i njihove različite faze razvitka. Ti faktori sadrže signalne molekule (npr. koštani morfogenetski protein), neurotrofne faktore i faktore rasta (npr. neurotrofni moždani faktor (BDNF), epidermalni faktor rasta – EGF) i neurotransmitere (npr. γ -aminomaslačna kiselina, (engl. *γ -aminobutyric acid*; GABA)).

Bitnu ulogu u razvoju neurona igraju i astrociti. Specijalna vrsta zvjezdolikih astrocita se dijeli asimetrično, stvarajući jednu stanicu nalik sebi i jednu stanicu, zvanu pratilac stanica s ograničenim potencijalom samoobnavljanja (engl. *transient amplifying cell*). One se dijele brzo, diferenciraju se u neuroblaste i migriraju na svoje konačne destinacije u središnjem živčanom sustavu dok su još u fazi diferencijacije. Kada stignu na svoje odredište, iz

neuroblasta nastaju neuroni. U odraslom središnjem živčanom sustavu, novonastali neuroni se integriraju u postojeću strukturu mozga te tako održavaju plastičnost mozga.

Bitno je znati da različiti stimulansi fiziološke ili patološke naravi mogu djelovati na proces neurogeneze, pojačavajući ili potiskivajući stvaranje novih neurona kod odraslog pacijenta.

Različita patološka stanja poput moždanog udara i neurodegenerativnih bolesti mogu utjecati na neurogenezu u mozgu odraslog pojedinca.

Matične stanice i prethodnici neurona u stanju su reagirati na takva patološka stanja te povećati proliferaciju i stvaranje novih neurona koji kasnije okruže pogođeno područje. Spontani odgovor odraslog mozga ukazuje na postojanje regenerativnog potencijala mozga, ali neuralne matične stanice koje se nalaze u odraslom čovjeku nisu u stanju same izazvati potpunu neuroregeneraciju (Korica, 2015).

Tretman matičnim stanicama kod bolesti središnjeg živčanog sustava je izazov iz razloga što krvno-moždana barijera ograničava difuziju NMS u mozak. Stoga je isključena opcija tretiranja bolesnika tradicionalnim oralnim ili intravenoznim putem. Nadalje, lezija mozga ne može pružiti pogodan mikrookoliš za obnovu i rast NMS zbog upale, nastanka glijalnog ožiljka, otpuštanja inhibicijskih molekula i odsustva ranije spomenute vrste astrocita, stanica pratilaca (Parr i sur., 2007). Stoga je jedan od načina razviti unaprijeđen biomaterijal, koji će biti pogodan za rast novih stanica, na neki način oponašati prirodne niše, podržavati rast NMS, ali bez neželjenih diferencijacija u pogrešnom smjeru i gubitka „matičnosti“ (Shenglian i sur., 2013).

2.3. Biomaterijali u tkivnom inženjerstvu

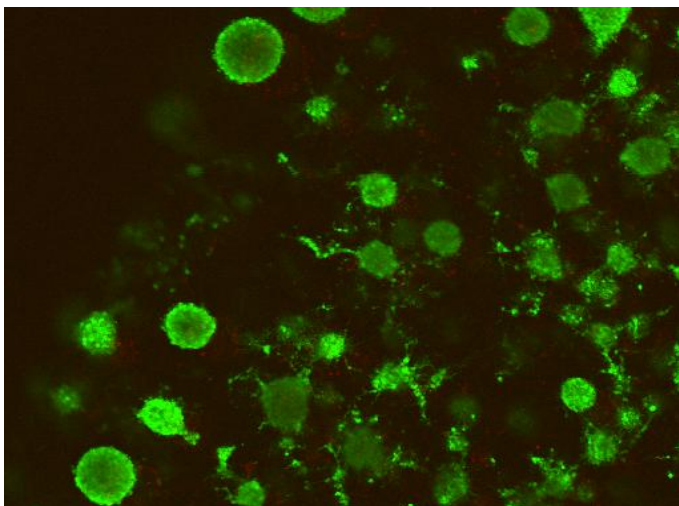
Tkivno inženjerstvo je interdisciplinarno znanstveno područje koje obuhvaća područje stanične biologije, medicine, biomaterijala i bioinženjerstva. Tkiva nastala kombiniranjem stanica i biomaterijala otvaraju nove terapijske mogućnosti u području transplantacijske medicine. Najveći znanstveni napredak napravljen je u području izrade umjetnih kostiju, hrskavice i kože. Matične stanice se sve češće koriste u ove svrhe zbog njihove sposobnosti diferenciranja u višestaničnu organiziranu strukturu nalik tkivu.

Brojni biomaterijali su korišteni u središnjem živčanom sustavu (Gnavi i sur., 2013; Tam i sur., 2014; Zhang i sur., 2014). Za pojedine medicinske svrhe je važno da biomaterijali ostanu stabilni u dužem vremenskom periodu (na primjer za izradu elektroda) (Ordóñez i sur., 2012). S druge strane, u području tkivnog inženjerstva (Silva i sur., 2012) biomaterijali se moraju razgraditi nakon što ispune svoju prvotnu svrhu.

