

**ALMA MATER EUROPAEA  
EVROPSKI CENTER, MARIBOR  
Socialna gerontologija**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Lidija Gradišnik**

**ALMA MATER EUROPAEA**

**Evropski center, Maribor**

Doktorska disertacija

študijskega programa tretje bolonjske stopnje

SOCIALNA GERONTOLOGIJA

**IZOLACIJA ČLOVEŠKIH ASTROCITOV ZA  
IZDELAVO CELIČNEGA MODELA ZA  
PROUČEVANJE NEVRODEGENERATIVNIH  
BOLEZNI STAREJŠIH**

Mentor: prof. dr. Tomaž Velnar

Kandidat: Lidija Gradišnik

Maribor, februar 2022

## **ZAHVALA**

*Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Tomažu Velnarju, dr. med. za strokovnost, nasvete, sodelovanje pri znanstveno-raziskovalnem delu, srčnost v odnosu do vseh starejših in veliko predanost zdravniškemu poklicu.*

*Gospe prof. dr. Avreliji Cencič, prof. biol. in kem. in gospodu doc. dr. Bratku Filipiču, prof. biol. in kem. se iskreno zahvaljujem, ker sta mi odprla čudoviti svet celičnih kultur ter z menoj delila znanje in prijateljstvo.*

*Hvala moji raziskovalni skupini Inštituta za biomedicinske vede Medicinske fakultete Maribor.*

*Za računalniško svetovanje se zahvaljujem gospe Tjaši Pogorevc, za lepo slovensko besedo pa gospe Andreji Lep.*

*Hvala tudi vsem ostalim, ki so kakorkoli pripomogli k nastanku naloge.*

*Posebna hvala mojima hčerkama Maši in Nini, ker z njima po vsakem dežju takoj posije sonce.*

## **POVZETEK**

Astroцитi so najštevilnejše celice v centralnem živčevju. Njihovo odločilno vlogo v zadnjem času vse bolj spoznavamo tudi v patogenezi nevrodegenerativnih obolenj, zato je proučevanje astrocitov vedno bolj zanimivo tudi za eksperimentalno prakso. Namen raziskave je bil razviti protokol za rutinsko pripravo celične kulture astrocitov iz odraslih človeških možganov.

Tkivo, pridobljeno med operacijami pacientov po poškodbi glave in nerupturiranih možganskih anevrizem smo mehansko razgradili in centrifugirali. Celični sediment smo resuspendirali v mediju za gojenje celic, nanесли v gojilne posodice T25 in inkubirali en mesec pri temperaturi 37 °C in v 5 % CO<sub>2</sub>. Medij smo dvakrat tedensko zamenjali in odstranili kontaminirajoče celice mikroglije in oligodendrocite. Ko je bila celična kultura konfluentna, smo ocenili njeno čistost in celice imunocitokemično karakterizirali na specifične astrocitne označevalce (GFAP, GLAST in S100B). Morfologijo celic smo določili z označevanjem aktinskega citoskeleta s fluorescenčnim faloidinom.

Potrdili smo morfološke značilnosti celic in specifične celične označevalce, ki so ustrezali astroцитom. Približno 95 % celic je bilo pozitivnih na glavne glialne označevalce.

Razvili smo enostaven in učinkovit protokol za izolacijo obogatene primarne kulture astrocitov iz odraslih človeških možganov. Ta tehnika izolacije zagotavlja zadostne količine celic. Celična kultura, pridobljena na ta način, kaže biokemične in fiziološke lastnosti astrocitov. Možnosti uporabe takšne celične kulture obsegajo poskuse v pogojih in vitro za proučevanje mehanizmov citotoksičnosti in citoprotekcije ter nevrodegenerativnih obolenj pri odraslih, študije razlik med neonatalnimi in odraslimi astroцитi ter odkrivanje novih terapevtskih tarč za poskuse s celično terapijo.

**Ključne besede: nevrodegenerativne bolezni, možgani, izolacija celic, človeški astroцитi, celični model.**

## **ABSTRACT**

Astrocytes are the main cellular constituent in the central nervous system. Their crucial role in the pathogenesis of neurodegenerative diseases has recently been increasingly recognised, and the study of astrocytes is of growing interest for experimental practice. The aim of this study was to develop an improved protocol for routine preparation of primary astrocyte culture from adult human brain.

The tissue obtained during neurotrauma and cold aneurysm operations was mechanically first decomposed and then centrifuged. The cell sediment was resuspended in cell culture medium, plated in T25 cell culture flasks and incubated for one month at 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>. The cell medium was replaced twice weekly and microglia and oligodendrocytes were removed. When the cell culture reached confluence, its purity was assessed. The culture was characterised immunocytochemically for specific astrocytic markers (GFAP, GLAST and S100B). Cell morphology was examined through the actin cytoskeleton labelling with fluorescent phalloidin.

Under the basal conditions, adult astrocytes exhibited astrocyte-specific morphology and expressed specific markers. Approximately 95 % of cells were positive for the main glial markers.

We have established a fluent and cost-effective protocol for a highly enriched primary astrocyte culture. This isolation technique offers sufficient quantities of isolated cells. The culture obtained in this study exhibits the biochemical and physiological properties of astrocytes. It may be useful for elucidating the mechanisms related to the adult brain, investigating compounds involved in cytotoxicity, cytoprotection and neurodegeneration, exploring changes between neonatal and adult astrocytes and finding novel therapeutic targets for cell therapy experiments.

**Keywords: neurodegenerative diseases, brain, cell isolation, human astrocytes, cell model.**

# KAZALO

<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2 ASTROCITI IN NEVRODEGENERATIVNE BOLEZNI.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Proces staranja .....</b>	<b>6</b>
2.1.1 Spremembe organizma med staranjem .....	7
<b>2.2 Kratek pregled anatomskih in fizioloških značilnosti živčevja .....</b>	<b>14</b>
2.2.1 Celična zgradba živčevja .....	14
2.2.1.1 Nevron .....	15
2.2.1.2 Nevroglia .....	19
<b>2.3 Astrociti kot najštevilnejše celice živčevja .....</b>	<b>21</b>
2.3.1 Funkcije astrocitov .....	23
2.3.2 Morfologija astrocitov in pomembni astrocitni označevalci .....	28
<b>2.4 Pomen izolacije astrocitov in funkcionalnih celičnih modelov za študij     nevrodegenerativnih bolezni.....</b>	<b>30</b>
2.4.1 Celične kulture in celični modeli .....	30
2.4.2 Začetki celičnih kultur .....	31
2.4.3 Uporaba celičnih kultur, celičnih linij in funkcionalnih celičnih modelov .....	35
2.4.4 Proces izolacije celic za poskuse <i>in vitro</i> - od tkiva do celične kulture.....	41
<b>2.5 Viri tkiva za izolacijo človeških astrocitov in kirurške metode vzorčenja tkiv</b>	<b>50</b>
2.5.1 Klasična trepanacija.....	52
2.5.2 Minimalna trepanacija ali kraniotomija v obliki ključavnice.....	55
2.5.3 Operacije z neuroendoportom .....	57
2.5.4 Stereotaktična igelna biopsija.....	59
2.5.5 Neuroendoskopski posegi .....	61
<b>2.6 Ocena dosedanjih raziskav o izolacijah astrocitov .....</b>	<b>64</b>
<b>3 EMPIRIČNI DEL .....</b>	<b>69</b>
<b>3.1 Namen in cilji raziskovanja.....</b>	<b>69</b>
<b>3.2 Raziskovalna hipoteza .....</b>	<b>69</b>
<b>3.3 Raziskovalna metodologija.....</b>	<b>69</b>
3.3.1 Metode in tehnike zbiranja vzorcev.....	70
3.3.2 Opis vzorca .....	78
3.3.3 Opis obdelave podatkov .....	93

<b>3.4 Rezultati</b> .....	<b>98</b>
3.4.1 Rezultati izolacije celic MFUM-Astro-1. ....	98
3.4.2 Rezultati karakterizacije celic MFUM-Astro-1 .....	108
<b>3.5 Razprava</b> .....	<b>111</b>
3.5.1 Uvod.....	111
3.5.2 Izbira tkiva za izolacijo in postopek izolacije astrocitov .....	113
3.5.3 Značilnosti izolacije odraslih astrocitov .....	118
3.5.4 Prednosti in slabosti celične kulture astrocitov ter potencialne težave med izolacijo .....	120
3.5.5 Izhodišča za nadaljnje raziskave .....	127
3.5.6 Izgledi za prihodnost: astrociti in tkivni inženiring.....	128
3.5.7 Za konec .....	134
<b>4 ZAKLJUČEK</b> .....	<b>136</b>
<b>5 SEZNAM LITERATURE IN VIROV</b> .....	<b>137</b>

## **PRILOGE**

### **Priloga A: Dovoljenje Etične komisije Republike Slovenije**

#### **Izjava o avtorstvu**

#### **Izjava lektorja**

## SEZNAM SLIK

Slika 1: Astrocit v celični kulturi. Vidna je tipična zvezdasta oblika celice, ki se lepo pokaže z imunocitokemičnim barvanjem aktina v celici.....	22
Slika 2: Primer celične kulture, pridobljene z metodo eksplantacije. V laboratorijskih pogojih celice migrirajo iz koščka tkiva in oblikujejo enojno plast celic, ki obkroža osrednji delec tkiva. Gostota celic in površina preraščanja se s časom povečujeta: po 24 urah (A) in po 72 urah (B). Na sliki so celice, ki v kulturi rastejo iz delčkov terminalne plošče (velikost približno 5 mm <sup>2</sup> ), odvzete pri spinalni operaciji .....	32
Slika 3: Sodobno opremljen laboratorij za izolacijo celičnih kultur na Inštitutu za biomedicinske vede na Medicinski fakulteti v Mariboru. V tem laboratoriju poteka redna izolacija različnih celičnih kultur in izvajanje poskusov z biomateriali.....	34
Slika 4: Primer enostavnega funkcionalnega celičnega modela v vsakdanji laboratorijski praksi. Na mikrotitrskih ploščicah so celične kulture astrocitov, označene z različnimi celičnimi označevalci, ki so pripravljene za toksikološke analize .....	35
Slika 5: Funkcionalni celični model. Na mikrotitrskih ploščicah so celične kulture kožnih celic (HACAT) (A) in kostnih celic hFOB (B) na različnih podlagah ter priprava vzorcev za meritve fluorescence s spektrofotometrom (C) .....	37
Slika 6: Primer celične kulture fibroblastov, vzgojene iz koščka vezivnega tkiva, torej netransformiranih celic (A), in celične linije celic VERO (B), ki jo sestavljajo rakaste, transformirane celice. Nativni posnetek celične kulture pri 50-kratni povečavi, Nikon Diaphot 300 .....	41
Slika 7: Različne vrste resekcijskih vzorcev, pridobljenih med operacijami možganov, ki služijo kot vir za izolacijo različnih možganskih celic. Količina pridobljenega tkiva in način odvzema vplivata na uspeh izolacije celic. Pri klasičnih, odprtih operacijah in širokih resekcijah pridobimo veliko tkiva, ki ga bomo lahko uporabili za nadaljnjo obdelavo v celičnem laboratoriju, kot na primer pri odprti operaciji glioblastoma (A). Resekcijski vzorec glioma, pridobljen z odprto biopsijo pri minimalni trepanaciji ali kraniotomiji v obliki ključavnice (B). Vzorec glioma, pridobljen z igelno biopsijo (C). Biopsijska igla z vzorcem tkiva (D). Slike so bile posnete med rutinskimi nevrokirurškimi posegi, tkivo pa je bilo odvzeto tudi za namen izolacije celične kulture.....	44
Slika 8: Vzorec tkiva glioblastoma, pripravljen za prenos v celični laboratorij za izolacijo celic in na oddelek za patologijo za histopatološki pregled (A). Vzorec, namenjen za	



histopatološki pregled, je shranjen v raztopini formaldehida (levo), tkivo za celični laboratorij pa hranimo v celičnem mediju ali v fosfatnem pufru (desno). Cilj je, da tkivo transportiramo na ledu in čim hitreje, da bi s tem lahko čim bolj zmanjšali nekrobiotične procese v resekcijskem vzorcu (B).....	45
Slika 9: Primer celične kulture astrocitov, ki je bila izolirana iz zdravega možganskega tkiva. Nativni posnetek, Nikon Diaphot 300. Merilo: 100 µm.....	46
Slika 10: Kultura glioblastomskih celic. V primerjavi z astrociti zdravih darovalcev (Slika 9) so rakaste celice popolnoma drugačnega videza, heterogene po morfologiji in lastnostih, z malo citoplazme in jasnimi jedri. Nativni posnetek, Nikon Diaphot 300. Merilo: 100 µm .....	47
Slika 11: Odprta operacija nizkomalignega možganskega tumorja. Izpostavljenost možganov pri takem odprtem pristopu je obširna, preglednost dobra in tudi vzorci tkiva so tukaj zajetni (A). Možganski tumor je jasno viden na površini. Tumorsko tkivo je bolj edematozno in rjavo belkaste barve (B). Resekcijska votlina po odstranitvi tumorja. Drenažna žila pod tumorjem je ostala na mestu, ker je bistvena za vzdrževanje normalne možganske drenaže (C). Vse slike so bile posnete med rutinskimi nevrokirurškimi posegi v UKC Ljubljana z odobritvijo pacienta in etične komisije. ....	54
Slika 12: Minimalna trepanacija ali kraniotomija v obliki ključavnice, ki jo najpogosteje uporabljamo pri operacijah primarnih možganskih tumorjev, ki je modifikacija običajne kraniotomije. Namestitev bolnika pred posegom in priprava nevronavigacije za medoperativno vodenje. Ker je na površini vidnih manj anatomskih značilnosti, je slikovno vodenje zelo dobrodošlo. Uporaba nevronavigacije omogoča poleg boljše kirurške natančnosti, tudi jasno anatomsko beleženje lokacije, od koder so bili vzorci tkiva odvzeti (A). Uvajanje instrumentov za resekcijo tumorja skozi kraniotomijo v obliki ključavnice. Z uporabo te tehnike je obolenost, povezana s kirurškim pristopom, manjša, prav tako pa tudi stopnja zapletov po operaciji .....	56
Slika 13: Nevroendoport je nameščen za uporabo. Nevroendoport je cevast koridor do globokih možganskih lezij skozi možgansko tkivo. Instrumenta, bipolarna pinceta in aspirator, nato uvedemo skozi nevroendoport v smeri lezije, pri čemer je možna vizualizacija skozi operacijski mikroskop (A). Uporabimo lahko tudi endoskop, ki je na tej sliki vstavljen skozi razširljivi nevroendoport. Sledijo ostali nevrokirurški instrumenti (B). Resekcija intraventricularnega tumorja skozi razširljivi nevroendoport. Puščice označujejo spodnji rob koridorja nevroendoporta (C) .....	58

Slika 14: Stereotaktična biopsija s pomočjo stereotaktičnega okvirja za operacije globokih možganskih lezij. Viden je stereotaktični lok s pritrjenim vodilom za uvajanje biopsijske igle (A). Uvajanje biopsijske igle (B). Stereotaktična biopsija brez okvirja. Biopsijsko trajektorijo med postopkom nameščanja vodila za uvajanje biopsijske igle prilagajamo glede na nevronavigacijsko podprto načrtovanje dostopa do tarče (lezije) (C). Biopsijska igla za stereotaktično biopsijo brez okvirja in prilagajanje dolžine biopsijske igle (D) .....	60
Slika 15: Neuroendoskopija. Neuroendoskop je potrebno najprej umeriti, to pomeni, da ga združimo z nevronavigacijskim sistemom (A). Med posegom na monitorju opazujemo kirurško polje. Natančen položaj konice endoskopa na sliki kaže drugi monitor, ki je povezan z nevronavigacijskim sistemom (B). Popoln neuroendoskopski poseg z endoskopom z dvema delovnimi kanaloma (C). Pogled skozi neuroendoskop med resekcijo tumorja (D) .....	62
Slika 16: Operativna oskrba strelne možganske poškodbe .....	71
Slika 17: Prikaz možganske anevrizme včasih zahteva odstranitev tanke plasti kortikalne možganovine v okolici, ki zastira pogled na anevrizmatski vrat in kupolo. Če je ta plast možganovine previdno odvzeta, je lahko dragocen vir za izolacijo možganskih celic. Na sliki je anevrizma izključena iz obtoka s kirurško sponko .....	72
Slika 18: Tkivo po kirurški resekciji shranimo v različne sterilne centrifugirke s celičnim medijem, ki mu lahko dodamo še antibiotika penicilin in streptomicin za zmanjšanje možnosti bakterijske kontaminacije. Za prenos lahko uporabimo tudi fosfatni pufer raztopino (A in B). Tako pripravljeno tkivo na ledu hitro prenesemo v celični laboratorij (C) .....	73
Slika 19: Celični laboratorij. V komori z laminarnim pretokom zraka izvajamo vsa pomembna dela s celičnimi kulturami, od priprave tkiva, izolacije, precepljanja, barvanj, karakterizacije in priprave pred zamrzovanjem.....	74
Slika 20: Komora z laminarnim pretokom zraka ter vsemi potrebnimi instrumenti in kemikalijami, ki jih bomo potrebovali za celično izolacijo. V centrifugirkah je shranjeno sveže tkivo, encimi in dodatki za celični medij, v velikih posodah fosfatni pufer in celični medij, ki ga kultura potrebuje za rast. Petrijevka s celičnim medijem pa je pripravljena za tkivo, ki ga bomo pregledali in nato mehansko razgradili na manjše koščke .....	75
Slika 21: Spiraje fragmentov možganskega tkiva s fosfatnim pufrom. Zaradi boljšega izpiranja si velikokrat pomagamo s stresalnikom.....	80
Slika 22: Centrifuga in centrifugirke s celično suspenzijo pred centrifugiranjem .....	80