2.3.1. Hidrogelovi

Hidrogelovi imaju visok postotak vode (> 90%) zbog svog hidrofilnog karaktera, što ih čini pogodnim za korištenje u tkivnom inženjerstvu. Hidrogelovi mogu biti fleksibilni kao meka tkiva, kruti kao hrskavica ili kost, ili elastični kao koža i krvne žile. S obzirom na podrijetlo, hidrogelove dijelimo na prirodne i sintetičke. Sintetički hidrogelovi se za razliku od prirodnih, mogu izraditi tako da precizno imitiraju mehaničke karakteristike izvanstaničnog matriksa. Njihova je prednost u tome što im se polimerizacija, degradacija i biokompatibilnost mogu precizno kontrolirati, što uvelike utječe na smanjenje varijabilnosti među *in vitro* istraživanjima i smanjuje potencijalnu imunoreakciju prilikom korištenja u mozgu. Nadalje, u porama sintetičkih hidrogelova mogu se uklopiti stanice, lijekovi ili drugi terapijski agensi (Aurand i sur., 2012).

Tkivno inženjerstvo u području neuroznanosti predstavlja poseban izazov zbog kompleksnosti i osjetljivosti živčanog tkiva. Hidrogelovi su zbog svojih pogodnih fizikalno-kemijskih svojstava i biokompatibilnosti često prvi odabir među brojnim biomaterijalima za korištenje u neuroznanosti. Ugradnjom stanica, lijekova i/ili bioaktivnih tvari u hidrogelove, znanstvenici se mogu približiti svom konačnom cilju - izradi tkiva *ex vivo* ili *in situ* za oporavak mozga. Ti višekomponentni sustavi mogu biti izvedeni tako da vode ka direktnoj staničnoj diferencijaciji (Slika 5) i vaskularizaciji unutar gela i formiranju kompozitnih neuralnih tkiva (Aurand i sur., 2012).

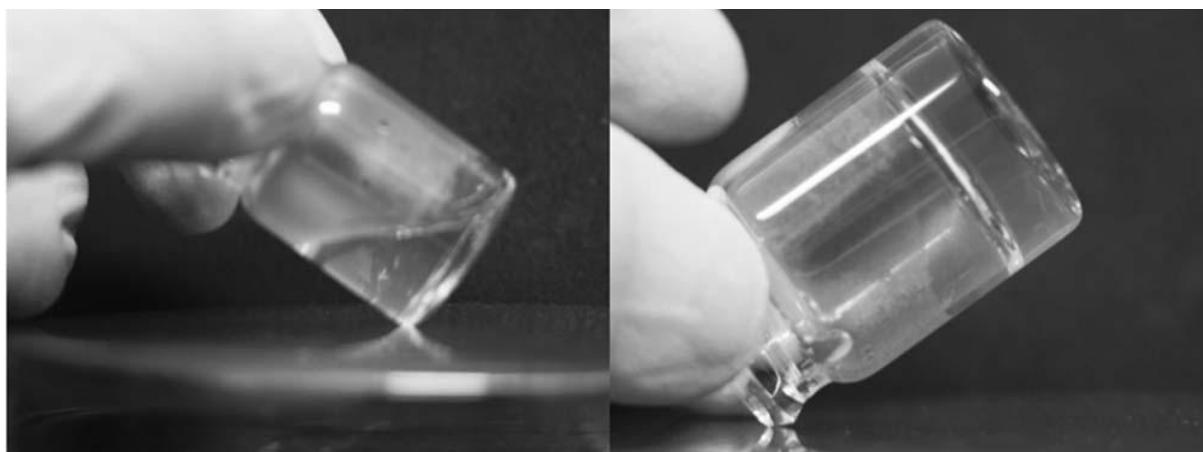


Slika 5. Sfere mišjih neuralnih matičnih stanica u alginatnom hidrogelu, aksonalni izdanci koji se pružaju van sfera su vidljivi nakon 10 dana *in vitro* uzgoja (Ljubaznošću Ferhatović Hamzić, 2013).

Hidrogelovi pružaju odgovarajuću trodimenzionalnu mrežu za transplantirane stanice ili bioaktivne tvari, te mogu regulirati njihovo ponašanje i povećati njihov neuroprotektivni potencijal. Nadalje, hidrogelovi mogu pružiti stromalnu potporu unutar šupljina u živčanom tkivu nastalih nakon ozljeda i mogu pojačati sposobnost matičnih stanica da obnove strukturu i funkcionalnost živčanog tkiva. Zbog svoje biokompatibilnosti, hidrofilnog karaktera i mehaničkih svojstava (niskih mikromehaničkih modula) i strukturalne raznolikosti, hidrogelovi se često koriste za regeneraciju živčanog tkiva (Aurand i sur., 2012; Hynd i sur., 2007). Otopine injektirane u mozak nakon moždanog udara trenutno stvaraju *in situ* trodimenzionalne hidrogelove pri fiziološkim temperaturama. Transplantacija ljudskih ili štakorskih neuralnih matičnih stanica suspendiranih u hidrogelovima rezultira ravnomjerno distribuiranim stanicama unutar moždane lezije, neuronalnom diferencijacijom i poboljšanim histološkim rezultatima (Bible i sur., 2012; Cheng i sur., 2013; Jin i sur., 2010). Izvanstanični matriks izrađen od hijaluronske kiseline pruža makroskopsku arhitekturu i potporu za razvoj neuralnih matičnih stanica, njihovu migraciju i diferencijaciju (Quirico-Santos i sur., 2010).

2.3.2. Metakrilirana gelan guma (MGG)

Gelan guma je polisakarid koji se dobiva mikrobnom fermentacijom bakterije *Sphingomonas paucimobilis*. Često se koristi u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji kao zgušnjivač, emulgator i stabilizator jer povećava viskoznost otopina kojima se dodaje (Terry, 2014). Topiva je u vodi, a kada se zagrije u smjesi s monovalentnim i divalentnim kationima, formira gel tijekom hlađenja pod blagim uvjetima (Slika 6).



Slika 6. Pretvorba sol-gel u otopini gelan gume koja sadrži kalcijev klorid (slika lijevo- prije geliranja, slika desno- nakon geliranja) (Oliveira i sur., 2010)

Iako gelan guma daje relativno stabilne gelove, potrebno je poboljšati njihovu mehaničku funkcionalnost i dugotrajnost prilikom korištenja u medicinske svrhe. Jedna od kemijskih preinaka koje se mogu koristiti u svrhu poboljšanja svojstava gelan gume je metakrilacija. Hidrogelovi metakrilirane gelan gume prvi su put proizvedeni u grupi profesora Rui Reisa metakrilacijom kratkolančane gelan gume (Silva-Correia i sur., 2010). Ova kemijska modifikacija gelan gume otvara mogućnost kontroliranja ulaska endotelnih stanica i urastanja krvnih žila u gel i poboljšava mehanička svojstva hidrogela (Silva-Correia i sur., 2011). Nadalje, ovakav hidrogel se može *in situ* gelirati u vrlo kratkom vremenskom intervalu (nekoliko minuta) (Silva-Correia i sur., 2010). Metakriliranjem gelan gume pri različitim reakcijskim uvjetima i upotrebom različitih strategija geliranja moguće je podesiti stupanj umreženosti hidrogela i samim time utjecati na važna mehanička svojstva hidrogela kao što su profil degradacije i kapacitet bubrenja. Kompaktnija mikrostruktura metakrilirane gelan gume se pokazala efikasnijom kod regeneracije nukleusa pulpozusa u usporedbi s običnom gelan gumom (Silva-Correia i sur., 2012). Dakle, optimiranjem eksperimentalnih uvjeta možemo utjecati na konačna svojstva hidrogelova kako bismo se čim više približili funkcionalnim svojstvima tkiva koje želimo regenerirati. Daljnja istraživanja koja su proveli članovi istraživačkog tima Rui Reisa pokazala su da stupanj metakrilacije gelan gume koji oni koriste nije otrovan za stanice, konačno dobiveni materijal je biokompatibilan budući da ne prouzrokuje nikakve štetne posljedice u *in vitro* i *in vivo* sustavima (Silva-Correia i sur., 2013).

Ponukani pozitivnim rezultatima prethodnih istraživanja, Reis i suradnici (Silva-Correia i sur., 2012; 2013) odlučili su provjeriti može li gelan guma poslužiti kao dobar nosač matičnih stanica u svrhu regeneracije živčanog tkiva. Njihov prvi pokušaj korištenja gelan gume u području neuroznosti je rezultirao zaključkom da je gelan gumu potrebno kemijski modificirati (Silva i sur., 2012). Kada se sintetički peptid izveden iz fibronektina veže Diels-Alderovom reakcijom za gelan gumu, dobije se produkt na koji stanice značajno bolje prijanjaju u odnosu na samu gelan gumu, što dovodi do poboljšanja stanične morfologije i proliferacije.

Cilj rada bio je provjeriti koja koja će koncentracija neuralnih matičnih stanica pokazati najbolju proliferaciju u metakriliranoj gelan gumi.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Za eksperimentalni dio ovog rada korištene su neuralne matične stanice izolirane iz E14 moždanog tkiva mišjih embrija iz trudne Cd57 mišice.

Hidrogel koji smo koristili je metakrilirana gelan guma, mimsys G, donacija istraživače grupe 3B's, točnije, njihove *spin off* tvrtke Stematters (Caldas das Taipas, Portugal).