Slika 23: Centrifugirki s celičnim sedimentom, začasno shranjeni v inkubatorju. Celični sediment vsebuje celice, ki jih bomo v naslednjih fazah poskusa spet resuspendirali v celičnem mediju in jih pripravili za gojišče.....	81
Slika 24: Gojilne posodice T25. Celični sediment iz centrifugirk smo resuspendirali v celičnem mediju z dodatki in ga odpipetirali v gojilne posodice. Te so narejene iz posebej obdelane plastike, ki spodbuja pritrđitev celic na podlago, da se lahko oblikuje celična kolonija. Posodice T25 smo shranili v inkubator z nadzorovano atmosfero in temperaturo, kjer so celice rasle naslednje tedne.....	82
Slika 25: Inkubator za celične kulture (A) in stekleničke s celičnimi kulturami v inkubatorju (B). Celice rastejo v okolju z nadzorovano atmosfero pri 37 °C in 5 % CO <sub>2</sub> .....	83
Slika 26: Postopki za odstranjevanje kontaminirajočih celic med različnimi fazami poskusa. V komori z laminarnim pretokom zraka so vidne centrifugirke s celičnim sedimentom in različni celični dodatki, material in instrumenti za delo s celičnimi kulturami ter odpadne raztopine, v stojalu spredaj pa resuspendirane celične kulture, ki so pripravljene za nadaljnje gojenje v inkubatorju .....	84
Slika 27: Gojilna posodica T25 s celičnim medijem. Rdeča barva svežega medija z vsemi potrebnimi dodatki za rast celične kulture (A). Celični medij pred menjavano po treh dneh gojenja celic v kulturi. Celice so med rastjo porabile hranilne snovi iz medija, zato se je barva spremenila v rdeče-rjavo (B) .....	84
Slika 28: Vodna kopel, ki jo v laboratoriju uporabljamo za segrevanje kemikalij in dodatkov pri delu s celičnimi kulturami, navadno na temperaturo 37 °C, in laboratorijski avtoklav za sterilizacijo laboratorijskega materiala.....	85
Slika 29: Svetlobni invertni mikroskop z nameščeno kamero za opazovanje celičnih kultur med rastjo je nepogrešljiv aparat za delo s celičnimi kulturami. Desno na zaslonu je posnetek primarne celične kulture astrocitov, lepo so vidne stekleničke za gojenje celic. ....	85
Slika 30: Gojenje primarnih astrocitov in inkubacija v nadzorovani atmosferi (A), celična kultura v posodicah T25 po precepljanju s svežim medijem Advanced DMEM z dodatki, pripravljena za nadaljnje gojenje (B), centrifugiranje celične suspenzije v različnih fazah gojenja (C), celični sediment z astrociti na dnu centrifugirke (D), ki ga bomo resuspendirali v posodice za nadaljnje gojenje in karakterizacijo (E) .....	87
Slika 31: Za nadaljnje poskuse celice shranimo v krioviale v 1 ml seruma govejega zarodka in 10 % DMSO in prehodno postopoma zamrznemo s pomočjo posebne posodice za zamrzovanje (Mr. Frosty) (A). Nato jih pred trajnim zamrzovanjem v tekočem dušiku v	

posodicah Mr. Frosty čez noč postopoma ohladimo v zamrzovalniku pri temperaturi minus 80 °C (B).....	89
Slika 32: Po postopnem ohlajanju kriovial v zamrzovalniku pri temperaturi minus 80 °C, jih lahko trajno hranimo v tekočem dušiku pri temperaturi minus 196 °C. Kontejnerji s tekočim dušikom (A), ki vsebujejo pločevinaste posodice s kriovialami (B).....	90
Slika 33: Postopno odtajanje kriovial z astrociti v vodni kopeli pri temperaturi 37 °C .....	91
Slika 34: Postopki resuspendiranja, centrifugiranja, odstranjevanja supernatanta in ponovnega resuspendiranja celičnega sedimenta astrocitov ter nasaditve celične kulture in gojenja v inkubatorju so podobni kot pri precepljanju celic med gojenjem (A do C) .....	92
Slika 35: Opazovanje živosti celične kulture astrocitov med rastjo po odtajanju na invertnem mikroskopu .....	93
Slika 36: Zadnja stopnja izolacije celic je karakterizacija celične kulture na specifične celične označevalce. Na sliki so vidne petrijevke z objektnimi stekelci, kjer so trajni preparati izoliranih celic, karakteriziranih s specifični protitelesi.....	94
Slika 37: Shramba z različnimi kemikalijami, ki jih potrebujemo pri delu s celičnimi kulturami.....	95
Slika 38: Celice na mikrotitrskih ploščicah s 24 vodnjaki (P24), ki so pripravljene za zaključne faze karakterizacije.....	96
Slika 39: Shematski prikaz izolacijskega postopka odraslih humanih astrocitov .....	98
Slika 40: Celice MFUM-Astro-1 takoj po nasaditvi v gojilne posodice. V celični suspenziji plavajo okrogle celice, ki se bodo čez nekaj ur začele pritrjati in spreminjati obliko. Slike so bile posnete pri povečavi 40x na invertnem mikroskopu Nikon Diaphot 300. Merilo: 100 µm .....	99
Slika 41: Primarna kultura odraslih človeških astrocitov. Spodnji desni del slike prikazuje primarne astrocite v kulturi z visoko gostoto. V zgornjem levem kotu je vidna celična kultura z nizko gostoto s posameznimi astrociti poligonalne oblike. Slike so bile posnete pri povečavi 50x na invertnem mikroskopu Zeiss Axiovert 40. Merilo: 200 µm.....	100
Slika 42: Celice MFUM-Astro-1 dva tedna po izolaciji. Celice intenzivno rastejo po površini gojilne posodice in že začenjajo oblikovati medcelične stike. Posnetki so bili narejeni na invertnem mikroskopu Zeiss Axiovert 40 pri povečavi 50x. Merilo: 200 µm.....	101
Slika 43: Tri tedne po izolaciji gostota celične kulture narašča. Celice rastejo v obliki majhnih otočkov in se med seboj povezujejo. Slike so bile posnete pri povečavi 50x na invertnem mikroskopu Zeiss Axiovert 40. Merilo: 200 µm.....	102

Slika 44: En mesec po izolaciji astrociti popolnoma prerastejo površino gojilnih posodic in oblikujejo močne medcelične povezave (100-odstotna konfluenca). Celce rastejo le v eni plasti in se ne kopijo v skupke ali večplastne formacije, kar je sicer značilnost transformiranih celic. Slike so bile posnete pri povečavi 50x na invertnem mikroskopu Zeiss Axiovert 40. Merilo: 200 $\mu\text{m}$ .....	103
Slika 45: Odrasli človeški astrociti MFUM-Astro-1 v prvi fazi po odmrznitvi. Kultura je 50 % konfluentna in vitalnost je ocenjena na 95 %. Slike so bile posnete pri povečavi 50x na invertnem mikroskopu Zeiss Axiovert 40. Merilo: 200 $\mu\text{m}$ .....	104
Slika 46: Imunocitokemična karakterizacija odraslih človeških astrocitov MFUM-Astro-1 v prvi fazi. Morfologija celic je bila prikazana z uporabo oranžnega fluorescenčnega konjugata Phalloidina, ki se selektivno veže na aktinske filamente (rdeče). V kulturah z nizko gostoto imajo odrasli astrociti poligonalno obliko z aktinskimi filamentmi, prikazanimi ob celični membrani. Jedro je obarvano z DAPI (modro). Značilna oblika jedra je bila poligonalna do okrogla ali ponekod trikotna, z redko nukleoplazmo in z dobro vidnimi nukleoli. Slike so bile posnete pri povečavi 10x na fluorescenčnem mikroskopu EVOS FL. Merilo: 400 $\mu\text{m}$ .....	105
Slika 47: Polno konfluentna celična kultura astrocitov MFUM-Astro-1 pred precepljanjem. Celce imajo zaradi poligonalne oblike celic na nekaterih predelih videz kamnitega tlaka z jasnimi celičnimi mejami, kar je značilnost astrocitnih celic, ki rastejo v celični kulturi. Te značilnosti so najbolj opazne pri visokih konfluencah. Slike so bile posnete pri povečavi 50x na invertnem mikroskopu Zeiss Axiovert 40. Merilo: 200 $\mu\text{m}$ .....	106
Slika 48: Celice, pozitivne na GFAP, so obarvane zeleno. Jedra so kontrastno obarvana z DAPI (modro). Slike so bile posnete pri povečavi 10x na fluorescenčnem mikroskopu EVOS FL. Merilo: 400 $\mu\text{m}$ .....	109
Slika 49: Prisotnost označevalca GLAST v citoplazmi je prikazana z rdečo barvo. Kontrastno obarvanje celičnih jeder z DAPI (modro). Slike smo posneli pri povečavi 10x na fluorescenčnem mikroskopu EVOS FL. Merilo: 400 $\mu\text{m}$ .....	110
Slika 50: Beljakovina S-100 v celični citoplazmi se pri imunocitokemični karakterizaciji prikaže v zeleni barvi. Jedra so kontrastno obarvana z DAPI (modro). Jedra so kontrastno obarvana z DAPI (modro). Slike so bile posnete pri povečavi 10x na fluorescenčnem mikroskopu EVOS FL. Merilo: 400 $\mu\text{m}$ .....	111

# 1 UVOD

Uporabne in stabilne celične kulture odraslih astrocitov še nimamo. V raziskovalni praksi zato težimo k razvoju laboratorijskega protokola, ki bi omogočal vzpostavitev celične kulture človeških astrocitov odraslih darovalcev, z namenom proučevanja njihove vloge pri nevrodegenerativnih boleznih. Zato naš raziskovalni problem, ki smo ga opisali v doktorski disertaciji, zajema razvoj hitrega, uporabnega in enostavnega protokola za izolacijo in gojenje človeških astrocitov starejših ljudi, ki so uporabni za celično kulturo, ki je potrebna pri izdelavi celičnega modela za študij nevrodegenerativnih obolenj.

Razvoj takšnega laboratorijskega protokola ni enostaven. Zajema najprej pravilen in natančen odvzem možganskega tkiva, nato pa obdelavo v celičnem laboratoriju in postopke izolacije ustrezne vrste celic, v našem primeru astrocitov. Iz možganskega tkiva lahko namreč izoliramo tudi druge celice, kot so mikroglija, nevroni, mikrovaskularne celice, oligodendroglia ... Namen izolacije je odvisen od njihove nadaljnje uporabe in proučevanja. Zaradi izjemno pomembne funkcije, ki jo imajo astrociti pri fizioloških in patoloških procesih v možganih, predvsem pri nastanku nevrodegenerativnih bolezni, smo se v doktorski disertaciji omejili na to vrsto celic. Tako bomo v sledečih poglavjih uvodnega dela predstavili značilnosti in vlogo astrocitov *in vivo* ter njihov pomen pri nevrodegenerativnih obolenjih, problematiko obstoječih astrocitnih celičnih kultur in pomen razvijanja novih izolacijskih tehnik, vire tkiva za izolacijo, metode vzorčenja tkiv ter dosedanja dognanja na tem področju. V eksperimentalnem delu bo sledil opis nove metode za izolacijo astrocitov in njihove karakterizacije, v razpravi pa iztočnice za nadaljnjo uporabo astrocitov v eksperimentalnih modelih za študij nevrodegenerativnih obolenj in težnjo po izolaciji ostalih celic glije iz možganskega tkiva.

## 2 ASTROCITI IN NEURODEGENERATIVNE BOLEZNI

Z napredkom sodobne medicine in izboljšanjem življenjskega standarda se v razvitih državah v zadnjih desetletjih podaljšuje življenjska doba, kar vodi v višanje deleža starejšega prebivalstva (Mathers idr. 2015, 540-541; Partridge idr. 2018, 45; Robbins idr. 2018, 1-2). V novodobnem času so prioritetni cilji sodobne skupnosti po vsem svetu izboljšanje in ohranjanje zdravstvene kakovosti starejšega prebivalstva ter zmanjševanje stopenj oviranosti, ki so s staranjem povezane (Glei idr. 2011; Robbins idr. 2018, 1-2). Zaradi tega se v zadnjih letih povečuje aktivna vloga družbe v skrbi za starejše. Tudi pri Svetovni zdravstveni organizaciji (WHO) so za enega od dolgoročnih ciljev določili prizadevanja za aktivno in zdravo staranje. S tem bi se izboljšala kvaliteta življenja starejših, seveda ob predpostavki, da jim bo dobro služilo tudi zdravje (WHO 2002, 1-3; WHO 2004, 211; Maurice 2016, 109-110).

V zadnjem času se aktivna vloga v skrbi za starejše kaže tudi z izobraževanjem in intenzivnim vključevanjem specializiranih kadrov, ki so namenjeni njihovi oskrbi. Med njimi so pomembni socialni gerontologi (Arai idr. 2012, 18-19; Burns in Nair 2014, 5). Ti sicer delujejo na vseh področjih, ki zajemajo problematiko starejših. Lahko aktivno sodelujejo z zdravstvenimi dejavnostmi pri preventivnih aktivnostih in ozaveščanju starejših o zdravem življenjskem slogu, ki postaja eno od vodil ne le starejših ljudi, ampak vse družbe. Glede na to, da se življenjska doba podaljšuje, sta namreč promocija zdravja in trud za preprečevanje bolezni nujno potrebna (Karp 2008, 3; Robbins idr. 2018, 1-2; Aronoff-Spencer idr. 2020, 10-12). Zato so dejavnosti socialnih gerontologov prav posebno pomembne. Cilj je vzpostaviti mrežo celovite oskrbe za ljudi, ki jo potrebujejo, in izboljšati psihofizično kondicijo ter življenjski slog starejših (Urtamo idr. 2019, 359-361). Te aktivnosti vključujejo neprestano poudarjanje pomena krepitve in vzdrževanja dobre kondicije in ozaveščanje pri promociji aktivne starosti z izboljšanjem mentalne in telesne komponente posameznika (WHO 2004; Burns in Nair 2014, 5; Luo in Li 2020, 841-842). V prihodnosti bo zato še bolj pomembno intenzivno vključevanje socialnih gerontologov v omenjeno problematiko in tesnejšo integracijo z zdravstvenim sistemom na primarnem in sekundarnem nivoju zdravstvenega varstva (Burns in Nair 2014, 5-7; Luo in Li 2020, 841-842).

Zdravje je eden izmed najpomembnejših dejavnikov kakovosti življenja (Urtamo idr. 2019, 359-360). Zdravje in s tem kakovost življenja pa lahko različne bolezni močno poslabšajo. Ni nujno, da se te pojavijo samo v obdobju staranja, ampak lahko nastanejo tudi v mlajših letih, čeprav so v starosti bolj pogoste. V obdobju staranja se namreč pojavijo številne spremembe, ki so lahko kognitivne, telesne, psihološke in socialno-ekonomske (Karp 2008, 19-21; Panza idr. 2018, 994; Luo in Li 2020, 841-842). Staranje je zapleten proces, ko v organizmu prihaja do različnih telesnih sprememb, ki so navadno najprej vidne (Reinders idr. 2017). Te so večinoma postopne in različno prizadenejo organe. Telo postaja počasi vedno manj zmogljivo in odporno, pojavljajo se različne degenerativne spremembe in bolezni, kar se kaže v spremembi psihofizične kondicije. Večinoma gre za kronično potekajoče bolezni, ki se lahko včasih kažejo z akutnimi zapleti (Fried idr. 2001; Cheng idr. 2015). Spremembe se ne pojavijo le na notranjih organih, ampak se spreminja tudi mišično-skeletni sistem, čutilne sposobnosti, predvsem pa postaneta drugačna miselna gibčnost in spomin (Fried idr. 2001; Reinders idr. 2017). Prav neurodegenerativna obolenja so v starosti zelo pogosta, čeprav se lahko pojavijo tudi pri mlajših ljudeh (Partridge idr. 2018, 45). Vodijo k spremembam osebnosti in intelekta, posredno slabijo tudi splošno odpornost, kondicijo in delovanje telesa. Na dolgi rok vodi to k poslabšanju kakovosti življenja, ne glede na to, ali je človek star ali mlad (Partridge idr. 2018, 45; Walker idr. 2019, 75; Borders idr. 2021).

S staranjem se spreminjajo vsi organski sistemi, vendar zelo različno (Hubbard idr. 2010; Gradišnik 2017, 12-14). Eden izmed njih je tudi živčevje, ki ga lahko prizadenejo različne neurodegenerativne bolezni. Te so definirane kot napredujoč in nepovraten upad nevroloških funkcij, ki so posledica propadanja živčnih celic ali nevronov (Gouras 2005, 259). Prizadete so lahko različne funkcije, od kognitivnih do gibalnih (Gouras 2005, 259; Huse idr. 2005, 125; Walker idr. 2019, 75). Neurodegenerativne bolezni so zelo razširjene in predstavljajo velik javnozdravstveni problem zaradi velikega pritiska na zdravstvene, socialne in gospodarske sisteme, predvsem pa zmanjšujejo kvaliteto življenja obolelih in njihovih družin (Burns in Nair 2005, 5; Gouras 2005, 259; Hurd idr. 2013, 1326; Scheltens idr. 2021). S starostjo in s podaljševanjem življenjske dobe raste tveganje za nastanek neurodegenerativnih bolezni. Zdravljenje lahko pomaga pri lajšanju nekaterih simptomov in upočasni napredovanje bolezni. Kljub intenzivnim raziskavam zaenkrat še ni znanih načinov zdravljenja, ki bi ta obolenja lahko popolnoma pozdravili. Zaradi tega je nujno izboljšati



naše razumevanje vzrokov nevrodegenerativnih bolezní in razviti nove pristope za njihovo raziskovanje, zdravljenje in preprečevanje (Ferreira idr. 2021, 1127-1129; Onyango idr. 2021, 1467). Najpogostejši nevrodegenerativni obolenji sta Alzheimerjeva demenca in Parkinsonova bolezen (Canter idr. 2016, 187; Scheltens idr. 2016, 505-506; Li idr. 2019, 664-667). Prva je glavni vzrok za demenco in zato eden od najpomembnejših zdravstvenih izzivov 21. stoletja. Ocenjujejo, da 40 milijonov ljudi, starejših od 60 let, po svetu boleha zaradi demence tega tipa in da se bo do leta 2050 pojavnost te bolezni v Evropi podvojila, v svetovnem merilu pa potrojila (Panza idr. 2015, 749; Searle in Rockwood 2015, 4; Scheltens idr. 2016, 505-506; Panza idr. 2018, 993-995). Parkinsonova bolezen je druga najpogostejša nevrodegenerativna bolezen. Prisotna je pri 3 % ljudi, starejših od 65 let. Tudi njena pojavnost bo v naslednjih letih narasla (Espay idr. 2018, 800-801; Jo idr. 2021, 1; Ntetsika idr. 2021, 1). V populaciji starejših so podtipi demence pogosto mešani, kar je klinično pomembno. Ostale vrste nevrodegenerativnih obolenj vključujejo Huntingtonovo bolezen, amiotrofično lateralno sklerozo, Friedrichovo ataksijo, spinalno mišično atrofijo, spinocerebelarno ataksijo, bolezen Lewijevih teles, bolezen motoričnih nevronov, vaskularne demence in prionske bolezni. Tudi te vrste obolenj so v porastu in učinkovitega zdravljenja zaenkrat še ne poznamo (Jack idr. 2015, 512; Wyss-Coray 2016, 180-182; Gitler idr. 2017, 499; Geser idr. 2020; Kwon in Koh 2020, 1-2; Duong idr. 2021, 2-5; Mehta in Schneider 2021, 237-238). Nevrodegenerativne bolezni nastanejo zaradi disfunkcije in degeneracije živčnih celic v centralnem ali perifernem živčevju, kar se kaže s klinično simptomatiko, ki je od bolezni do bolezni različna (Gouras 2005, 259; Scheltens idr. 2016, 506). Seveda pa živčne celice ali nevroni niso edina komponenta, ki je vpeta v patogenezo nevrodegenerativnih bolezní. Vanjo vstopajo vse sestavne celice živčevja in povezave z drugimi organskimi sistemi v telesu. Eden od pomembnih dejavnikov pri nastanku teh obolenj so astrociti (Temple in Alvarez-Buylla 1999, 137-139; Li idr. 2019, 664-667; Kwon in Koh 2020, 3-5; Ding idr. 2021, 1702).

Astrociti ali astroglia so ene izmed glavnih celic centralnega živčevja (Bedner idr. 2019; de Majo idr. 2020). So glavna celična sestavina v možganih in hrbtenjači. Ocenjujejo, da pri ljudeh nekatere možganske regije vključujejo celo od 25 % do 50 % astrocitov celotnega volumna možganskega tkiva, celo več, kot je v teh predelih število nevronov (Hansson 1988, 370; Montgomery 1994, 145-147; Sofroniew in Vinters 2010; de Majo idr. 2020). V fizioloških in patoloških okoliščinah sodelujejo pri številnih pomembnih funkcijah za

normalno delovanje centralnega živčevja, kot so sinaptični prenos, obdelava informacij v nevronskih vezjih, vzdrževanje sinaps in nevronskega mikrookolja, sodelovanje pri migraciji nevronov, modulacija imunskih reakcij (Espay idr. 2018; Ntetsika idr. 2021) ... Njihovo ime izhaja iz grščine in pomeni zvezdo. Tako so bili poimenovani zaradi svojega značilnega videza "zvezd na nočnem nebu" v vzorcih, obarvanih po Golgiju. V preteklosti je izraz nevroglia vključeval vse podporne celice v centralnem živčnem sistemu in je v uporabi še danes (Montgomery 1994, 145-147; Jo idr. 2021, 1). Dolgo je veljalo, da je funkcija astrocitov omejena le na podporne in strukturne vloge, in da se te celice na bolezni ali poškodbo odzivajo indolentno in v veliki meri stereotipno (Kimelberg 2004, 191-192; Ntetsika idr. 2021, 1-2). S sodobnimi raziskavami pa so potrdili veliko morfološko raznolikost astrocitov, tako v celičnih kulturah kot v organizmih (Espay idr. 2018, 800-801; de Majo idr. 2020, 2-3; Ntetsika idr. 2021). Novi dokazi so pokazali, da imajo astrociti veliko bolj zapletene, specifične in pomembne vloge v centralnem živčnem sistemu, kot so jim jih v preteklosti pripisovali (Wang in Bordey 2008; Ding idr. 2021). Zaradi različnih oblik in funkcij so te celice danes prepoznane kot primarni odzivniki v fizioloških in patoloških pogojih. Zanimanje za astrocitate se je v zadnjih desetletjih močno povečalo, zlasti zaradi napredka na področju celične biologije, fiziologije, tehnik celičnih kultur in bolj natančnih metod za identifikacijo teh celic, vključno z imunocitokemičnimi metodami (Condic idr. 2014). Poleg zagotavljanja homeostaze so astrociti vključeni tudi v nastanek neurodegenerativnih bolezni, predvsem pri starejših ljudeh. Delovanje astrocitov v teh nevropatoloških mehanizmih je posledica izgube normalnih homeostatskih funkcij in posledično normalne nevronske aktivnosti, kar se klinično kaže kot bolezen (Rinaldi in Caldwell 2013; Ferrer 2017, 648-565; Izrael idr. 2020, 2-4; Acioglu idr. 2021; Ding idr. 2021; Sarkar in Biswas 2021).

V eksperimentalnih pogojih, torej *in vitro*, ko proučujemo mehanizme vpetosti astrocitov v patofiziološke procese, uporabljamo celične kulture teh celic (Wu idr. 2019; Zhang idr. 2020). Vključujemo jih v različne eksperimentalne modele ali funkcionalne celične modele (Rinaldi in Caldwell 2013, 1054-1055; Thomsen idr. 2015). Celične kulture astrocitov, ki jih uporabljamo v raziskovalnih aktivnostih, so navadno živalskega izvora. Izoliramo jih iz živalskih tkiv, torej možganov in hrbtenjače (Denis-Donini idr. 1984; Garcia-Abreu idr. 1995; Kimelberg 2004; Sofroniew in Vinters 2010, 7-9; Chew idr. 2014, 125). Rezultatov eksperimentov na živalskih celicah pa ni mogoče neposredno prenesti na človeka. Živalske

celice imajo drugačne značilnosti, zato v eksperimentalni praksi težimo k uporabi človeških kultur (Kimelberg 2004; Lee idr. 2008). Človeške astrocite je težko izolirati in gojiti v kulturi. Opisanih je le nekaj zapletenih protokolov za izolacijo fetalnih astrocitov (Sharif in Prevot 2012). Te celice v pogojih *in vitro* težko rastejo, njihovo gojenje je zapleteno in izkupiček izolacije majhen. Podatkov o izolacijah astrocitov odraslih darovalcev ni (Oberheim idr. 2009; 3276; Sharif in Prevot 2012, 137). Predvsem pa ni poznanih izboljšanih, kratkih izolacijskih protokolov, ki bi bili uporabni za izolacijo astrocitov pri darovalcih po poškodbi glave (Chaboub in Deneen 2012; Sharif in Prevot 2012, 138). Za študij nevrodegenerativnih bolezni pri starejših namreč potrebujemo človeške astrocite starejših darovalcev, in sicer takšne, ki niso bili izolirani pri bolnikih z možganskimi tumorji ali nevrološkimi obolenji. Te celice namreč niso primerne za omenjene raziskave, zato so idealni darovalci tkiva pacienti po operacijah poškodb glave in nerupturiranih anevrizem (Oberheim idr. 2009, 3277; Sofroniew in Vinters 2010, 8; Sharif in Prevot 2012, 137).

## 2.1 Proces staranja

Starost označujemo kot življenjsko obdobje, ki ga navadno v literaturi določimo s kronološko starostjo nad 65 let (Holick 2007; Rizzoli idr. 2014). Izboljšanje splošnega življenjskega standarda in napredek sodobne medicine, ki nas spremlja v zadnjih desetletjih, je pripomogel k daljšanju življenjske dobe svetovnega prebivalstva, kar pa pomeni tudi višji delež starejših ljudi v družbi. Zato se tudi v strokovni literaturi mnenja o meji starosti razlikujejo in se v zadnjih desetletjih te meje višajo. Tako je mejnik za starost po novem velikokrat postavljen v 70. ali 75. leto, včasih pa celo nad 85 let (Holick 2007; Cheng idr. 2015). Razlike pri določanju starostne meje so posledica razlik med kronološko enako starimi ljudmi. Prav zaradi tega različni avtorji navajajo štiri vrste starosti:

- Kronološko starost, ki je določena z letnico rojstva in predstavlja dejansko število let nekega človeka.
- Biološko starost ali funkcionalno starost, ki se nanaša na posameznikove fizične spremembe, ki zmanjšujejo učinkovitost organskih sistemov. Pove, koliko je telo staro glede na pravilno delovanje osnovnih telesnih funkcij in celičnih procesov.
- Psihološka starost, ki se kaže v tem, kako človek sprejema in doživlja svojo trenutno starost oziroma, koliko se posameznik počuti star.

- Socialno starost, ki jo opredeljujejo družbeno pripisane norme, starostno ustrezno ravnanje in starost kot družbeni konstrukt. Tako kot se ljudje starajo, se tudi njihove družbene vloge in odnosi v procesu staranja spreminjajo (Goriup in Lahe 2018, 28-29).

Naraščanje starosti prebivalstva pa je s seboj prineslo tudi vse več akutnih in kroničnih bolezni, ki so predvsem opazne pri starejših prebivalcih razvitega sveta, saj se je tukaj življenjska doba v zadnjem času najbolj podaljšala. Vsa ta obolenja so v tem obdobju pogosta in značilna za starajoči se organizem (Dziechciaż in Filip 2014; Cervera-Crespo in González-Alvarez 2017).

### 2.1.1 Spremembe organizma med staranjem

Spreminjanje organizma, ki poteka v obdobju staranja, je ireverzibilno (Wang in Oliver 2018). Prihaja namreč do številnih sprememb na različnih področjih, ki so lahko I) telesne, II) kognitivne in psihološke ter III) socialno-ekonomske (Gradišnik 2017, 17-30). Različni reparativni in obrambni mehanizmi, ki jih organizem ima, lahko do določene stopnje ohranjajo in v manjši meri tudi obnavljajo delovanje tkiv in organov (Zhang in Duan 2018). Ker vse te spremembe telesa med staranjem vplivajo na človeka, na njegovo počutje, doživljanje in odzivanje na starost, ga lahko v različni meri prizadenejo in s tem poslabšajo kvaliteto življenja. Z različnimi preventivnimi in kurativnimi pristopi lahko do določene mere na ohranjanje zdravja in dolgoživost vplivamo od zunaj in jih zato uporabljamo pri zaviranju nastanka mehanizmov staranja (Landau 2007; Cesari idr. 2016).

#### Telesne spremembe

Staranje je življenjsko obdobje, ki je neizbežno in nezadržno. Je čas, ko v telesu nastajajo nepovratne spremembe, zato se začnejo pojavljati določene bolezni, na katere pa z zdravili v večji meri ne moremo vplivati (Falsarella idr. 2015). Nekatere težave lahko do določene mere lajšamo in blažimo, vendar pa počasno upadanje delovanja organov napreduje zaradi staranja celic. Tako se pojavijo spremembe v mišično-skeletnem sistemu, spremenita se spomin in miselna gibčnost ter zmanjšajo čutilne sposobnosti. Vse to vpliva na človekovo psihofizično kondicijo. Ker telo postaja postopoma vse manj zmogljivo in odporno se ljudje na te spremembe odzivajo različno (Falsarella idr. 2015; Gradišnik 2017, 17-28). Med staranjem je povečan tudi nastanek spremljajočih bolezni. Te največkrat prizadenejo kardiovaskularni sistem, dihala, živčevje in mišično-skeletni sistem (Dziechciaż in Filip

2014; Cheng idr. 2015; Falsarella idr. 2015). Večina bolezni kaže kroničen potek, ki se jim včasih pridružijo akutni zapleti. Po podatkih iz literature je tako pri 80 % ljudi, starejših od 65 let, prisotna ena kronična bolezen, 52 % pa se zdravi zaradi dveh (Gradišnik in Velnar 2017, 3-5). Organskim težavam je lahko velikokrat pridružena tudi depresivna simptomatika. Verjetnost za njen nastanek je večja pri ljudeh s pridruženimi psihoorganskimi motnjami in težavami s psihičnim zdravjem, kot so kognitivne okvare, demenca, različne vrste oviranosti, tudi socialna izolacija, in pri tistih z nižjim socialno-ekonomskim položajem. Ugotovljeno je bilo, da tudi izobrazba lahko vpliva na nastanek depresije, ker predstavlja pomemben dejavnik pri vzdrževanju kognitivne prilagodljivosti in gibčnosti in s tem vpliva na uvid v morebitno bolezensko stanje, na razumevanje življenjske situacije in dovzetnost za zdravljenje. Velikega pomena za kvalitetno staranje je vprašanje, kako se staramo (Hanson idr. 2016; Gradišnik 2017, 22-25). Kadar je človek zdrav ali pa so težave zaradi bolezni neznatne, je lahko staranje tudi aktiven in prijeten proces. Prav zato je tudi v starosti potrebno živeti v skladu s pregovorom zdrav duh v zdravem telesu, saj sta telesna in duševna komponenta organizma enako pomembni (Gradišnik 2017, 11-14; Reinders idr. 2017).

#### Kognitivne in psihološke spremembe

Kognitivne in psihološke spremembe, ki nastopijo v času staranja, ljudje dojemajo različno (Cieri idr. 2017; Reinders idr. 2017). Poleg tega, da organizem postaja polagoma vse manj odporen in zmogljiv, se začnejo pojavljati tudi določene degenerativne spremembe organov in tkiv ter bolezni, vse to pa se zrcali v spremenjeni psihofizični kondiciji (Cieri idr. 2017; Gradišnik 2017, 18-20). Nekateri ljudje se z nastankom teh težav lahko včasih zelo težko in počasi sprijaznijo, čeprav so še vedno mentalno in fizično v dobri kondiciji (Robertson in Browne 1953; Mata in Helversen 2015; Borders idr. 2021).

V starosti so težave s spominom velikokrat prisotne (Walker idr. 2019; Borders idr. 2021). Nastopijo kot posledica fizioloških sprememb, ki se pojavijo v živčevju. Možgani so tukaj bolj povrženi degeneraciji nevronov kot pa hrbtenjača. Zaradi redčenja in upadanja njihovih medsebojnih povezav ter zmanjševanja števila nevronov, ki so posledica neurodegenerativnih sprememb, se anatomska masa možganskega tkiva manjša, kar se makroskopsko kaže kot atrofija. Mikroskopske in imunohistološke preiskave pa kažejo na zmanjševanje števila nevronov in upadanje njihovih medsebojnih povezav. Klinično se to

lahko kaže kot različne stopnje kognitivnega upada (Robertson in Browne 1953; Gradišnik 2017, 23-27). Stari ljudje se velikokrat pritožujejo, da si težje zapomnijo različne stvari, predvsem tiste, ki so se pred kratkim zgodile. Ker lahko take težave nastanejo pri priklicu podatkov iz spomina in pri pomnjenju novih informacij, so lahko tudi čustveno prizadeti. Po drugi strani pa se dobro zavedajo preteklih dogodkov (Robertson in Browne 1953; Mata in Helversen 2015; Gradišnik 2017, 22-25; Borders idr. 2021). Motnje kognicije so lahko različne, tako po etologiji, kot po kliničnih značilnostih in lahko človeka prizadenejo v različnem obsegu. Tudi zato sta v tem obdobju pomoč in skrb za starejše potrebna že zaradi tega dejstva, sicer v različnem obsegu od človeka do človeka (Robertson in Browne 1953; Gradišnik 2017, 22-24).

Ker je pešanje spomina v starosti selektivno, sta kratkoročni in dolgoročni spomin lahko različno prizadeta (Gradišnik 2017, 21-26; Gradišnik in Velnar 2017, 3-6). Navadno je bolj prizadet kratkoročni spomin. To povzroči, da je otežkočeno pomnjenje tistih dogodkov, ki so se pred kratkim zgodili. Pešanje kratkotrajnega spomina, kadar to ni preveliko, pa včasih starejši ljudje na osnovi svojih bogatih izkušenj, ki jih navadno imajo, lahko dobro kompenzirajo. Tako se lahko na osnovi izkušenj in prevajanja le-teh v življenje v različnih situacijah celo bolje znajdejo kakor mlajši (Dziechciaż in Filip 2014; Borelli idr. 2018; Borders idr. 2021). V nekaterih primerih lahko določene procese pešanja spomina upočasnimo, saj je spomin mogoče do neke mere tudi trenirati (Dziechciaż in Filip 2014; Gradišnik 2017, 17-19). To pomeni, da z redno mentalno aktivnostjo do neke mere lahko upočasnimo in preprečujemo napredovanje kognitivnega upada. Izgubo spomina in zmanjšanja miselne gibčnosti ter kognitivnih spretnosti lahko pospešijo tudi različne poškodbe, okvare in bolezni možganov, vendar pa imajo vse te svoj patofiziološki vzrok (Dziechciaż in Filip 2014; Borella idr. 2017; Gradišnik 2017, 18-21).

V obdobju staranja se ljudje tudi osebnostno spreminjajo in določene osebnostne lastnosti pridejo takrat bolj do izraza ali pa se na novo razvijejo (Gradišnik 2017, 19-25). Nekatere od njih so lahko tudi nezaželene, kot so zmanjšana toleranca v določenih situacijah, sumničavost, spremembe čustev in spomina. Večkrat lahko nastopijo tudi nihanja in spremembe v razpoloženju. Seveda je to lahko tudi posledica določenih bolezenskih sprememb, ki prizadenejo možgane (Hurd idr. 2013, 1326; Borders idr. 2021; Scheltens idr. 2021). Tako je v starosti precej pogost nastanek depresivne simptomatike, ki pa lahko nastopi tudi v povezavi z demenco. Depresija se lahko kaže v različnih obsegih, od

manifestne do okultne oblike in se velikokrat zgodi, da je pri starejših ne prepoznamo ali zamenjamo za kakšno drugo obolenje (Robertson in Browne 1953; Legdeur idr. 2017). Iz poročil v literaturi je znano, da je depresija zares pogosta pri starejših ljudeh in da je nevarnost za njen nastanek in pojavnost ostalih psiholoških oviranosti zaradi ekonomskih, socialnih in psihofizičnih sprememb večja. Pojavnost depresivnih simptomov se pri starejši populaciji lahko giba tudi do 40 % (Cieri idr. 2017; Gradišnik in Velnar 2017, 4-7). Huda oblika depresije je tudi eden od dejavnikov tveganja za nastanek samomora, ki je po nekaterih podatkih pri starejših ljudeh dvakrat bolj pogost kot pri ljudeh v srednjih letih (Cieri idr. 2017; Gradišnik 2017, 19-23). V najtežjih primerih je depresijo potrebno zdraviti, kar pa je pri starejših manj uspešno, dolgotrajno in težje, zato je v tej starostni skupni toliko bolj pomembno njeno zgodnje odkrivanje in preprečevanje. Seveda pa je depresivna simptomatika lahko tudi spremljevalec raznih akutnih in kroničnih obolenj, ki se začnejo pojavljati v obdobju staranja (Robertson in Browne 1953; Cieri idr. 2017; Gradišnik 2017, 25-27).

#### Spremembe v socialni mreži

Družba in človek, ki predstavljata širšo in ožjo okolico, sta še dva dejavnika, ki sta odločilna za kakovostno življenje v starosti in se med seboj prepletata. Zaradi spreminjanja socialne mreže v času staranja, so včasih v tem obdobju socialne spremembe za človeka še posebej problematične (Gradišnik 2017, 24-26). Prihaja do krčenja socialnih povezav in s tem povezanih sprememb v socialnem okolju, zato je dobro počutje starejših lahko moteno. Socialne povezave namreč izrazito vplivajo na starejše ljudi in znano je, da je dobro počutje odvisno tudi od ohranjanja medsebojnih stikov in od dobre komunikacije v ožjem in širšem okolju, kjer starejši posameznik živi in deluje (Commisso idr. 2017; Gradišnik 2017, 17-26; McGilton idr. 2018).