Reagensi:

- 1) Etanol, 70%-tna otopina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 2) Hank Balanced Salt Solution (HBSS) (bez Ca^{2+} i Mg^{2+} , Invitrogen, Grand Island, NY, SAD)
- 3) otopina enzima akutaze (Invitrogen, Grand Island, NY, SAD))
- 4) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Lonza, Verviers, Belgija)
- 5) Glutamax (Invitrogen, Grand Island, NY, SAD)
- 6) mimsys G (Stematters, Caldas das Taipas, Portugal)
- 7) MTS testa (Promega, MA, USA)

Aparatura i pribor:

- 1) Petrijeve zdjelice (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka)
- 2) Epruvete (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka)
- 3) Pipete (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka)
- 4) Škare
- 5) Pinceta
- 6) Spektrofotometar (Bio Rad, Hercules, CA, SAD)
- 7) 24-titarska pločica za rast stanica (Croning, NY, SAD)
- 8) Centrifuga (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- 9) Mikroskop (Axiovert 200, Carl Zeiss, Jena, Njemačka)
- 10) Inkubator (37 °C, 5% CO_2) (Binder, Bohemia, NY, SAD)

3.2. Metode rada

3.2.1. Izolacija i seciranje moždanog tkiva miša

Izolacija i seciranje moždanog tkiva miša E14 vršila se u 14. danu embrionalnog razvoja. Nakon eutanazije trudne Cd57 crne mišice cervikalnom dislokacijom, trbušna šupljina se

ispire sa 70 % -tnom otopinom etanola. Koža se uhvati s pincetom i presječe s malim škarama kako bi se vidjela maternica koja se zatim izvadi. Tkivo maternice se postavi u petrijevu zdjelicu s HBBS. Rad se nastavlja u sterilnim uvjetima na stolu s okomitim protokom zraka. Tkivo maternice se prebaci u novu petrijevu zdjelicu koja sadrži svježi HBSS. Maternica se izreže i zametak se prenese u drugu petrijevu zdjelicu s hladnom HBBS. Glave zametaka je potrebno odvojiti na razini vratne leđne moždine i prenijeti ih u posudu s otopinom za seciranje. Proces se započinje uklanjanjem mozga, držeći glavu s pincetom u poziciji leđa okrenutih prema gore. Mozak se lagano prihvati pincetom i izvadi. Obje hemisfere se seciraju te se prenese pomoću pipete od 1000 μ l s odrezanim vrhom (kako bi tkivo lakše ušlo kroz veći promjer otvora) u epruvetu od 50 ml. Postupak se ponavlja sve dok svi mozgovi nisu secirani. Sva izolirana tkiva se stave u novu petrijevu posudu s hladnom otopinom za seciranje. Tkiva se usitnjavaju s malim škarama. Usitnjeno tkivo se prebaci u epruvetu od 50 ml.

3.2.2. Odvajanje neuralnih matičnih stanica i nasadivanje na hranjivu podlogu

Usitnjeno tkivo se treba slegnuti na dnu epruvete, nakon čega se uklanja višak otopine. Dodaje se otopina enzima akutaze u epruvetu (2-3 ml za tkivo iz 4-5 embrija). Inkubacija s akutazom traje 20-30 minuta, na sobnoj temperaturi. Za to vrijeme potrebno je tresti epruvetu i periodično triturirati tkivo s pipetom od 1000 μ l (25-35 puta). Na kraju enzimske inkubacije ostati će plutati manja količina tkiva koje se nije razdvojilo, dok će ostatak stanica biti u suspenziji. Kada se tkiva slegnu, suspenzija se odvoji u novu epruvetu od 50 ml. Dodaje se 5 ml DMEM i Glutamax u suspenziju stanica kako bi se stanice odvojile od otopine. Suspenzija se centrifugira 6 min na $340 \times g$, na sobnoj temperaturi. Supernatant se uklanja, a talog resuspendira u 2 ml DMEM medija za rast. Stanice se izbroje kako bi se mogle nasaditi u gustoći od $2-3 \times 10^6$ stanica po 25 ml (u boci od 75 cm^2). Stanice se inkubiraju u vlažnom inkubatoru pri $37^\circ C$ i 5% CO_2 .

3.2.3. Pasaža embrionalnih neurosfera

Dva dana nakon izolacije, nastaje neurosfera oko stanica. Stanice se prenose iz boce u epruvetu od 50 ml. Centrifugiraju se 5 minuta na $200 \times g$ pri sobnoj temperaturi. Supernatant se mora ukloniti nakon čega se dodaje 2 ml enzima akutaze. Sfere se inkubiraju u akutazi 10 min na sobnoj temperaturi uz redovno protresanje epruvete i trituriranje s pipetom od 1000 μ l (20-30 puta). Za razrjeđivanje enzima dodaje se 5 ml DMEM medija. Slijedi centrifugiranje

suspenzije 6 minuta na $340 \times g$ na sobnoj temperaturi. Supernatant se uklanja, a talog se resuspendira u MGG tako da gustoća bude 1×10^6 stanica po mililitru.