V obdobju staranja pride do številnih sprememb na področju socialne strukture. Prisotne so spremembe družinske strukture in kroga sorodnikov in znancev. Pojavi se lahko stres zaradi socialne izolacije ob upokojitvi. Poleg tega lahko nastopijo tudi nekatere omejitve zaradi zmanjšane mobilnosti. Te so rezultat zdravstvenih ovir, ki se takrat začnejo pojavljati ali poglobljati. Vsi ti dejavniki lahko dodatno zmanjšajo in poslabšajo socialne stike in starejšega človeka odtegnejo od sodelavcev in prijateljev ter ga tako naredijo še bolj občutljivega na samoto. Take spremembe, če trajajo dolgo in na človeka močno vplivajo,

lahko vodijo tudi v nekatera bolezenska stanja, predvsem v psihosomatske bolezni in v nastanek depresije, kar pa velikokrat še dodatno prispeva k poslabšanju socialne izoliranosti (Gradišnik 2017, 14-17; Gradišnik in Velnar 2017, 5-8). Znano je, da imajo starejši ljudje, ki uživajo močno emocionalno podporo in se veliko družijo s prijatelji in svojimi družinskimi člani, tudi manj zdravstvenih težav. Ugotovitve potrjujejo, da je pri teh ljudeh življenjska doba daljša in da je manjša pojavnost kognitivnega upada (Commisso idr. 2017; Fukuda idr. 2017). Tudi psihofizična kondicija in socialna vključenost sta med seboj zelo povezani. Zdravi ljudje so bolj aktivni, s tem pa se krepijo tudi socialne povezave. Različna obolenja, ki zmanjšajo posameznikovo samostojnost, kot so motnje kognitivnih funkcij, depresija in druge psihiatrične težave, negativno vplivajo na možnost srečevanja z znanci in ustvarjanja socialnih stikov. Tudi ovire v gibanju, kot so huda mišično-skeletna obolenja ali motnje ravnotežja, lahko omejijo delovanje lokomotornega aparata in mobilnost starejšega človeka (Hata in Nakajima 2000; Strauss-Blasche idr. 2002). Raziskave so potrdile, da medsebojni stiki pripomorejo k izboljšanju počutja in blagodejno vplivajo na organizem. To velja za vse vrste druženja, kjer se posameznik dobro počuti, uspešno navezuje stike in je sprejet v družbo. Socialna vključenost starejših prispeva k izboljšanju zdravja in splošne fizične in psihične kondicije, kar pa omogoča tudi krepitev medgeneracijskega sožitja in posledično vodi k povečanju doprinosa te starostne skupine k skupnosti. To pa je tudi eden izmed poglavitnih elementov za uspešno staranje v vseh pogledih (Arai idr. 2012; Douglas idr. 2016; Gradišnik 2017, 6-9). Telo in duh sta med seboj tesno povezana in izboljšanje ene komponente ima ugoden vpliv tudi na izboljšanje druge (Strauss-Blasche idr. 2000; Strauss-Blasche idr. 2002).

Dve komponenti, ki določata pot uspešnega staranja, sta tudi posameznikova sposobnost prilagajanja na raznovrstne spremembe v tem obdobju in dobro počutje. Osnova za dobro počutje v starosti in potek kakovostnega staranja pa ob dobri socialni vključenosti omogočata še primerna prehrana in ustrezna telesna dejavnost (Gradišnik in Velnar 2017, 3-7). Veliko starejših ljudi se zdravi zaradi različnih kroničnih obolenj in ti kljub temu poskušajo obdržati čim bolj aktiven življenjski slog. Poleg vzdrževanja splošne telesne kondicije to pomaga tudi pri vzdrževanju samozavesti in dobrega počutja. Dokazano pa je, da redna telesna aktivnost, predvsem kadar je povezana z mentalno aktivnostjo, ugodno deluje tudi na ohranjanje kognitivne kondicije (Schmidt idr. 2016; Gradišnik 2017, 23-26). Tako so ugotovili, da ples zelo dobro deluje kot sredstvo za preprečevanje kognitivnega



upada in celo izboljša stanje pri tistih ljudeh, ki že kažejo blage znake kognitivnega poslabšanja. Poleg ugodnih učinkov plesa so ugotovili tudi koristno delovanje drugih aktivnosti, predvsem tistih, ki so povezane z umetnostnim udejstvovanjem, kot je glasba, drama in ostale vizualne umetnosti (Zhu idr. 2020, 679; Fong idr. 2021, 1605).

Uporabnost in praktičnost socialnih povezav za starejše ljudi in njihov blagodejni vpliv na dolgoživost bi tudi v družbi in stroki morali bolj poudarjati. Socialni gerontologi so eden izmed profesionalnih profilov, ki v družbi in stroki k temu lahko pripomorejo in jih bo zato v prihodnjem času potrebno še bolj aktivno vključevati v te dejavnosti (Schmidt idr. 2016; Zhu idr. 2020). Socialni gerontologi lahko s poznavanjem in razumevanjem problematike staranja pomagajo k izboljšanju kvalitete življenjskega sloga starejših, sodelujejo pri spodbujanju njihove psihofizične kondicije, socialnih stikov in povezav ter prispevajo k tako imenovani kakovostni in zdravi starosti (Arai idr. 2012; Schmidt idr. 2016; Chan idr. 2020, 80).

#### Ekonomske spremembe v staranju

Ekonomske spremembe so prav tako tehten dejavnik, ki ga v starosti ne moremo zanemariti (Borg idr. 2006, Gradišnik 2017, 16-18). Samostojnost je do neke mere odvisna tudi od finančne preskrbljenosti, saj ta omogoča samostojnost in posamezniku dviguje kvaliteto življenja ter odpira različne možnosti, predvsem tiste, povezane s prostočasno aktivnostjo (Gradišnik 2017, 16-17; Gradišnik in Velnar 2017, 8). S tem pa so povezani tudi elementi, ki smo jih opisali v prejšnjih odstavkih. Nekateri ljudje uživajo v času upokojitve dober finančni priliv, večina starejših pa takrat občuti izrazita znižanja prihodkov, kar je velikokrat povezano predvsem z njihovim občutkom varnosti, to pa vpliva tudi na njihovo počutje (Borg idr. 2006). V Združenih državah Amerike in tudi drugod po svetu je to na primer povezano z zmanjšanimi izdatki za zdravstveno zavarovanje, ki si ga starejši zaradi visokih cen velikokrat ne morejo privoščiti, ali pa lahko plačujejo le osnovne zdravstvene storitve (Gradišnik in Velnar 2017, 19; Lee idr. 2018). V Sloveniji je na srečo ta problematika zaenkrat še relativno dobro rešena, obstajajo pa druge omejitve znižanja dohodkov, s katerimi se starejši srečujejo. Taka problematika je važna predvsem pri tistih, ki potrebujejo pomoč v različnem obsegu in zato bivajo v specializiranih institucijah, kot so varstveno-dnevni centri in domovi za starejše. Lahko se zgodi, da posamezniki in družina nimajo dovolj finančnih sredstev za take namestitve ali pa niso deležni ustrezne pomoči od takih ustanov.

Če je neurejeno tudi domače okolje, to lahko povzroči še dodaten stres in pripelje v osamo, poslabšanje zdravstvenega stanja in življenjskega stila (Borg idr. 2006; Novak Kožuh 2006; Gradišnik 2017, 24-26; Lee idr. 2018).

Kaj se nam obeta v prihodnosti?

Ob nastanku bolezni ali nastopu starostne oslabelosti lahko starejši hitro postanejo odvisni od oskrbe drugih (Strauss-Blasche idr. 2002; Zuskin idr. 2005). Do določene mere lahko postopno pešanje življenjske moči v obdobju staranja nekoliko omilimo in uravnotežimo, tako da spodbujamo vzdrževanje optimalne psihofizične kondicije. Na to področje se je vključila tudi Svetovna zdravstvena organizacija, ki je v svojem strateškem načrtu za enega izmed svojih ciljev določila tudi dejavnosti in prizadevanje za aktivno in zdravo staranje. Namen tega projekta je povečati delež starejših, ki čim dlje lahko živijo doma in ostanejo samostojni, ter tistih, ki lahko v družbi ohranijo dejavno vlogo in uživajo poln zdravstveni potencial (WHO 2002; WHO 2004; Maurice 2016). Čeprav je tukaj na prvem mestu aktivnost vsakega posameznika in tudi njegove ožje okolice, pa lahko k dosegu zastavljenih ciljev pripomore tudi družba. Stremenje k preventivnemu delovanju v vseh življenjskih obdobjih, preprečevanje nastanka bolezni, vzdrževanje zdravja in poudarjanje zdravega življenjskega sloga so le nekateri od teh temeljev, usmerjenih k aktivni starosti, kjer posamezniku ne odvzamemo odgovornosti za lastno zdravje (WHO 2004; Maurice 2016; Gradišnik 2017, 26-27). Ena od možnosti, s katerimi bi lahko družbeno okolje pripomoglo k izboljšanju statusa starejših ljudi v prihodnosti, predstavlja tudi bolj aktivno vključevanje ustreznih kadrov v to problematiko in bolj trdno povezovanje in združevanje z zdravstvenim sistemom na primarnem in sekundarnem nivoju zdravstvenega varstva. Ustrezen strokovni kader, kot so socialni gerontologi, je tukaj nepogrešljiv (Borg idr. 2006; Arai idr. 2012). Njihove aktivnosti bi bile ob sodelovanju starejših ljudi in njihovih družin ter drugih ustreznih služb usmerjene na individualno obravnavo s ciljem izboljšanja življenjskega sloga in psihofizične kondicije, ozaveščanju o pomenu zdrave, aktivne in kakovostne starosti in k vzpostavitvi mreže celovite in učinkovite oskrbe za ljudi, ki jo potrebujejo (Zuskin idr. 2005; Borg idr. 2006; Gradišnik 2017, 28-30).

Dva od odločilnih dejavnikov za uspešno in kakovostno preživljanje starosti sta tudi posameznikov nazor in zaznavanje ter njegov odnos do življenjskih preizkušenj in do življenja samega (Gradišnik 2017, 15-19). Posameznikov pogled na življenje in lastna

samopodoba sta močnejša od staranja in starosti, in to lahko poglobitno prispeva h kvalitetnemu staranju. Zato ju je potrebno negovati s strani posameznika in družbe, kjer pa lahko bistveno prispevajo prav socialni gerontologi (Alpass idr. 2007; Arai idr. 2012; Gradišnik 2017, 25-29).

## **2.2 Kratek pregled anatomskih in fizioloških značilnosti živčevja**

Živčni sistem sestavlja centralno in periferno živčevje (Nieuwenhuys idr. 2008; Širca 2020). K centralnemu spadajo možgani in hrbtenjača, k perifernemu pa periferni živci. Možgani in hrbtenjača so nameščeni v skeletni okvir, v lobanjo in hrbtenico, ki centralnemu živčevju nudi zaščito in oporo. Dodatno so možgani in hrbtenjača obdani in zaščiteni še s tremi ovojnicami ali meningami: s trdo možgansko ovojnico (*dura mater*), pajčevinasto ovojnico (*arachnoidea*) in mehko možgansko ovojnico (*pia mater*). Možgane lahko razdelimo na tri glavne regije: velike možgane, male možgane in možgansko deblo. Glede na svojo lokacijo vsi trije deli možganov v lobanji zajemajo tri lobanjske kotanje: sprednjo, srednjo in zadnjo, s tem da se možgansko deblo razprostira tudi v zgornje vratne segmente hrbtenice. Iz možganov izhaja 12 parov možganskih živcev. Hrbtenjačo sestavlja vratni, prsni, ledveni in križni del. Iz hrbtenjače izhajajo spinalni živci, od katerih je sedem parov vratnih, dvanajst prsnih, pet ledvenih in štirje križni (Fowler in Scadding 2003, 3-7; Rea 2015; Širca 2020).

### **2.2.1 Celična zgradba živčevja**

Živčevje je zelo zapleteno zgrajeno (Širca 2020). Sestavljeno je iz mreže živčnih celic ali nevronov in iz celic opornega tkiva, ki jih imenujemo nevroglija. Vse te celice med seboj sodelujejo in komunicirajo. Odgovorne so za številne in različne naloge živčevja. Te vključujejo zavest, čustva, mišljenje, vedenje, nadzor telesnih funkcij in še mnoge druge dejavnosti. Osnovne naloge živčevja so: I) odzivanje na spremembe iz telesa in iz okolice, II) vzdrževanje telesne homeostaze, III) uravnavanje delovanje organov in IV) je sedež višjih živčnih dejavnosti (Guyton in Hall 2006a, 555-558; Rea 2015; Gradišnik 2021, 19-22).

### 2.2.1.1 Neuron

Osnovna enota živčnega sistema so nevroni ali živčne celice (Nieuwenhuys idr. 2008). Živčevje gradi več kot sto milijard nevronov. Ti se med seboj združujejo v povezave, imenovane nevronske mreže. Neuron je sestavljen iz celičnega telesa ali perikariona. Perikarion vsebuje citoplazmo, ki jo pri nevronih imenujemo nevroplazma, in izrazito vidno celično jedro. V nevroplazmi so prisotne množične nevrofibrile in nevro tubuli ter celični organeli, ki so potrebni za normalne fiziološke funkcije nevrone. Ti celični organeli so podobni kot v ostalih telesnih celicah in vključujejo ribosome, mitohondrije, endoplazmatski retikulum in Golgijev aparat. Iz perikariona izvirajo tudi celični izrastki ali živčna vlakna. Večinoma ima neuron en daljši izrastek, ki ga imenujemo tudi akson ali nevrin, in več krajših izrastkov ali dendritov. Ti so največkrat zelo razvejani. Impulz se po nevrinu prenese iz telesa živčne celice do naslednjih efektorjev, ki so lahko nevroni, ali pa mišične in žlezne celice. V nasprotju z nevrini, ki prevajajo informacije, pa dendriti služijo sprejemanju živčnih impulzov iz bližnjih celic in jih posredujejo proti telesu nevrone. Aksoni in dendriti omogočajo komunikacijo nevronov tudi na velike razdalje. Snopi aksonov se med seboj združujejo in gradijo živce (Guyton in Hall 2006a, 555-558; Gradišnik 2021, 19-22).

Dražljaje, ki prihajajo iz oklice in iz telesa, nevroni sprejemajo in nanje odgovorijo z vzburjenjem, ki se po nevrinu prevaja v obliki spremembe akcijskega potenciala (Gradišnik 2021). Naprej na efektorje ali pa na druge živčne celice se dražljaj prenese preko živčnega stika ali sinapse, kjer so za prenos dražljaja potrebni posebni mediatorji ali kemični prenašalci. Tak mediator je na simpatičnih živčnih končičih noradrenalin, na parasimpatičnih živcih, v avtonomnih ganglijih in na nevro-muskularnih stikih pa acetilholin. Dražljaj lahko nevrone vzdraži posredno ali neposredno preko čutilnih celic, ki so specializirane za sprejemanje različnih dražljajev v telesu in v njegovi okolici. Dražljaj se lahko prenaša v dveh smereh: do efektorjev, torej iz centralnega živčevja proti periferiji, in v obratni smeri (Guyton in Hall 2006b, 673-679; Gradišnik 2021, 19-22).

Med nevroni obstajajo razlike v zgradbi in funkciji (Gradišnik 2021, 19-20). Po številu živčnih vlaken, ki izhajajo iz telesa nevrone, ločimo več vrst nevronov, saj lahko iz enega celičnega telesa izhaja od enega do več izrastkov oziroma živčnih vlaken. Tako imajo unipolarni nevroni samo en izrastek. Ti so najštevilnejši v mrežnici in v očesu. Bipolarni

nevroni imajo en nevrin in en dendrit in so pogosti v mrežnici, vohalni sluznici, v slušnem in ravnotežnem gangliju. Pri psevdounipolarnih nevronih se v bližini celičnega telesa nevrin in dendrit združita. Take nevrone najdemo v spinalnih ganglijih. Multipolarni nevroni imajo številne dendrite in samo en nevrin. Ti so najštevilnejši in gradijo možgane in hrbtenjačo. Obstajajo pa tudi apolarne živčne celice. Te nimajo izrastkov in so prisotne le v obdobju razvoja živčevja. Različne vrste nevronov imajo različne vloge in izvajajo ali nadzorujejo razne funkcije. Motorični nevroni so namenjeni prenašanju sporočil iz možganov v skeletne mišice in jih na tak način aktivirajo. Senzorični nevroni pa v možgane posredujejo sporočila o čutilnih zaznavah, kot so svetloba, zvok, okus, vonj, toplota in pritisk (Guyton in Hall 2006b, 673-674; Gradišnik 2021, 19-20).

Živčna vlakna se med seboj razlikujejo tudi po prisotnosti mielinske ovojnice, ki jih obdaja (Guyton in Hall 2006b, 675-680). Ta vsebuje velike količine lipidov in je namenjena izolaciji živčnih vlaken. Vlakna so torej lahko mielinizirana ali nemielinizirana. Mielin sestavlja 70 % lipidov in 30 % beljakovin, izdelujejo pa ga različne celice, ki se razlikujejo glede na to, ali jih najdemo v centralnem ali perifernem živčevju. V možganih in hrbtenjači so to celice oligodendroglije, v perifernem živčevju pa jih imenujemo Schwannove celice. Glede na anatomske delitev živčevja, spadajo mielinizirana vlakna v somatsko živčevje, nemielinizirana vlakna pa v vegetativno. Mielinizirana vlakna skupaj z opornim živčnim tkivom sestavljajo belo substanco centralnega živčevja. Siva substanca v centralnem živčevju pa je zgrajena iz teles živčnih celic, nemieliniziranih živčnih vlaken in opornega tkiva (Guyton in Hall 2006b, 675-680; Parkhurst in Gan 2010, 595).