3.2.4. Uklapanje stanica u hidrogel

Pod aseptičkim uvjetima doda se 9 ml sterilne deionizirane vode u 0,2 g MGG. Gel se otopi se uz miješanje na $37^\circ C$. Talog stanica se resuspendira u 1 ml medija za rast stanica i pomiješa se s MGG otopinom tako da se dobiju dvije koncentracije otopina (1 i 2×10^6 stanica po ml). Mješavina stanica i MGG-a volumena 100 μl se prenosi u jažice 24-titarske pločice za rast stanica te se doda DMEM medij kako bi prekrrio sve stanice. Geliranje MGG i povezivanje stanica s gelom se događa tijekom 5 minuta, nakon čega se preporuča period stabilizacije od 10 minuta u mediju koji u ovom slučaju služi kao otopina za umrežavanje (crosslink solution). Nakon toga se taj medij može zamijeniti s 900 μl svježeg medija za rast stanica. Kao kontrola, korištene su 10^5 stanica u 1 ml DMEM medija za uzgoj. Sve stanice korištene u eksperimentu se zatim pogledaju pod svjetlosnim mikroskopom i ako su ravnomjerno raspoređene u jažicama, stave se u inkubator na uzgoj dva dana.

Stanice različitih koncentracija (1 i 2×10^6 stanica po ml) nasade se na 1% MGG, pogodan za uzgoj NMS. Usporedba se vrši s NMS u čistom mediju, što je u rezultatima označeno kao 100% fluorescencije. Proliferacija se određuje pomoću MTS testa.

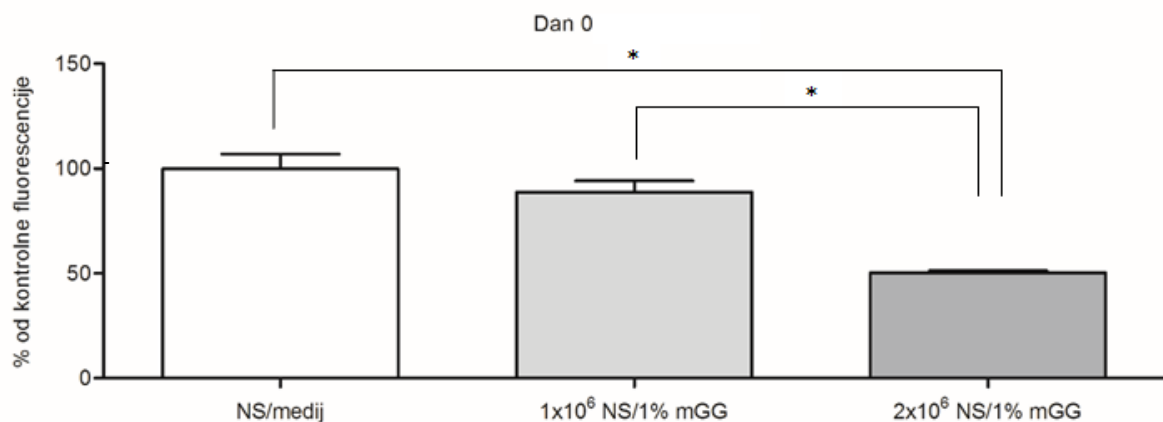
MTS reagens se dodaje u uzorke u omjeru 1:10 u tami, te se potom pločica sa uzorcima pohrani u inkubator 4 sata nakon čega se mjeri apsorbancija na spektrofotometru pri 490 nm.

3.2.5. Statistika

Za obradu podataka koristili smo kompjuterski program Graph Pad (GraphPad Software, Inc. California, USA) Značajnost razlika između vrijednosti dobivenih u pokusim i kontrolnoj skupini određivali smo Student-ovim t-testom neovisnih varijabli.

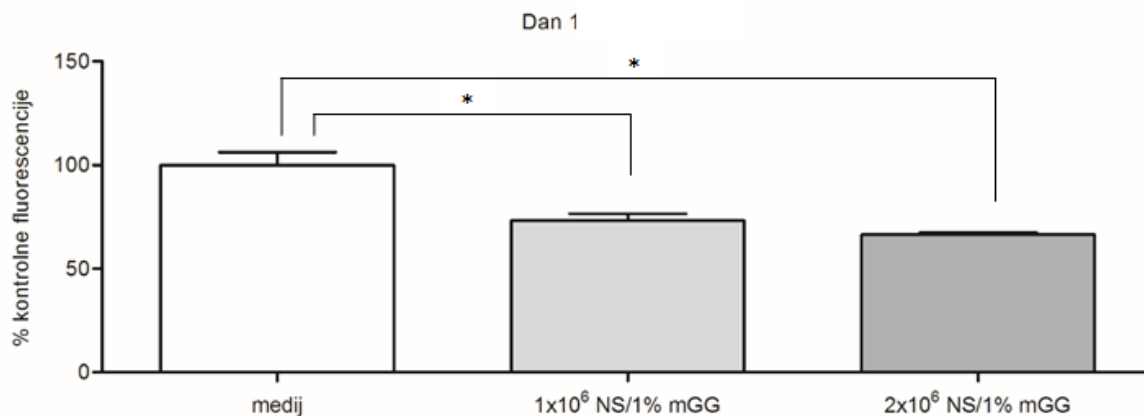
4. REZULTATI

Četiri sata nakon početka eksperimenta smanjen je broj živih stanica uklopljenih u MGG u odnosu na kontrolu (stanice u mediju) (Slika 8). Pri manjoj korištenoj koncentraciji (1×10^6 stanica) je fluorescencija pala na $88,80 \pm 5,39\%$ (srednja vrijednost \pm standardna pogreška aritmetiče sredine) od kontrolne vrijednosti, dok je smanjenje pri višoj koncentraciji (2×10^6 stanica) još drastičnije, pa fluorescencija iznosi $50,48 \pm 0,78\%$ od kontrolne vrijednosti. Statistička analiza otkriva da se vrijednosti fluorescencije među dvjema korištenim koncentracijama značajno razlikuju, te je viša koncentracija uklopljenih stanica dala lošije rezultate (t-test, $p < 0,05$).



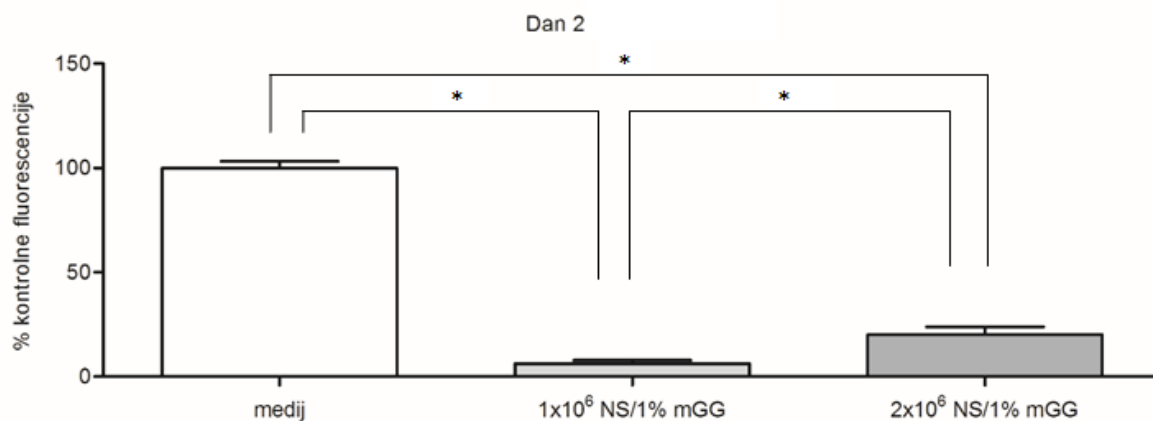
Slika 8. Usporedba preživljenja neuralnih matičnih stanica u mediju i u 1 %- tnom MGG-u pri koncentraciji od 1×10^6 te 2×10^6 , 4 h nakon inkubacije. Zvezdica označava značajnu razliku među uzorcima (t-test, $p < 0,05$)

Kod dugotrajnijeg uzgoja stanica (24 sata) u MGG-u primjećen je nastavak trenda smanjenja broja živih stanica pri manjoj koncentraciji i fluorescencija iznosi $73,24 \pm 3,31\%$ (Slika 9). Pri višoj koncentraciji stanica postotak fluorescencije je blago porastao u odnosu na kontrolne vrijednosti i iznosi $66,40 \pm 1,13\%$. U ovoj vremenskoj točki ne primjećujemo značajne razlike među korištenim koncentracijama stanica (t-test).



Slika 9. Usporedba preživljenja neuralnih matičnih stanica u mediju (kontrola) i u 1 %- tnoj MGG-u pri koncentraciji od 1×10^6 te 2×10^6 , 24 h nakon inkubacije- Zvezdica označava značajnu razliku među uzorcima, t-test, $p < 0,05$.

Drugi dan nakon početka eksperimenta uočeno je drastično opadanje broja preživjelih stanica pri objema korištenim koncentracijama (Slika 10.). Postotak fluorescencije iznosi $6,16 \pm 1,62\%$ pri nižoj, a $20,17 \pm 3,61\%$ pri višoj koncentraciji stanica. U ovoj vremenskoj točki viša koncentracija stanica dala je statistički značajno bolji rezultat u odnosu na nižu koncentraciju stanica (t-test, $p < 0,05$).



Slika 10. Usporedba preživljenja neuralnih matičnih stanica u mediju (kontrola) i u 1 %- tnom MGG-u pri koncentraciji od 1×10^6 te 2×10^6 , 31 h nakon inkubacije, zvezdica pokazuje značajnu razliku u odnosu na kontrolu, t-test, $p < 0,05$

5. RASPRAVA

Trodimenzionalne kulture stanica imaju niz prednosti u usporedbi sa dvodimenzionalnim kulturama široko korištenim u biološkim testiranjima.

MGG se pokazala kao dobar medij za uzgoj fibroblasta u trodimenzionalnoj kulturi *in vitro* (Oliveria i sur., 2010.), te je pokazala jako dobre rezultate u *in vivo* pokusima (Silva-Correia i sur., 2012.). U daljnjim istraživanjima MGG je dala dobre rezultate s glija stanicama (Silva i sur., 2012), otvorivši put za dodatne eksperimente u neuroznanosti.

Testirali smo utjecaj uzgoja NMS-a unutar trodimenzionalne mreže MGG-a na proliferaciju stanica i naši rezultati su pokazali citotoksično djelovanje MGG-a.