Mielinska ovojnica na mieliniziranih vlaknih ovija aksone in ni kontinuirana preko celotne njihove dolžine, ampak je na določenih mestih vzdolž aksona prekinjena. Na teh področjih je celična membrana aksona ali aksolema neposredno odprta in izpostavljena zunajceličnemu prostoru. Te predele na aksonu, ki ne vsebujejo mielinske ovojnice, imenujemo Ranvierovi zažetki, ki vsebujejo veliko število ionskih kanalov (Guyton in Hall 2006b, 679-685). Ker sodelujejo pri izmenjavi ionov, so pomembni za generacijo akcijskega potenciala, ki je osnova električne aktivnosti vsake celice. Vlakna, ki mielinske ovojnice nimajo, pa so nemielinizirana. Ta so zaščitena ali obdana z oligodendroglijskimi celicami v centralnem živčevju in s Schwannovimi celicami v perifernem živčevju, tako da so ugreznjena v telo teh celic. Mielinizirana in nemielinizirana vlakna se razlikujejo tudi po hitrosti prevajanja živčnega impulza. Prva prevajajo živčni impulz s hitrostjo od 3 m/s do

100 m/s, po nemieliniziranih vlaknih pa je prenos impulza počasnejši. Običajne hitrosti prenosa so tukaj od 0,5 m/s do 2 m/s (Guyton in Hall 2006b, 675-680; Nieuwenhuys idr. 2008; Gradišnik 2021, 19-22).

### Prenos električnih signalov v živčevju

Da se lahko signal med celicami prevaja, se mora vzburjenje z ene celice prenesti na drugo (Guyton in Hall 2006b, 675-677). K temu pripomore celična membrana, ki je selektivno propustna ali selektivno permeabilna, in številni ioni v citoplazmi in medceličnem prostoru. Zaradi selektivne permeabilnosti celične membrane ioni v citoplazmi in v medceličnini ne morejo prosto prehajati med tema dvema predelkoma. Zato se koncentracije ionov na obeh straneh celične membrane razlikujejo. Za prenos dražljajev so najpomembnejši natrijevi, kalijeve in kalcijeve ioni. Za vzdrževanje razlike v njihovi koncentraciji na obeh straneh celične membrane pa je odgovorna natrijeva-kalijeve ionska črpalka ali natrijeva-kalijeve ATP-aza. Ta transmembranski protein prenaša natrijeve ione iz celice in kalijeve v celico, pri čemer je za njegovo delovanje potrebna energija v obliki ATP (adenozin-5-trifosfat). Zaradi delovanja te črpalke je koncentracija kalijevih ionov v citoplazmi mirujoče celice visoka, koncentracija natrijevih ionov pa nizka, saj zaradi slabe propustnosti natrijevi ioni skozi celično membrano težko prehajajo. Ker je v primerjavi z zunanostjo celice njena notranjost (citoplazma) negativno nabita, se preko celične membrane vzpostavi električna napetost, ki jo označujemo kot mirovni membranski potencial. Vrednosti mirovnega membranskega potenciala so negativne in se med nevroni razlikujejo. Znašajo od  $-60$  mV do  $-100$  mV. Rečemo, da je takrat celica polarizirana. Kadar pa se celica vzdraži, se ionski kanali v membrani odprejo in propustnost celične membrane se zanje spremeni. V celico iz medceličnega prostora vstopijo natrijev ioni, povečanje njihove koncentracije v citoplazmi zmanjša negativni naboj celice in s tem tudi električno napetost preko celice membrane. Zato se celični membranski potencial zviša in postane pozitiven, navadno do  $40$  mV. To spremembo celičnega membranskega potenciala imenujemo depolarizacija. Val depolarizacije se iz telesa nevrona širi do živčnih končičev, od koder se preko stika ali sinapse prenese naprej. Električno spremembo, ki je posledica širjenja depolarizacijskega vala, označujemo kot akcijski potencial. Depolarizacija je kratkotrajna in celična membrana po depolarizacijskem valu zopet dobi svoj negativni naboj, to pomeni, da se repolarizira. Pri tem sodeluje natrijeva-kalijeve ATP-aza, ki natrijeve ione črpa iz celice v medceličnino, kalijeve pa nazaj v citoplazmo. Takoj po repolarizaciji celice ni mogoče ponovno vzdražiti

in to obdobje imenujemo refraktarna perioda. Celoten cikel od vzdraženja do ponovne pripravljenosti celice na aktivacijo traja okrog 4 ms. Depolarizacija in repolarizacija zajemata po 1 ms, refraktarna doba pa od 1 ms do 1,5 ms (Guyton in Hall 2006b, 679-688; Rea 2015; Širca 2020; Gradišnik 2021, 19-22).

## Sinapsa

Sinapsa je mesto, kjer se stikata dve živčni celici ali pa živčna celica in efektor (Guyton in Hall 2006b, 676-678; Gradišnik 2021, 21). Na ta način se lahko vzburjenje po presinaptični celici skozi sinapso prenese na postsinaptično celico. Sinapse so prisotne med različnimi vrstami celic: med nevroni, med nevroni in čutilnimi celicami ali pa med nevroni in efektorji, kot so na primer mišične ali žlezne celice. Sinapse vplivajo na prenos vzburjenja in so zato lahko po svoji funkciji inhibitorne ali zaviralne, kjer se prenos vzburjenja zavre, in ekscitatorne ali vzbujevalne, kjer se vzburjenje ojača (Gradišnik 2021, 21). Med obema celicama, ki v sinapsi komunicirata, je prisotna drobna vrzel, ki jo imenujemo sinaptična špranja. Glede na prenos signala ločimo kemične in električne sinapse. Pri prvih poteka prenos na postsinaptično, receptorsko celico s pomočjo kemičnih prenašalcev, pri drugih pa prenos poteka s pomočjo električnega signala (Rea 2015; Širca 2020).

Signale preko sinaptične špranje v kemičnih sinapsah prenašajo kemični prenašalci (Fowler in Scadding 2003, 3-7; Rea 2015). Prenos je zato v primerjavi z električnimi sinapsami tukaj bolj počasen. Električni signal potuje po presinaptični celici do končnega ali terminalnega dela živčnega končiča. Po obliki je ta del bolj zadebeljen. Tukaj so shranjeni številni mešički ali vezikli, ki vsebujejo živčne prenašalce ali neurotransmiterje (Gradišnik 2021, 21). Električno vzburjenje se prenese do sinapse in v terminalnem delu živčnega končiča aktivira napetostno-odvisne kalcijeve kanale. Zvišanje koncentracije kalcija v citoplazmi je dražljaj za eksocitozo neurotransmiterja: vezikli z neurotransmiterjem potujejo do presinaptične membrane in ko se zlijejo z njo, se neurotransmiter sprosti v sinaptično špranjo. Neurotransmiter se na membrani postsinaptične celice veže na receptorje in tako se v njej sproži električno vzburjenje, s tem pa prenos signala. Glede na neurotransmiterje se kemične sinapse med seboj razlikujejo. Neurotransmiterji so različni: acetilholin, glutamat, noradrenalin in gama-aminomaslena kislina (GABA). Delovanje neurotransmiterja mora biti v sinaptični špranji omejeno, da postsinaptična celica ne bi ostala trajno vzdražena. Zato ga po določenem času encimi razgradijo. Tipičen primer kemične sinapse je motorična

ploščica, kjer se stikata živčna in mišična celica. Nevrotransmitter na motorični ploščici je acetilholin (Fowler in Scadding 2003, 3-7; Rea 2015; Širca 2020, Gradišnik 2021, 21).

Električne sinapse so drugače zgrajene od kemičnih. Tukaj sta presinaptična in postsinaptična membrana med seboj tesno v stiku. Električni tok lahko zato neposredno teče iz ene na drugo celico. Tako povezavo omogočajo presledkovni stiki, ki so nameščeni v sinapsi. Vsebujejo posebne ionske kanale, ki omogočajo hiter prenos električnega signala na postsinaptično celico. Prenos signala v električnih sinapsah je zelo hiter. Centralno živčevje vsebuje številne električne sinapse, kar je odločilno za hitro komunikacijo med celicami (Fowler in Scadding 2003; Gradišnik 2021, 21).

### 2.2.1.2 Nevroglija

Nevroglija je oznaka za oporno tkivo v živčevju (Verkhatsky idr. 2014). Pomembno je za številne podporne funkcije, saj te celice omogočajo mehansko in funkcionalno podporo nevronom, nadomeščajo poškodovane živčne celice, tako da izdelajo glialno brazgotino, sodelujejo pri obrambi in prenosu snovi v živčevju, gradijo mielinske ovojnice ter sodelujejo pri obnovi in prehrani nevronov (Nedergaard idr. 2003, 523-525). Glede na lokacijo ločimo centralno in periferno nevroglijo. V centralnem živčevju nevroglijo sestavljajo vsaj štiri vrste celic: astrociti, oligodendrociti, mikroglia in ependimske celice ter radialna glia, nevrovaskularne celice in celice NG2 (Chew idr. 2014, 125).

Astrociti so najštevilnejše celice v živčevju (Nedergaard idr. 2003, 523). So tudi morfološko in funkcijsko zelo različne in imajo najbolj mnogoštevilne funkcije v fizioloških in patoloških dogajanjih. Izdelujejo beljakovine v medceličnini, sodelujejo pri razvoju živčevja, usmerjanju nevronov med migracijo, pomembni so pri angiogenezi, razgradnji strupov, pri imunskem odzivu, modulirajo sinaptične aktivnosti in gradijo krvno-možgansko pregrado, ki varuje možgane pred škodljivimi snovmi in infekcijskimi agensi (Verkhatsky idr. 2014, 493-498; Verkhatsky idr. 2015, 389-395).

Oligodendroglija ali oligodendrociti ovijajo aksone. Oligodendrociti proizvajajo mielin v mieliniziranih vlaknih (Chew idr. 2014). Njihove plasti zgoščenih celičnih membran obdajajo aksone za izolacijo, ki je ključnega pomena za saltatorni način prevajanja signala po aksonskih vlaknih. Poleg mielinizacije je bilo ugotovljeno, da oligodendroglija zagotavlja



aksonom tudi neposredno presnovno podporo preko laktata, kar preprečuje degeneracijo in smrt aksonov (Lee idr. 2012).

Celice mikroglije so fagociti, ki imajo zaščitno funkcijo v živčevju in odstranjujejo, fagocitirajo tujke in odmrle celice. Mikroglialne celice predstavljajo edinstveno populacijo glede na njihov razvojni izvor in glede njihove funkcije. V nasprotju z drugimi celicami centralnega živčevja, ki izvirajo iz nevroektoderma, so mikroglialne celice mezodermalnega izvora (McKercher idr. 1996, 5648; Monier idr. 2007, 372-374). Posebna značilnost teh celic je njihova zelo dinamična narava tako v normalnih kot v patoloških razmerah. Pri ljudeh je mikroglijo mogoče najti po rojstvu v vseh regijah centralnega živčevja in predstavljajo velik delež celotne celične sestave centralnega živčnega sistema, po ocenah do 12 % (Lawson idr. 1990, 152). Podobno kot periferni makrofagi, se mikroglialne celice široko razlikujejo med seboj v morfologiji in aktivnosti, kar je deloma odvisno od stanja okoliškega tkiva, kjer se nahajajo (Lynch 2009; Ransohoff in Perry 2009, 112).

Ependimske celice obdajajo možganske prekate, centralni kanal hrbtenjače in resice horoidnega pleteža. Pomembne so za izdelovanje likvorja in predstavljajo rezervoar za nevroregeneracijo (von Bernardi 2016).

Posebna vrsta glijalnih celic v centralnem živčevju so celice NG2 (nevralni/glijalni antigen 2) ali polidendrociti, čeprav so te celice splošno priznane kot oligodendrocitne progenitorne celice (OPC). Nahajajo se v beli substanci, zanje pa so značilni vzorci izražanja in električne lastnosti, ki so drugačni od tistih, značilnih za običajno klasifikacijo glijalnih celic (Chew idr. 2014).

Med celice periferne nevroglije uvrščamo Schwannove in plaščne celice. Prve gradijo mielinske ovojnice v perifernih živcih. Plaščne celice ali trofociti obkrožajo ganglijske celice (Guyton in Hall 2006b, 750-762; von Bernardi 2016).

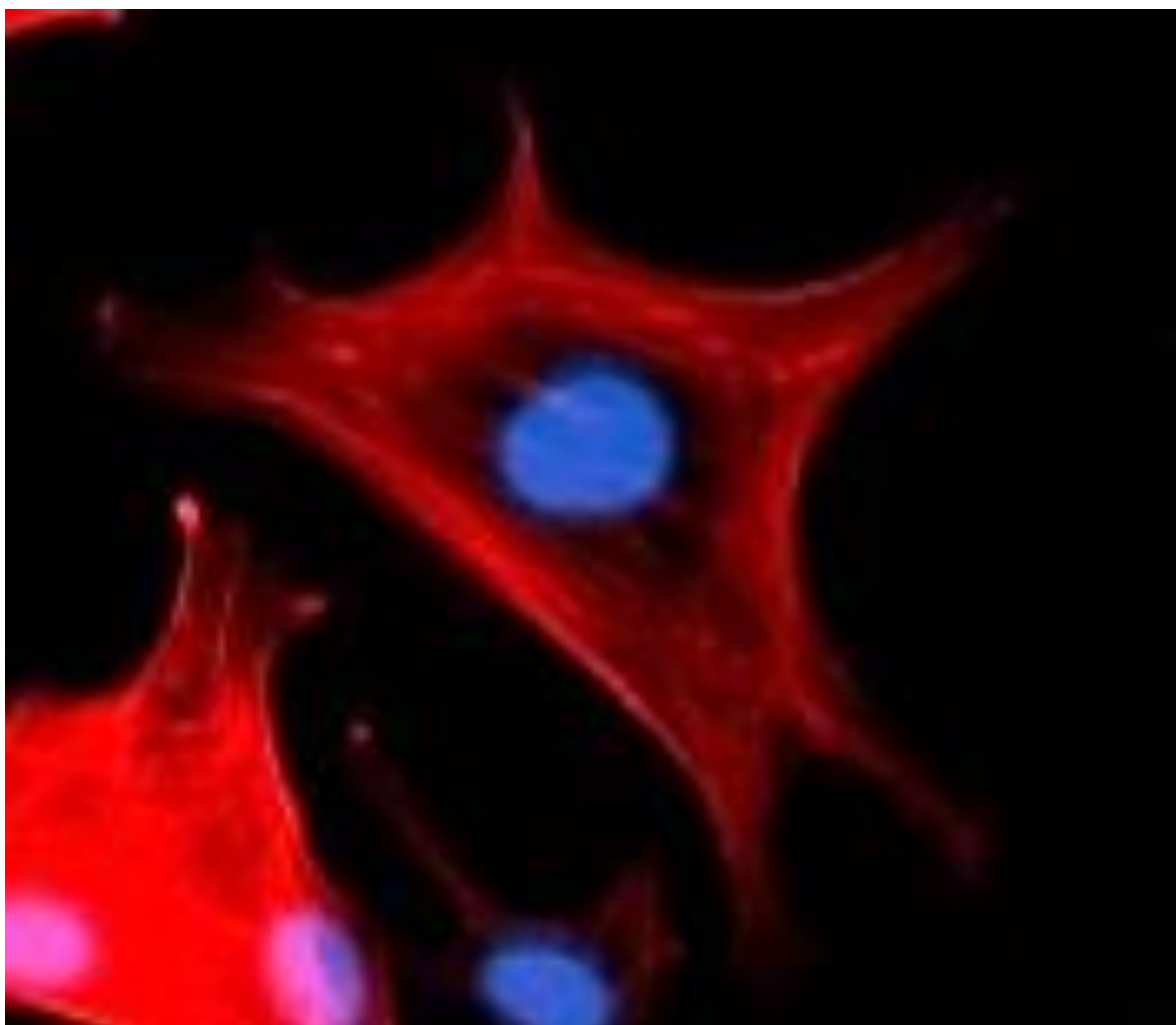
Živce sestavljajo snopi aksonov, ki so obdani z vezivnim tkivom. To zagotavlja oporo in zaščito, preko njega pa živčna vlakna dobivajo tudi prehrano. Znotraj živca posamezna živčna vlakna med seboj ločuje endonevrij, ki ga sestavlja rahlo vezivno tkivo in krvne žilice. Snope živčnih vlaken ovija v perinevrij, ki je že debelejši in močnejši. Na površini pa je živec obdan z epinevrijem. Tega gradi čvrsto vezivno tkivo, med katerim so posamezne

maščobne celice in krvne žile (Guyton in Hall 2006b, 750-762; von Bernardi 2016; Gradišnik 2021, 22).

### **2.3 Astrociti kot najštevilnejše celice živčevja**

Astrociti so ključne celice v centralnem živčnem sistemu, saj sodelujejo pri številnih pomembnih funkcijah v fizioloških in patoloških okoliščinah (Garcia-Abreu idr. 1995, 471; Kimelberg 2004, 192; Lee idr. 2008, 13116). Poimenovanje astrocitov ali astroglije izvira iz grščine (gr. *astron*), kar pomeni zvezda (Slika 1). Te celice so tako imenovali zaradi njihovega značilnega videza "zvezd na nočnem nebu" v histoloških vzorcih, obarvanih po Golgiju. Spadajo med celice nevroglije, vendar so zanje značilni posebni celični elementi, ki jih ločijo od drugih celic iz te skupine. V preteklosti so izraz nevroglija uporabljali za vse podperne celice v centralnem živčevju in ga tako uporabljamo še danes. Ime astrocit je leta 1895 prvi predlagal madžarski anatom in histolog Mihaly von Lenhossek zaradi drobno razvejanih celičnih izrastkov in značilnega zvezdastega videza (Tower 1988, 3-6; Montgomery 1994, 145-146). Že konec 19. in v začetku 20. stoletja sta španski histolog Ramon y Cajal in italijanski anatom in zdravnik Camillo Golgi opazila, da so astrociti kljub skupnim zvezdnim značilnostim morfološko izjemno raznoliki. Velik napredek na področju proučevanja astrocitne funkcije je nastopil z napredkom na področju celičnih kultur in z razvojem specifičnih načinov identifikacije celic. Tako so sodobne raziskave potrdile popolnoma nove morfološke in funkcionalne raznolikosti astrocitov tako v pogojih *in vitro* kot *in vivo*.

**Slika 1: Astrocit v celični kulturi. Vidna je tipična zvezdasta oblika celice, ki se lepo pokaže z imunocitokemičnim barvanjem aktina v celici**



Vir: Lastna raziskava 2021.