Već 4 sata nakon inkubacije uočeno je smanjenje broja živih stanica uklopljenih u MGG gel u odnosu na kontrolu. Zanimljivo je da smo u uzorku s većom koncentracijom stanica dobili statistički značajno manji broj metabolički aktivnih stanica u usporedbi s kontrolom i manjom koncentracijom, iako je u samom početku u ovom uzorku korišten dvostruko veći broj stanica. Pretpostavljamo da je veći broj stanica i kompeticija među njima umanjila dostupnost kisika i hranjivih tvari u uzorku do te mjere da je četiri sata nakon početka eksperimenta dvostruko veći broj stanica pri višoj testiranoj koncentraciji dao dvostruko manji broj izmjerenih stanica.

Negativni trend opadanja broja stanica u odnosu na kontrolne uzorke nastavljen je tijekom čitavog eksperimenta i tijekom dvodnevnog uzgoja uočili smo citotoksično djelovanje MGG na neuralne matične stanice. Broj stanica je pri obje testirane koncentracije u usporedbi sa kontrolom pao na manje od 50%.

Za potpuniju sliku utjecaja trodimenzionalne mreže MGG-a na proliferaciju NMS-a potrebno je napraviti dodatna istraživanja, te provjeriti može li veća ili manja koncentracija MGG- a dati bolje rezultate.

6. ZAKLJUČAK

1. Drastično opadanje broja neuralnih matičnih stanica ukopljenih u hidrogel metakrilirane gelan gume je pokazalo da 1%-tni MGG nije pogodan za uzgoj neuralnih matičnih stanica.
2. Umjesto očekivanog pozitivnog utjecaja na proliferaciju stanica, MGG je na stanice djelovao citotoksično.
3. Za potpuniju sliku djelovanja MGG na neuralne matične stanice potrebna su daljnja ispitivanja.

7. LITERATURA

- Aurand, E.R., Lampe, K.J., Bjugstad, K.B. (2012) Defining and designing polymers and hydrogels for neural tissue engineering. *Neurosci. Res.* **72**, 199-213.
- Bible, E., Dell'Acqua, F., Solanky, B., Balducci, A., Crapo, P.M., Badyrak, S.F., Ahrens, E.T., Modo, M. (2012) Non-invasive imaging of transplanted human neural stem cells and ECM scaffold remodeling in the stroke-damaged rat brain by (19)F- and diffusion-MRI. *Biomaterials* **33**, 2858-2871.
- Cheng, T.Y., Chen, M.H., Chang, W.H., Huang, M.Y., Wang, T.W. (2013) Neural stem cells encapsulated in a functionalized self-assembling peptide hydrogel for brain tissue engineering. *Biomaterials* **34**, 2005-2016.
- Demarin, V., Trkanjec, Z. (2008.) Neurologija za stomatologe, 1. izd., *Medicinska naklada*, Zagreb.
- Discher, D.E., Mooney, D.J., Zandstra, P.W. (2009) Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science* **324**, 1673–1677.
- English, D., Sharma, N.K., Sharma, K., Anand, A. (2013) Neural stem cells-trends and advances. *J. Cell Biochem.* **4**, 764-772.
- FitzGerald, M.J.T., Folan-Curran, J. (2002) Clinical neuroanatomy and related neuroscience, 4. izd., *W.B. Saunders*, London.
- Gajović, S. (2009) Embrionalne matične stanice. Drugi dio: Primjena embrionalnih matičnih stanica. Nastavni tekst Katedra za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, <<http://medicinar.mef.hr/assets/arhiva/maticne-stanice2.pdf>>. Pristupljeno 19. lipnja 2015.
- Gajović, S. (2012) Regeneracija mozga: od neuroznanstvene nade do bioetičkog problema, *JAHHR* **3** 267-277.
- Gnavi, S., Barwig, C., Freier, T., Haastert-Talini, K., Grothe, C., Geuna, S. (2013) The use of chitosan-based scaffolds to enhance regeneration in the nervous system. *Int. Rev. Neurobiol.* **109**, 1-62.