Astroцитi imajo v osrednjem živčevju veliko bolj zapletene, specifične in pomembne vloge. Te celice, ki imajo raznolike oblike in funkcije, so danes opredeljene kot glavni akterji v živčevju v fizioloških in patoloških pogojih in prav zato se je zanimanje za astrocite v zadnjih desetletjih močno povečalo (Dammers idr. 2008, 23; Jakovcevski idr. 2009, 5). Astroците uvrščamo med celice glije in so njen najštevilnejši predstavnik v živčevju. Tako predstavljajo glavno celično sestavino možganov in hrbtenjače. Pri ljudeh število astrocitov v nekaterih predelih možganov obsega od 25 % do 50 % celotnega volumna tkiva in s tem presega število nevronov (Sofroniew in Vinters 2010, 7-10; Chew idr. 2014, 126). Kot pove že ime, imajo te celice značilno zvezdasto obliko z drobno razvejanimi celičnimi podaljški

ali izrastki. Glede na razlike v morfoloških značilnostih in razporeditvi jih delimo na dva glavna podtipa, protoplazemske in fibrilarne. Protoplazemski astrociti so zvezdaste oblike, imajo mnoge tako imenovane stebelne veje, ki se delijo na številne drobno razvejane izrastke. V možganovini prevladujejo v vseh predelih sive substance, medtem ko je fibrilarnih astrocitov največ v beli možganovini. Fibrilarni astrociti imajo veliko dolgih vlaken ali celičnih podaljškov, od tod tudi njihovo ime. Takšna klasifikacija astrocitov je še danes popolnoma veljavna, čeprav izvira iz konca 19. stoletja. Poleg teh dveh glavnih tipov celic pa so bile opisane še druge vrste astrocitov. Mednje uvrščamo radialne astrocite, ki so prisotni v mrežnici in v možganovini, velatne astrocite, ki so poleg možganovine najbolj številni tudi v vohalnem bulbusu, in še druge posebne oblike astrocitov, ki so bile opisane le pri nekaterih živalskih vrstah, kot so na primer interlaminarni astrociti v možganski skorji višjih primatov (Denis-Donini idr. 1984, 641; Garcia-Abreu idr. 1995, 172; Kimelberg 2004, 19; Lee idr. 2008, 13116; Sofroniew in Vinters 2010, 9-15; Sharif in Prevot 2012, 137).

### 2.3.1 Funkcije astrocitov

Zelo dolgo časa je veljalo, da imajo astrociti v živčnem sistemu predvsem pasivno vlogo, saj služijo kot strukturne in podporne celice nevronov. Koncept, da bi lahko motnje v delovanju astrocitov sprožile mehanizme, ki vodijo do patoloških sprememb v centralnem živčevju in prispevajo k nastanku kliničnih simptomov, na splošno ni bil upoštevan. Takšen pogled na astrocite se v zadnjih desetletjih spreminja z napredkom v celični fiziologiji in biologiji ter z razvojem v tehnikah gojenja celic, vključno z bolj natančnimi metodami za njihovo identifikacijo (Bignami idr. 1972, 430; Dammers idr. 2008, 23; Jakovcevski idr. 2009, 5). Nedavni dokazi so potrdili, da imajo astrociti izjemno pomembne, raznolike in kompleksne vloge v centralnem živčevju, kot so sodelovanje pri obdelavi informacij, pri sinaptičnem prenosu v živčnih vezjih in moduliranju funkcij nevronov (Giffard in Ouyang 2009, 634-635; Chew idr. 2014, 126; Rustenhoven idr. 2016; 5). Odkar se je razumevanje oblik, razvoja, delovanja, funkcije in vlog astrocitov v normalnih in patoloških pogojih v živčevju intenzivno povečalo, jih zdaj obravnavamo kot heterogeno skupino celic s pomembnimi in raznovrstnimi funkcijami. To pojmovanje heterogenosti je bistvenega pomena za razumevanje njihovih vlog in odzivov pri normalnem delovanju živčevja in v različnih patoloških stanjih (Sofroniew in Vinters 2010). Postalo je jasno, da so astrociti bistveni pri nastajanju, delovanju in razgradnji sinaps. Fibrilarni astrociti s svojimi celičnimi podaljški

komunicirajo z Ranvierovimi zažetki na nevrutih, celični podaljški protoplazemskih astrocitov pa obkrožajo sinapse. Poleg tega sestavljajo komunikacijske vrzeli med distalnimi izrastki sosednjih celic, sodelujejo z drugimi vrstami celic v živčevju in imajo obsežne stike s krvnimi žilami. Udeleženi so pri ohranjanju in vzdrževanju nevranskega mikrookolja, pomagajo pri usmerjanju migracije nevronov med razvojem in nudijo oporo nevronom. Nadalje služijo tudi kot celice, ki predstavljajo antigene, in sodelujejo pri modulaciji imunskih reakcij. Tako je kljub napredku pri razumevanju funkcij astrocitov, njihovega razvoja in signalnih odnosov z drugimi vrstami celic naše znanje še vedno na temeljnem nivoju (Sofroniew in Vinters 2010, 7-9; John 2012, 401).

Kot najštevilčnejša populacija celic v centralnem živčevju imajo astrociti različne in pomembne funkcije, ki se med seboj precej prekrivajo, ne le med normalnim delovanjem centralnega živčevja, ampak tudi v obdobju njegovega razvoja (Sofroniew in Vinters 2010, 8). Ker vseh vidikov astrocitnih funkcij ni mogoče obravnavati, v nadaljevanju opisujemo le najpomembnejše.

#### Vloga pri migraciji nevronov

Ena od številnih in izjemno pomembnih vlog astrocitov je njihova interakcija z nevroni, ki se med razvojem centralnega živčnega sistema selijo vzdolž podaljškov glialnih celic (Sofroniew in Vinters 2010, 23; Chew idr. 2014, 126). Glialne celice, imenovane tudi radialna glija, tvorijo ogrodja, ki nevronom zagotavljajo migracijsko pot. Imunocitokemične raziskave so potrdile, da podaljški celic radialne glije vsebujejo vimentin in glialni fibrilarni kisli protein (GFAP), ki je eden od temeljnih astrocitnih označevalcev. Te celice, za katere predvidevajo, da bi bile nezreli astrociti, med zorenjem postopoma izgubljajo vimentin in se diferencirajo v zrele astrocite. Ta proces se zaključi, ko se tudi migracija nevronov konča (Sarthy 2007, 38; Sofroniew in Vinters 2010, 10-15).

#### Izdelava beljakovin zunajceličnega matriksa in adhezijskih molekul

Adhezijske molekule in različne beljakovine zunajceličnega matriksa so pomembne pri razvoju in ohranjanju strukturne celovitosti centralnega živčnega sistema na celični ravni. Imajo pa tudi pomembno vlogo pri popravilu in regeneraciji po poškodbah (Oberheim idr. 2009, 3276; Sofroniew in Vinters 2010, 10-14). Nekatere od teh molekul vključujejo laminin, fibronektin, adhezijsko molekulo nevranskih celic in citotaktin J1. Glavni vir teh

molekul so prav astrociti, ki na celični membrani izražajo površinske receptorje za matriksne beljakovine in adhezijske molekule (Montgomery 1994, 146-147; John 2012, 401).

#### Proizvodnja nevrotrofičnih dejavnikov in dejavnikov za spodbujanje nevronov

Astrociti so kot podporne in regulacijske celice nevronov potrebni za njihovo preživetje in sodelujejo pri nastajanju nevrnskih izrastkov ali nevrinov. So vir topnih dejavnikov, ki so potrebni za preživetje nevronov in različnih matriksnih beljakovin, ki so pomembne za nastanek nevrinov in njihovo podaljševanje. Ti nevrotrofični dejavniki in dejavniki za spodbujanje nevrinov vključujejo majhne molekule (piruvat in druge, ki so potrebne za energijsko presnovo nevronov) ter proteine zunajceličnega matriksa, kot je laminin. Astrociti so tudi vir nevroativnih steroidov, vključno s progesteronom, estradiolom in drugimi metaboliti, ki imajo sinaptične učinke, proizvajajo pa še živčni rastni faktor in protein S100, ki sta pomembna za podaljševanje in rast nevrinov (Oberheim idr. 2009, 3277; Sofroniew in Vinters 2010, 17-18; John 2012, 404-405; Chew idr. 2014, 138).

#### Krvno-možganska pregrada

Krvno-možganska pregrada je zelo selektivno prepustna meja endotelijskih celic, pericitov in astrocitov, ki deluje kot difuzijska ovira in preprečuje vstopanje določenih molekul v možganski parenhim glede na njihovo velikost in polarnost. Astrociti prispevajo k vzpostavitvi in vzdrževanju krvno-možganske pregrade. Zagotavljajo njeno strukturno podporo in vplivajo na prenašanje molekul med žiljem in celicami glije s spreminjanjem transportnih lastnosti endotelijskih celic (Montgomery 1994; Zhang in Barres 2010). Astrociti lahko spremenijo tudi aktivnost encimov v možganskem endoteliju, kot sta alkalna fosfataza in Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaza, vplivajo na transport aminokislin, povečajo zmogljivost prenosa nevtralnih aminokislin in zmogljivost sistemov za transport glukoze, ki je nameščen v celicah možganskega endotelija (Sofroniew in Vinters 2010, 17-18; Zhang in Barres 2010, 589).

#### Angiogeneza

Angiogeneza je zapleten proces, ki vključuje več korakov, kot so aktivacija žilnega endotelija, raztapljanje bazalne membrane, razmnoževanje in migracija endotelijskih celic ter oblikovanje kapilarnih brstičev, ki se razvijejo v žile, s končnim zorenjem in ponovno

vzpostavitevijo bazalne membrane. Med tem procesom so aktivni tudi astrociti, ki spodbujajo endotelijske celice k oblikovanju kapilaram podobnih struktur (Montgomery 1994, 156; Nimmerjahn 2009, 1639). Njihovo sodelovanje pri angiogenezi je pomembno za razvoj in obnovo centralnega živčnega sistema. Ta interakcija zahteva fizični stik med astrociti in endotelijskimi celicami. Dokazano je bilo, da endotelijske celice, ki so ločene od astrocitov, ne oblikujejo takšnih struktur (Montgomery 1994, 157-159; Zhang in Barres 2010, 590).

#### Prenos signalov

Prenos signalov ali nevrottransmisija kot ena glavnih funkcij živčnega sistema vključuje shranjevanje in sproščanje molekul prenašalcev v sinapsah ter interakcijo teh prenašalcev s postsinaptičnimi receptorji. Nevroni imajo sisteme za privzemanje nevrottransmitterjev z visoko afiniteto, ki jih odstranjujejo iz sinaptične špranje. Takšne lastnosti pa imajo tudi astrociti. Njihova ključna vloga pri nevrottransmisiji se kaže s sprejemanjem prenašalcev in na takšen način pomagajo nevronom. Kapaciteta teh sistemov za privzem je zelo raznolika, vključno z lokacijami v različnih možganskih predelih in za različne prenašalce (Montgomery 1994, 157-158; Nimmerjahn 2009, 1640; Sofroniew in Vinters 2010, 16-17).

#### Energijska presnova in uravnavanje mikrookolja v centralnem živčnem sistemu

Astrociti pomembno prispevajo k presnovi v centralnem živčevju. So skladišče za shranjevanje glikogenskih zrn. Največ glikogena v astrocitih se shranjuje prav na območjih z visoko sinaptično gostoto (Montgomery 1994, 157; Sofroniew in Vinters 2010, 16-20; Zhang in Barres 2010, 591). Te zaloge glikogena so pomembne za vzdrževanje nevrnske aktivnosti med epizodami hipoglikemije. S stikom med krvnimi žilami, aksoni v Ranvierovih zažetkih, perikarioni in sinapsami so astrociti v dobrem položaju za sprejemanje glukoze iz krvnih žil in tako lahko zagotavljajo energijske metabolite različnim nevrnskimi elementom v beli in sivi možganovini (Hansson 1988, 369; Sarthy 2007, 382; Nimmerjahn 2009, 1640; Sofroniew in Vinters 2010, 16-20).

Poleg tega astrociti v centralnem živčevju sodelujejo pri uravnavanju pH, koncentracije ionov in osmolarnosti. Za normalno delovanje nevronov je potrebno, da so spremembe v možganskem mikrookolju strogo nadzorovane in čim bolj konstantne. Celična depolarizacija, do katere pride med nevrottransmisijo, povzroči opazne spremembe koncentracije ionov, zunajceličnega pH in osmolarnosti (Nedergaard idr. 2003, 523;

Verkhatsky idr. 2014, 494). Astrociti in tudi oligodendrociti imajo pomembno vlogo pri vzdrževanju zunajceličnega okolja, saj z encimom karbonsko anhidrazo uravnavajo pH. Vsebujejo ionske kanale za kalij, natrij, kalcij, kloride in bikarbonat. Na primer med neurotransmisijo, ko pride do izrazitega pretoka kalijevih ionov v zunajcelični prostor, astrociti kopičijo te ione in jih odstranijo iz zunajceličnega prostora nazaj v citoplazmo. Preko ionskih kanalov se kalijevi ioni premaknejo z območij visoke nevronske aktivnosti na območja nizke aktivnosti, v cerebrospinalno tekočino in v kri. Ta učinek je znan kot prostorsko varovanje in poudarja pomen glialnega sincicija pri uravnavanju in vzdrževanju mikrookolja (Hansson 1988, 370; Nimmerjahn 2009, 1640; Sofroniew in Vinters 2010, 16-18; Chew idr. 2014, 126).

#### Razstrupljanje centralnega živčevja

Astrociti so pomembni za razstrupljanje in odstranjevanje strupenih snovi iz osrednjega živčnega sistema (Montgomery 1994, 157; Sofroniew in Vinters 2010, 16). Njihova vloga je še posebej dobro prepoznana pri sprejemanju in presnovi ekscitatornih aminokislinskih neurotransmiterjev, kar preprečuje kopičenje njihovih nevrotoksičnih koncentracij, ki bi sicer vplivale na neurotransmisijo. Najbolj znan ekscitatorni aminokislinski neurotransmitter je glutamat. Glutaminska sinteza v astrocitih je vezana na presnovo amonijaka in tako preprečuje nastajanje toksičnih koncentracij amonijevega iona. Astrociti vsebujejo tudi beljakovine, ki vežejo kovine, kot je metalotionein. Tako sodelujejo pri sprejemanju in odstranjevanju nekaterih težkih kovin, kot je na primer svinec, in preprečujejo njihovo kopičenje v centralnem živčevju do toksičnih vrednosti (Sofroniew in Vinters 2010, 17; Middeldorp in Hol 2011, 422).

#### Vloga pri imunskem odzivu in fagocitozi

Astrociti imajo pomembno vlogo tudi pri imunskem odzivu. Delujejo lahko kot makrofagi in modulatorji imunskih funkcij. Sposobni so fagocitoze in služijo kot antigen predstavitvene celice, ki so spodbujene k izražanju in proizvodnji molekul, prispevajo pa tudi k pospeševanju imunskih reakcij (Sofroniew in Vinters 2010).

Centralni živčni sistem lahko do neke mere velja za imunsko privilegirano mesto. Zaradi krvno-možganske pregrade, odsotnosti limfne drenaže in velike populacije limfoidnih celic je izoliran od telesnega imunskega sistema. V mirujočih pogojih astrociti običajno ne



izražajo antigenov glavnega histokompatibilnostnega kompleksa (angl. major histocompatibility complex - MHC) ali pa jih izražajo le v zelo nizkih koncentracijah. Izražanje molekul MHC lahko povzročijo različni agensi, vključno z virusi in interferonom gama (IFN-gama). Adhezijske molekule, kot je medcelična adhezijska molekula (angl. intercellular adhesion molecule - ICAM), ki jih izražajo astrociti, lahko modulirajo interakcije med astrociti in limfociti ter olajšajo njihov vstop v centralno živčevje in tako pomagajo pri imunskih reakcijah. Indukcija izražanja ICAM se poveča po izpostavljenosti astrocitov nekaterim virusom, bakterijskim produktom, kot je lipopolisaharid, ter IFN-gama in interleukinu-1 (Montgomery 1994; Nimmerjahn 2009; Oberheim idr. 2009; Sofroniew in Vinters 2010; Middeldorp in Hol 2011; Chaboub in Deneen 2012).

### Različne astrocitne funkcije

Astrociti opravljajo številne dodatne funkcije v centralnem živčnem sistemu (Sofroniew in Vinters 2010; Chew idr. 2014). Te vključujejo receptorsko posredovano endocitozo, translokacijo in eksocitozo makromolekul. Poleg tega s prisotnostjo glutationa ščitijo možgane pred oksidativnimi poškodbami. Astrociti sodelujejo tudi pri izločanju nevrohormonov. S svojimi celičnimi podaljški astrociti v nevrohipofizi sodelujejo z nevroendokrinimi celicami glede na potrebo po določenih hormonih, kot na primer med dehidracijo ali med dojenjem (Montgomery 1994, 160; Nimmerjahn 2009, 1642-1645).

### 2.3.2 Morfologija astrocitov in pomembni astrocitni označevalci

Za astrocite je značilna izrazita morfologija, kot pove že njihovo ime. Pri barvanju s hematoksilinom in eozinom jih vidimo kot celice z malo opazne citoplazme in blede obarvanim jedrom. Oblika jedra se razlikuje. Pri protoplazemskih astrocitih je jedro okroglo do ovalno, pri fibrilarnih pa je lopataste oblike. Astrociti so tesno povezani z drugimi celičnimi in strukturnimi sestavinami centralnega živčnega sistema ter tako zagotavljajo strukturno podporo in imajo pomembne funkcionalne vloge. Astrocitni nožni izrastki obdajajo krvne žile, ovijajo celična telesa in nevronske izrastke, obdajajo sinapse in obkrožajo Ranvierove zažetke mieliniziranih aksonov (Montgomery 1994, 161; Nimmerjahn 2009, 1642-1643).

Astrociti se poleg teritorialne organiziranosti glede na različna področja možganov in razlik v morfologiji razlikujejo tudi po fizioloških značilnostih. Fenotipsko opredelitev astrocitov

je mogoče opraviti z imunocitokemijo in iskanjem prisotnosti ključnih astrocitnih označevalcev, kot sta glutamatni transporter in GFAP. Funkcionalno predelitev astrocitov opredeljujemo na primer s proučevanjem membranskega potenciala in določanjem prevodnosti za kalij (Denis-Donini 1984, 642; Lee idr. 2008, 13117).

Astrocitna citoplazma je polna glijalnih fibril (Chew idr. 2014, 125). Glavna prepoznavna ultrastrukturalna značilnost astrocitov je prisotnost intermediarnih filamentov, ki so veliko bolj izraziti pri fibrilarnih kot pri protoplazemskih oblikah. Njihova glavna sestavina je prav GFAP, ki je razmeroma specifičen za astrocite in zato služi kot pomemben astrocitni označevalec pri imunohistokemični identifikaciji. Je tudi specifičen za astrocite, tako v celični kulturi kot *in situ*. Ker imunocitokemične tehnike omogočajo odkrivanje specifičnih molekularnih označevalcev v astrocitih, so bistveno orodje za identifikacijo in opredelitev izoliranih celic. GFAP zato služi kot prototipni označevalec za astrocite, saj je občutljiv in zanesljiv označevalec za imunocitokemično identifikacijo (Sharif in Prevot 2012, 137; Chew idr. 2014, 125). GFAP je eden od skupine beljakovin, ki jih uvrščamo med intermediarne filamente. Sem spadajo tudi aktin, nestin, vimentin in drugi, ki igrajo pomembno vlogo pri citoarhitekturnih funkcijah. GFAP je važna beljakovina pri nastanku glijalnih brazgotin in reaktivni astrogliozii. Različne izoforme GFAP pa se lahko heterogeno izražajo v zdravih in patoloških okoliščinah (Bignami idr. 1972, 429-432; Chaboub in Deneen 2012, 379).

Aktin je prav tako eden od intermediarnih filamentov. Glede na intenzivnost barvanja se astroцитi razlikujejo tudi glede na vsebnost znotrajceličnega aktina. Tako pri stelatnih oblikah astrocitov ni opaznih posameznih aktinskih vlaken, ampak se namesto tega vzpostavijo aktinske mreže. Nasprotno pa astroцитi, ki jih gojimo *in vitro* in zavzamejo poligonalno obliko, vsebujejo izrazita aktinska vlakna (Wang in Bordey 2008).

Poleg tega astroцитi izražajo še druge pomembne označevalce, ki jih uporabljamo za imunocitokemično identifikacijo. Med njimi so proteini, kot je glutamatni aspartatni transporter (angl. glutamate/aspartate transporter - GLAST). Ta je med astrocitnimi označevalci najširše izražen (Garcia-Abreu idr. 1995; Lee idr. 2008; Nimmerjahn 2009). Drugi pogosti označevalci za astrocite so še protein S100B, ki spada v družino kalcij vezavnih beljakovin, glutamatni transporter GLT-1 (EAAT2 pri ljudeh), glutation peroksidaza, glutamin sinteza in akvaporin 4 (AQP4), za astrocite specifičen vodni kanal (Bignami idr. 1972, 430; Sharif in Prevot 2006, 4076; Lee idr. 2008, 13117; Oberheim idr.

2009, 3278; Sofroniew in Vinters 2010, 7-9; Chaboub in Deneen 2012, 379; John 2012, 403; Sharif in Prevot 2012, 138; Chew idr. 2014, 125; Minchey idr. 2019, 2-4). Dejavnost glutaminske sinteze je eden od bistvenih elementov astrocitov. Aktivnost tega encima je v pogojih *in vitro* zelo pomembna za potrditev, da kultura vsebuje astrocite. Kadar izvajamo imunohistokemične teste za identifikacijo astrocitov v pogojih *in vitro*, več različnih označevalcev ali pa označevalec, ki je kombiniran z nekaterimi drugimi identifikatorji, z večjo verjetnostjo potrdijo, da je kultura izoliranih celic astrocitna (Denis-Donini idr. 1984, 642; Eng idr. 2000, 1440; Nedergaard idr. 2003, 523-525; Kimelberg 2004, 192; Sarthy 2007, 382; Lee idr. 2008, 13117; Giffard in Ouyang 2009, 633-635; Nimmerjahn 2009, 1641; Sofroniew in Vinters 2010; Middeldorp in Hol 2011, 422; Jungblut idr. 2012, 894; Lange idr. 2012, 2569-2571; Sharif in Prevot 2012, 138; Barres 2014, 1342-1343; Chew idr. 2014; Goldman in Kuypers 2015, 3983).

## **2.4 Pomen izolacije astrocitov in funkcionalnih celičnih modelov za študij neurodegenerativnih bolezni**

### 2.4.1 Celične kulture in celični modeli

V zadnjih desetletjih smo priča vse hitrejšemu razvoju tehnike in celične biologije, ki z uporabo novih metod, izboljšanih postopkov, eksperimentalnih pogojev in instrumentov omogoča izvajanje različnih vrst poskusov (Alberts idr. 1997; Gradišnik 2019, 19). Ti poskusi, ki vključujejo številne celične kulture in celične linije ter celične modele, predstavljajo dobro alternativo poskusom na živalih in na človeku, torej poskusom v pogojih *in vivo* (Alberts idr. 1997). Celice izoliramo iz različnih živalskih, rastlinskih in človeških tkiv. V laboratorijskih pogojih ali v pogojih *in vitro* jih vzdržujemo v obliki celičnih kultur ali celičnih linij. Za izvajanje poskusov jih vključujemo v različne celične modele, ki v pogojih *in vitro* postajajo nepogrešljivi pri razumevanju fizioloških in patofizioloških celičnih dogajanj (Gradišnik 2019, 19). Celični modeli imajo zelo obsežno področje uporabe v različnih vejah raziskovanja, od predklinične in klinične medicine in veterine, do raziskav v farmacevtski industriji, eksperimentalni farmaciji in tudi v kozmetični in živilski industriji ter kmetijstvu (Bermudez-Brito idr. 2013; Gradišnik 2014, 8-12; Gradišnik 2019, 19). Določene poskuse lahko izpeljemo le na določeni, specifični celični kulturi ali celični liniji, saj univerzalne celične kulture ali linije, ki bi bila uporabna za vse vrste poskusnih modelov, nimamo (Alberts idr. 1997; Freshney 2006). Ker so za posamezne eksperimentalne celične

modele in vrste raziskav primerne samo določene vrste celic, sta izolacija novih vrst celičnih kultur iz tkiv in njihova propagacija ter razvoj novih celičnih linij pomembni (Freshney 2000; Gradišnik 2014, 8-25).

#### 2.4.2 Začetki celičnih kultur

Celice imenujemo gradniki organizmov, saj predstavljajo osnovno strukturno, funkcionalno in biološko enoto življenja (Alberts idr. 1997; Gradišnik 2014, 20-24). Med seboj se združujejo v večja in bolj kompleksna tkiva in organe, ki gradijo organizem. Celice so visoko organizirane in specializirane in se med seboj razlikujejo po funkciji, zato so zapleteno zgrajene. Razmnožujejo se z delitvijo, ki je natančno uravnana, in odmirajo programirano. Ta proces imenujemo programirana celična smrt ali apoptoza in je tako kot delitev natančno načrtovan in uravnan proces. Procesi delitve in apoptoze so v organizmu natančno kontrolirani, da se v tkivih vzdržuje ustrezno ravnovesje števila celic (Gradišnik 2014, 20-27). Stare celice, bolne ali odslužene odmirajo, nove pa nastajajo, in tako je zagotovljeno obnavljanje tkiv. Seveda lahko celice nekontrolirano odmrejo in se razmnožujejo tudi pri različnih patoloških procesih, in takrat ravnotežje med celičnim nastajanjem in odstranjevanjem iz tkiva ni uravnano, kar se klinično kaže kot različne bolezni. Celično smrt, ki je posledica patoloških vzrokov, imenujemo nekroza. Je popolnoma nekontrolirana v nasprotju z apoptozo, ki je natančno uravnan proces (Alberts idr. 1997; Freshney 2000; Gradišnik 2014, 20-24).

S posebnimi laboratorijskimi postopki, ki vključujejo tehnike celičnih kultur in tkivnih izolacij, lahko izolirane celice vzgojimo in vzdržujemo tudi izven organizma. Takšne pogoje rasti, kjer celicam zagotovimo ustrezne razmere za njihovo rast in delitev, imenujemo pogoji *in vitro* (Freshney 2000; Gradišnik 2014, 8-26; Sauer 2015).

Čeprav sega sodoben razvoj tkivnih in celičnih kultur v zgodnje začetke 20. stoletja, so opisi celic v znanstveni literaturi veliko starejši. Celice so začeli proučevati že približno 300 let prej, kar je omogočila iznajdba in uporaba svetlobnega mikroskopa v 16. stoletju. Izboljšava optičnih in tehničnih komponent mikroskopa ter metod za izolacijo celic iz tkiv so od takrat naprej omogočile razcvet celične biologije (Gradišnik 2014, 6-14; Sauer 2015).

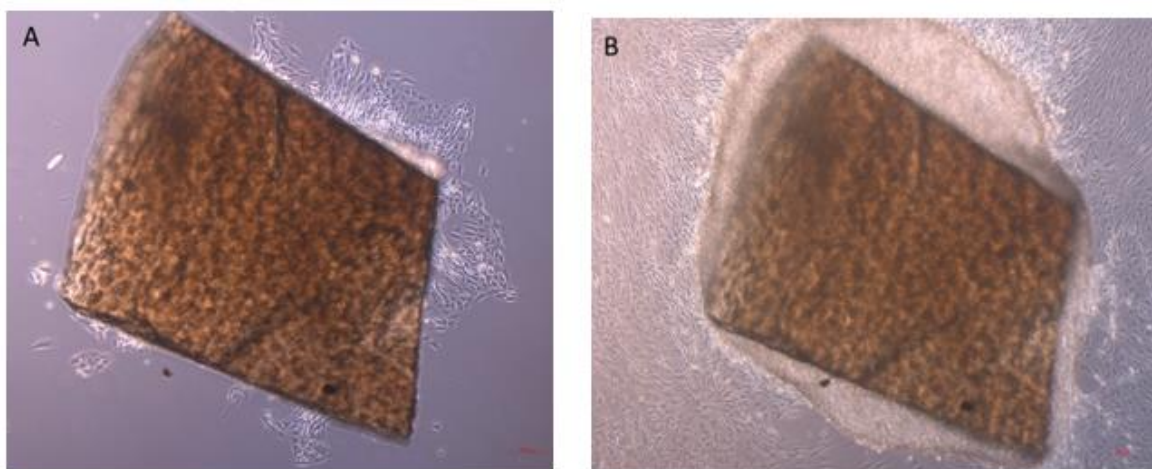
Celice je pod mikroskopom prvič videl in v znanstveni literaturi opisal Robert Hooke leta 1665. Ko je pod mikroskopom proučeval celice plutovine, je opazil v rastlinskem tkivu

celične stene celic brez celičnih organelov, ki jih poznamo danes. Te strukture je poimenoval 'celice', ker so ga spominjale na prazne sobice. Žive celice je leta 1674 pod mikroskopom prvi videl Anton van Leeuwenhoek, ko je proučeval celice alg. Približno 200 let kasneje, leta 1839, sta raziskovalca Matthias Jakob Schleiden in Theodor Schwann razvila tako imenovano Celično teorijo, ki pravi, da so vsa živa bitja sestavljena iz ene ali več celic. Kasneje je to teorijo dopolnil še Rudolph Virchow s svojim znanim rekom, da vse celice izvirajo le iz obstoječih celic (*Omnis cellula e cellula.*) (Gradišnik 2014, 5-12; Sauer 2015). Za prave pionirje na področju celičnih kultur veljata Harrison in Carrel, ki sta med prvimi začela z razvojem postopkov za proučevanje celične fiziologije in patofiziologije celičnega delovanja. Leta 1907 je Harrison proučeval rast živčnih vlaken iz celične kulture žabjega zarodka, Carrel pa je leta 1912 iz piščančje srčne mišice izoliral celice in jih vzdrževal v tkivni kulturi. Oba znanstvenika sta celice proučevala v izoliranih pogojih, torej brez vpliva ostalih dejavnikov, kakršni so v organizmu, ki predstavljajo odgovor na normalno fiziološko celično stanje ali pa na povzročeni poskusni stres (Carrel 1912; Harrison 1907; Gradišnik 2014, 7-12).

Prvotne celične izolacijske tehnike, ki so jih uporabljali na začetku, so bile bolj enostavne kot v današnjih dneh. Delčke encimsko nerazkrojene tkiva so narezali na zelo majhne koščke in jih pustili ob dodatku rastnih medijev različno dolgo časa, tako da so žive celice, ki jih je to tkivo vsebovalo, lahko iz tkiva migrirale in se razmnoževale v poskusnih pogojih. Na tak način je nastala tkivna kultura (Freshney 2000, 123-124; Gradišnik 2014, 6-13). Ta vrsta izolacije celic, ki jo imenujemo metoda eksplantacije, je prevladovala približno pol stoletja, je pa še danes široko v eksperimentalni uporabi (Slika 2). Kasneje so se razvile še druge, bolj napredne tehnike, ki so bile prilagojene specifičnim poskusnim pogojem in raznovrstnim celičnim kulturam. Današnje tehnike izolacije celic vključujejo delo s tkivi in celicami rastlinskega, živalskega in človeškega izvora in so postale vsakdanja praksa medicinskih in farmacevtskih raziskovalnih laboratorijev po svetu (Freshney 1972; Draper idr. 2004; Freshney 2006).

**Slika 2: Primer celične kulture, pridobljene z metodo eksplantacije. V laboratorijskih pogojih celice migrirajo iz koščka tkiva in oblikujejo enojno plast celic, ki obkroža osrednji delec tkiva. Gostota celic in površina preraščanja se s časom povečujeta: po**

**24 urah (A) in po 72 urah (B). Na sliki so celice, ki v kulturi rastejo iz delčkov terminalne plošče (velikost približno 5 mm<sup>2</sup>), odvzete pri spinalni operaciji**



Vir: Lastna raziskava 2020.

Celična kultura v svoji najbolj enostavni obliki vključuje rast in razmnoževanje celic v pogojih *in vitro*. To so posebni eksperimentalni pogoji rasti, s katerimi poskušamo čim bolj simulirati pogoje v organizmu, od koder celice izvirajo (Freshney 2006; Gradišnik 2014, 6-10). Na tak način lahko celice v kontroliranem okolju izpostavimo različnim eksperimentalnim dejavnikom (Freshney 2006). Pogoji rasti *in vitro* predstavljajo umetno, laboratorijsko okolje, kjer imajo celice na razpolago vse potrebne snovi za rast in razmnoževanje (Slika 3). Ta hranila imenujemo rastni mediji. Sestavljajo jih ustrezne mešanice različnih hranilnih raztopin. Poleg tega so za rast celic potrebne tudi ustrezne površne rastnih ali gojilnih posodic, ki predstavljajo primerne površine za njihovo pritrditev, če celice ne rastejo v suspenziji, ter ustrezna kombinacija rastnih pogojev. Ti vključujejo temperaturo, vlažnost in plinasto atmosfero (Freshney 1972; Freshney 1978; Freshney 2006; Gradišnik 2014, 6-12). Vsi ti dejavniki se v pogojih *in vitro* razlikujejo med seboj, odvisno od vrste celic, ki sestavljajo celično kulturo, ter od vrste poskusnih pogojev, ki jih lahko poljubno prilagajamo in spreminjamo (Freshney 1972; Draper idr. 2004; Freshney 2006; Gradišnik 2014, 5-12).

**Slika 3: Sodobno opremljen laboratorij za izolacijo celičnih kultur na Inštitutu za biomedicinske vede na Medicinski fakulteti v Mariboru. V tem laboratoriju poteka redna izolacija različnih celičnih kultur in izvajanje poskusov z biomateriali**



Vir: Lastna raziskava 2020.

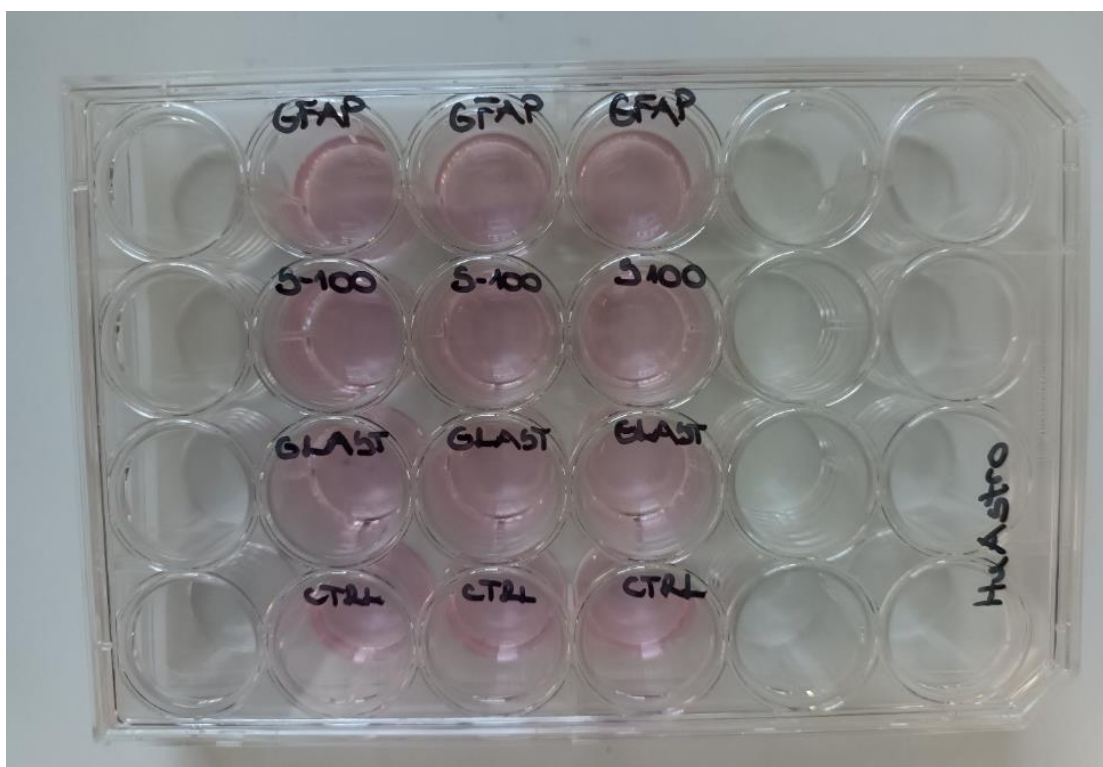
Celične kulture so v pogojih *in vitro* zelo uporabne. Lahko jih vključimo v raznovrstne poskuse. Z njimi natančno opazujemo spremembe v celicah v odvisnosti od sprememb v okolju ter vplivov na celično kulturo. Raziskujemo lahko delovanje in učinke rakotvornih dejavnikov in zdravil. Celične kulture so uporabne za študij citopatskih učinkov virusov in bakterij ter za razumevanje fizioloških in patofizioloških procesov, kar bi bilo sicer v poskusnih pogojih *in vivo* težje izvedljivo ali pa celo nemogoče. Uporabnost celičnih in tkivnih kultur je v zadnjem stoletju postala zelo priznana v raziskovalnih krogih. Izolacijske tehnike se še vedno razvijajo, izboljšujejo se postopki za bolj čiste, hitre, natančne in tudi cenejše izolacijske procese, s katerimi lahko dobimo čim manj spremenjene celice, ki imajo enake ali zelo podobne lastnosti kot tiste v tkivu, od koder izvirajo. Zato sta izboljšava in

razvoj novih tehnik izolacije celičnih kultur izjemnega pomena (Freshney 1972; Sanyz in De Palma 2009; Bermudez-Brito idr. 2013; Gradišnik 2014, 5-7;).