- Hwang, D.W., Jin, Y., Lee, D.H., Kim, H.J., Cho, H.N., Chung, H.J., Park, Y., Youn, H., Lee, S.J., Lee H.J., Kim, S.U., Wang, K.C., Lee, D.S. (2014) In vivo bioluminescence imaging for prolonged survival of transplanted human neural stem cells using 3D biocompatible scaffold in corticectomized rat model. *Plos one*. **9**(9):e105129. doi: 10.1371/journal.pone.0105129.
- Hynd, M.R., Turner, J.N., Shain, W. (2007) Applications of hydrogels for neural cell engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **18**, 1223-1244.
- Jin, K., Mao, X., Xie, L., Galvan, V., Lai, B., Wang, Y., Gorostiza, O., Wang, X., Greenberg, D.A. (2010) Transplantation of human neural precursor cells in Matrigel scaffolding improves outcome from focal cerebral ischemia after delayed postischemic treatment in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **30**, 534-544.
- Kennea, N. L., Mehmet, H. (2002) Neural stem cells. *J. Pathol.* **197**, 536-550.
- Korica, G. (2015) Primjena matičnih stanica u liječenju tumora mozga. *Gyrus* **3**, 39-42.
- Lloyd-Jones, D., Adams, R., Carnethon, M., De Simone, G., Ferguson, T. B., Flegal, K., Ford, E., Furie, K., Go, A., Greenlund, K., i sur. (2009) Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* **119**, 480-486.
- Mackay, J., Mensah, J. (2004) Atlas of heart disease and stroke. WHO Press, Geneva.
- Oliveira, J.T., Martins, L., Picciochi, R., Malafaya, P.B., Sousa, R.A., Neves, N.M., Mano, J.F., Reis, R.L. (2010) Gellan gum: a new biomaterial for cartilage tissue engineering applications. *J. Biomed. Mater. Res. A.* **93**, 852-863.
- Ordonez, J.S., Boehler, C., Schuettler, M., Stieglitz, T. (2012) Improved polyimide thin-film electrodes for neural implants. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* **7**, 6347149.
- Parr, A., Tator, C., Keating, A. (2007) Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. *Bone Marrow Transplant* **40**, 609–619.
- Quirico-Santos, T., Fonseca, C.O., Lagrota-Candido, J. (2010) Brain sweet brain: importance of sugars for the cerebral microenvironment and tumor development. *Arq. Neuropsiquiatr.* **68**, 799-803.

- Runichoue (2014), Stanična biologija neurona, <<http://perpetuum-lab.com.hr>>. Pristupljeno: 18. lipnja 2015.
- Shenglian Yao, S., Liu, X., Wang, X., Merolli, A., Chen, X., Cui, F. (2013) Directing neural stem cell fate with biomaterial parameters for injured brain regeneration. *Prog. Nat. Sci.* **23**, 103-112.
- Silva, N.A., Cooke, M.J., Tam, R.Y., Sousa, N., Salgado, A.J., Reis, R.L., Shoichet, M.S. (2012) The effects of peptide modified gellan gum and olfactory ensheathing glia cells on neural stem/progenitor cell fate. *Biomaterials* **33**, 6345-6354.
- Silva-Correia J., Oliveira J.M., Oliveira J.T., Sousa R.A., Reis R.L. (2010) Photo-crosslinked gellan-gum based hydrogels: Methods and uses thereof. WO2011/119059 , Priority date: 105030 26.03.2010 PT.
- Silva-Correia, J., Miranda-Goncalves, V., Salgado, A.J., Sousa, N., Oliveira, J.M., Reis, R.M., Reis, R.L. (2012) Angiogenic potential of gellan-gum-based hydrogels for application in nucleus pulposus regeneration: in vivo study. *Tissue Eng. Part .18*, 1203-1212.
- Silva-Correia, J., Oliveira, J.M., Caridade, S.G., Oliveira, J.T., Sousa, R.A., Mano, J.F., Reis, R.L. (2011) Gellan gum-based hydrogels for intervertebral disc tissue-engineering applications. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **5**, 197-107.
- Silva-Correia, J., Zavan, B., Vindigni, V., Silva, T.H., Oliveira, J.M., Abatangelo, G., Reis, R.L. (2013) Biocompatibility evaluation of ionic- and photo-crosslinked methacrylated gellan gum hydrogels: in vitro and in vivo study. *Adv. Healthc. Mater.* **2**, 568-575.
- Tam, R.Y., Fuehrmann, T., Mitrousis, N., Shoichet, M.S. (2014) Regenerative therapies for central nervous system diseases: a biomaterials approach. *Neuropsychopharmacology* **39**, 169-188.
- Terry Z. (2014) Is Gellan Gum Gluten Free? FOODCHEM International Corporation. <<http://www.foodchemadditives.com/gluten-free/2203>>. Pristupljeno: 19. lipnja 2015.
- TSAOG (2015) The San Antonio Ortopedic Group. Orthopedic Stem Cell Therapy <<http://www.tsaog.com/>> . Pristupljeno: 14. srpnja 2015.
- Van Assche, F.A. (2002) The use of stem cells. *Gynaecol. Perinatol.* **11**, 93-95

- Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A.C., Reynolds, B.A. (1996) Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J. Neurosci.* **16**, 7599–7609.
- WSO, (2012) World Stroke Campaign. WSO – World Stroke Organisation, <<http://www.world-stroke.org>>. Pristupljeno 31. kolovoza 2015.
- Zhang, R., Liu, Y., Yan, K., Chen, L., Chen, X.-R., Li, P., Chen, F.-F. and Jiang, X.-D. (2013) Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cell transplantation in experimental traumatic brain injury. *J. Neuroinflammation* **10**, 106.
- Zhang, S., Anderson, M.A., Ao, Y., Khakh, B.S., Fan, J., Deming, T.J., Sofroniew, M.V. (2014) Tunable diblock copolypeptide hydrogel depots for local delivery of hydrophobic molecules in healthy and injured central nervous system. *Biomaterials* **35**, 1989-2000.