#### 2.4.3 Uporaba celičnih kultur, celičnih linij in funkcionalnih celičnih modelov

Iz tkiv izolirane celice, ki rastejo v celični kulturi, lahko v posebnih poskusnih pogojih uporabljamo za najrazličnejše vrste poskusov (Freshney 2006; Osakwe idr. 2017). Imenujemo jih funkcionalni celični modeli (Slika 4) (Freshney 2006; Sanyz in De Palma 2009; Osakwe idr. 2017). Celični model je opredeljen kot kultura celic v pogojih *in vitro*, kjer poskušamo čim bolj natančno posnemati pogoje v živem organizmu, torej *in vivo*, in zato omogoča primerjavo ali enačenje eksperimentalnih rezultatov z rezultati poskusov, ki so izvedeni na živih organizmih (Freshney 2000, 395-397; Cencič in Langerholc 2010, 4-8). Čim bolj je poskus primerljiv z rezultati na živih organizmih, tem bolj je funkcionalni celični model verodostojen, izpopolnjen in razvit. Glavna komponenta takega modela pa je celična komponenta (Cencič in Langerholc 2010, 7-8).

**Slika 4: Primer enostavnega funkcionalnega celičnega modela v vsakdanji laboratorijski praksi. Na mikrotitrskih ploščicah so celične kulture astrocitov, označene z različnimi celičnimi označevalci, ki so pripravljene za toksikološke analize**



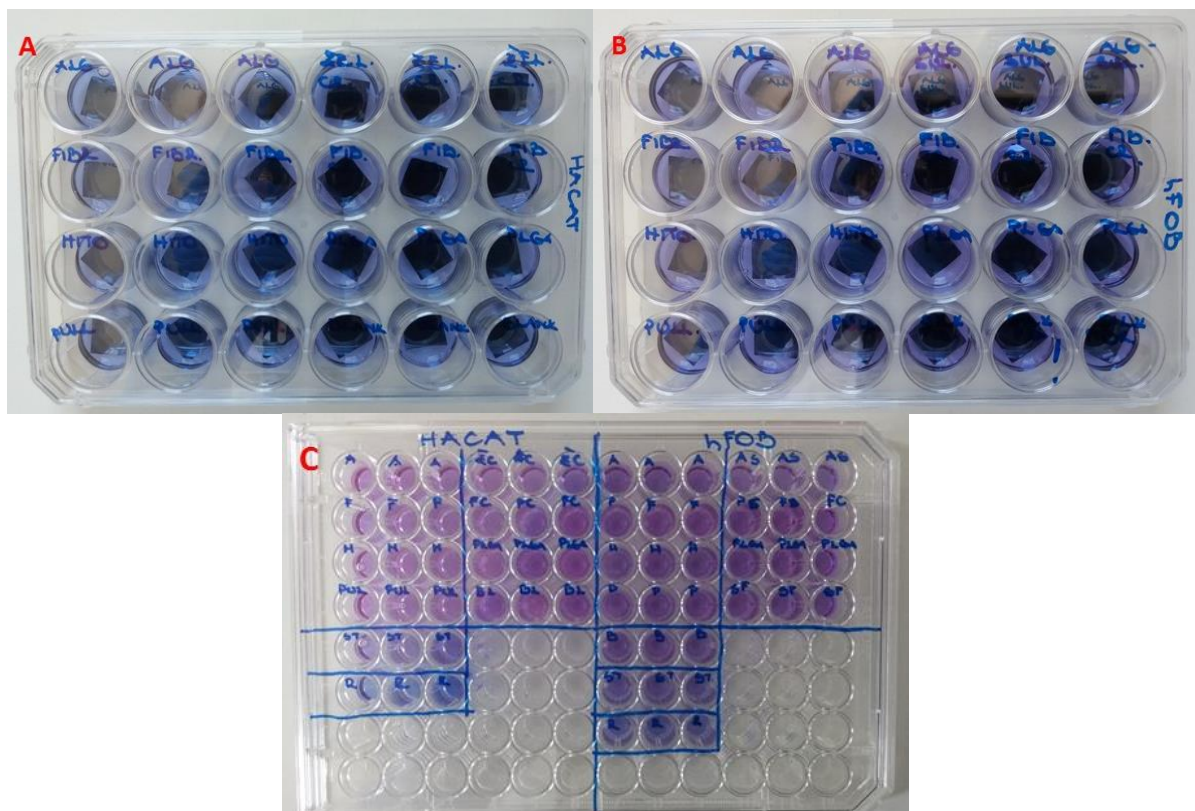
Vir: Lastna raziskava 2021.



Funkcionalni celični model torej vključuje kombinacijo celične kulture ali celične linije in ustreznega poskusnega modela. Da je takšen celični model uporaben, mora vsebovati čisto kulturo celic in čim bolj natančno posnemati pogoje v živem organizmu. To namreč omogoča primerjanje rezultatov poskusov na celičnih modelih z rezultati poskusov, ki jih izvedemo na živih organizmih (Gradišnik 2014, 3-15). Celice, ki jih v funkcionalne celične modele vključujemo, so lahko različne, torej živalskega in rastlinskega izvora ali izolirane iz človeških tkiv. Poleg čiste kulture celic lahko uporabljamo tudi mešane kulture ali kokulture, kjer v eksperimentalnem modelu raste več različnih vrst celic. Na ta način lahko proučujemo interakcije med različnimi tip celic (Granier idr. 2013; Gradišnik 2014, 5-13).

Idealen funkcionalni celični model omogoča veliko eksperimentalnih možnosti. Na tak način lahko proučujemo številne patološke in fiziološke procese, ki so izolirani in lahko eksperimentalne pogoje poljubno spreminjamo. Tako so ti procesi ločeni od ostalih vplivov v živem organizmu, kjer lahko imajo številni spremljajoči dejavniki tudi neželeni vpliv na potek poskusa. S funkcionalnimi celičnimi modeli lahko proučujemo potek bolezni, presnove, biološke razpoložljivosti in strupene učinke različnih zdravil, toksinov in snovi, potek okužb, ki se prenašajo z vodo in hrano, delovanja mikrobioloških agensov in njihove citopatske učinke, vezavo patogenov na celice (Cencič in Langerholc, 2010; Bermudez-Brito idr. 2013; Granier idr. 2013; Gradišnik 2014, 5-13) ... Primerjava ali celo enačenje rezultatov poskusa s potekom proučevanih procesov na živih organizmih je tem bolj verodostojna, čim bolj je funkcionalni celični model izpopolnjen in razvit (Bermudez-Brito idr. 2015; Gradišnik 2014, 4-8). V raziskovalnih dejavnostih laboratorijev po vsem svetu postajajo funkcionalni celični modeli vedno bolj pomembni, njihova aplikacija v medicini, farmaciji, veterini in tudi v kozmetični in živilski praksi vse širša (Slika 5) (Freshney 2006; Cencič in Langerholc, 2010; Gradišnik 2014, 4-8).

**Slika 5: Funkcionalni celični model. Na mikrotitrskih ploščicah so celične kulture kožnih celic (HACAT) (A) in kostnih celic hFOB (B) na različnih podlagah ter priprava vzorcev za meritev fluorescence s spektrofotometrom (C)**



Vir: Lastna raziskava 2020.

Funkcionalni celični model, kamor je vključena določena celična linija, lahko v laboratorijskih pogojih predstavlja verodostojen in reprezentativen model za proučevanje raznih fizioloških procesov. Je tudi zelo dobra alternativa poskusom na živalih, kar zmanjša uporabo poskusnih živali in zmanjša stroške raziskav (Freshney 2006; Gradišnik 2014, 4-5). Poleg tega pa ima izvajanje poskusov in vzdrževanje celic v funkcionalnih celičnih modelih v primerjavi z izvedbo kliničnih študij in s poskusi na živalih tudi številne prednosti, kot so izvajanje bolj agresivnih testiranj, kot bi bilo sicer mogoče v poskusih na živih organizmih. Testiranja so bolj enostavna in varna ter tudi bolj poceni (Tlaskalova-Hogenova idr. 2004; De Vreese in Schrezenmeir 2008; Gradišnik 2014, 4-9). Prav zaradi tega funkcionalne celične modele v eksperimentalni praksi vse bolj pogosto uporabljamo (Tlaskalova-Hogenova idr. 2004; Freshney 2006; EFSA 2008).

Izolirane celice, ki jih gojimo v celičnih kulturah, lahko uporabljamo za raznovrstne poskuse na številnih področjih znanosti. Najpogosteje jih koristimo pri poskusih v medicini in farmaciji ter v kemijskem raziskovanju, biologiji, pa tudi v živilstvu in pri raziskavah v kmetijstvu (Bermudez-Brito idr. 2013). Idealen celični model lahko teoretično predstavlja neposredno zamenjavo za človeški organ ali organizem in poskusno žival, ker odraža kompleksno fiziološko delovanje organa ali organizma in naravne odgovore telesa na zunanje dražljaje (Freshney 1978; Gradišnik 2014, 4-17). Specifični celični modeli vsebujejo specifične vrste celic, zato so tudi določene celične kulture ali celične linije namenjene samo specifičnim vrstam poskusov na teh modelih. Idealna celična kultura ali celična linija, ki bi lahko zadostila tako strogim zahtevam, ne obstaja. Lahko pa se z izborom celic, s pazljivim eksperimentiranjem ter prilagajanjem in spreminjanjem poskusov takemu idealnemu modelu zelo približamo (Auerbach idr. 2000; Gradišnik 2014, 26-27). Med številnimi celicami, ki jih iz raznovrstnih organov in tkiv lahko izoliramo, za funkcionalne celične modele pogosto uporabljamo tudi različne celice iz živčnega tkiva. Te lahko izoliramo iz možganov ali hrbtenjače ali pa iz perifernih živcev (Castellanos-Montiel idr. 2021, 4-5; Okuno in Okano 2021, 275; Raffa idr. 2021, 759; Walczak idr. 2021). Veliko poskusov s funkcionalnimi celičnimi modeli vključuje tudi transformirane celice, ki jih imenujemo celične linije (Budel in Djabali 2017). Pri eksperimentiranju so te nekoliko drugačne, saj ni nujno, da se bodo učinki delovanja testiranih agensov pokazali v enaki meri kot pri netransformiranih celicah. Transformirane celice tudi niso tako stabilne in so spremenjene. V tem pogledu zato ne predstavljajo idealnega substrata za vse vrste poskusov. Te celice namreč nujno ne izražajo stanja zdravih celic in pri delu z njimi nikoli ni mogoče z gotovostjo trditi, da bodo biokemijski procesi potekali enako kot pri netransformiranih celicah (Karasek 1983; Liu idr. 2018; Castellanos-Montiel idr. 2021, 4). Da bi se lahko bolj približali idealnim razmeram, so potrebne netransformirane celice (Budel in Djabali 2017; Raffa idr. 2021, 759; Walczak idr. 2021). Na teh je mogoče bolj natančno proučevati celične mehanizme in delovanje testiranih agensov. To pa seveda ne pomeni, da transformiranih celic v raziskavah ne potrebujemo. Te so še kako pomembne pri proučevanju karcinogeneze in potencialnih tarč delovanja zdravil (Karasek 1983; Bermudez-Brito idr. 2013; Budel in Djabali 2017; Johansen 2017; Liu idr. 2018; Qian idr. 2019).

Najpomembnejša sestavna komponenta funkcionalnega celičnega modela je celična kultura ali celična linija (Bermudez-Brito idr. 2013; Gradišnik 2014, 15-17). Iz različnih tkiv

rastlinskega, živalskega ali človeškega izvora, jo lahko vzgojimo s posebnimi laboratorijskimi postopki (Freshney 2000, 120-125; Gradišnik 2014, 12-17). Na takšen način izoliramo celice, ki predstavljajo primarno celično kulturo. Zanj velja, da ima ohranjene praktično vse značilnosti celic iz tkiva, od koder so te celice izolirali. Na takšni kulturi lahko zato zelo verodostojno proučujemo fiziološke in patofiziološke mehanizme, saj so ti podobni tistim v organizmu. Slaba stran primarne celične kulture pa je, da imajo take celice omejeno število delitev, zato se v laboratorijskih pogojih po določenem času gojenja spreminjajo (Gerbe idr. 2012; Gradišnik 2014, 5-11). Postopoma izgubljajo značilnosti, ki so bile zanje značilne v izvornem organizmu, dokler se ne spremenijo v taki meri, da propadejo (Freshney 2000, 122-124; Bermudez-Brito idr. 2013).

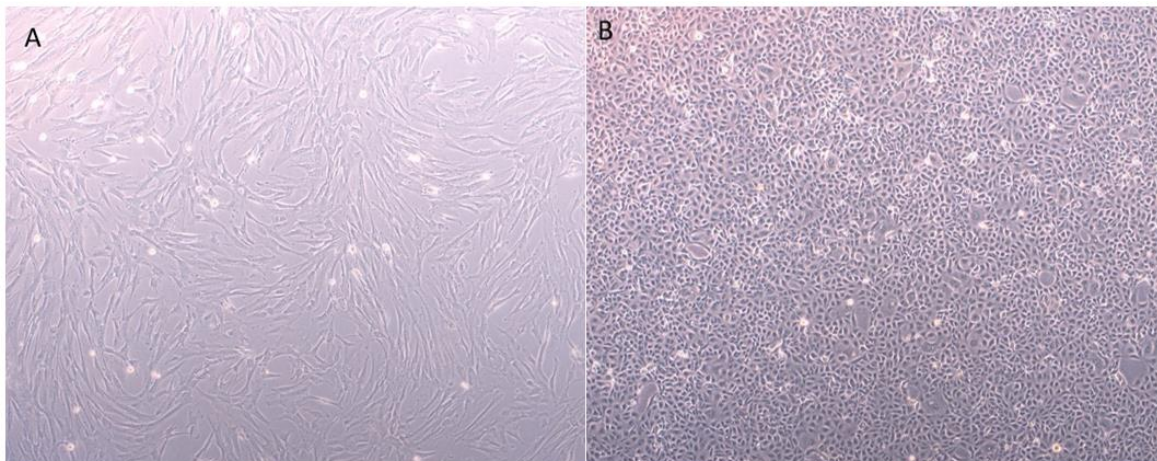
Celice primarnih kultur, ki jih gojimo v celični kulturi, med tem časom večkrat precepljamo, kar imenujemo pasaže (Gerbe idr. 2012; Gradišnik 2014, 5-11). Ko je celična kultura dovolj gosta, to pomeni, da je celic v zadostnem številu, lahko povezave med njimi in podlago prekinemo z različnimi encimi. Ko celice ponovno nasadimo, dobimo celice prve pasaže. Te nato dalje gojimo in jih precepljamo v višje pasaže in jih med gojenjem tudi označujemo z imenom ali številko pasaž. Takšne celice z rastjo v kulturi navadno dosežejo od 10 do 15 pasaž, nato pa nehajo rasti in se deliti ter končno odmrejo (Freshney 2000, 120-123; Gerbe idr. 2012; Gradišnik 2014, 5-19).

Celice primarne kulture je s posebnimi biokemijskimi postopki mogoče tudi spremeniti (Gradišnik 2014, 5-14). Rečemo, da so take celice transformirane. Pri transformaciji celic imamo dve možnosti. Lahko napravimo transfekcijo celic primarne kulture z antiapoptotskimi beljakovinami ali pa jih okužimo z nekaterimi onkogenimi virusi, kot je Epstein-Barr. Druga možnost pa je, da celice zlijemo z rakastimi celicami, ki so nesmrtni in se zato lahko neskončno dolgo delijo (Gerbe idr. 2012; Gradišnik 2014, 13-19). S takimi postopki dobimo celične linije, kamor spadajo tudi linije rakastih celic, kot so na primer celice Caco-2 (rakaste celice debelega črevesa), MCF7 (celice raka dojke), AGS (celice raka želodca), HeLa (rakaste celice materničnega vratu) (Draper idr. 2004; Gerbe idr. 2012; Gradišnik 2014, 13-19; Budel in Djabali 2017) ... Take transformirane celice se lahko teoretično neskončno delijo, ker so nesmrtni, in zato je sekundarna celična linija obstojna zelo dolgo časa (Slika 6). Je pa pri delu s takimi celicami potrebno upoštevati, da se te od prvotnih zelo razlikujejo po svojih značilnostih, tako po načinu in hitrosti rasti, rastnih pogojih, metabolizmu in genetskih značilnostih (Draper idr. 2004; Gerbe idr. 2012). Njihova

uporabnost v poskusih je prav zato omejena in se je potrebno pri poskusih in interpretaciji rezultatov teh omejitev zavedati (Gerbe idr. 2012; Gradišnik 2014, 13-23).

V literaturi je opisanih veliko vrst izolacij celic iz različnih organizmov in tkiv. Te se med seboj razlikujejo po načinu odvzema in shranjevanja tkiva, postopkih izolacije, rastnih pogojih, pasajah in shranjevanju celic (Denda in Moe 2011; Budel in Djabali 2017; Chung idr. 2018). Pri človeku so znane izolacije maščobnih in matičnih celic, celic prebavil, dihal, mišic, celic živčevja, celic iz plasti kože, vezivnih celic, fibroblastov, do celic povrhnjice, keratinocitov, endotelijskih celic, limfatičnih in tumorskih celic (Denda in Moe 2011; Gradišnik 2014, 13-20; Budel in Djabali 2017; Johansen 2017; Rogic dr. 2018; Qian idr. 2019). Postopki za celično izolacijo so velikokrat zapleteni, težavni in dolgotrajni, včasih tudi neuspešni. Zaradi lažje dostopnosti, že izdelanih protokolov in utečenih postopkov številne vrste celic izoliramo iz živalskih tkiv, zato veliko funkcionalnih celičnih modelov vključuje živalske celične kulture in celične linije. V primerjavi z njimi je opisov poskusov na celicah človeškega izvora manj, še posebno tistih, ki vključujejo netransformirane celice, saj je tukaj potrebno veliko več optimizacije postopkov in prilagajanja rastnih protokolov (Gradišnik 2014, 15-18; Budel in Djabali 2017; Liu idr. 2018; Rogic dr. 2018). Uporabnost netransformiranih celic in njihova eksperimentalna vrednost sta večji, sta pa njihova izolacija in vzdrževanje v kulturi bolj težavna, ker zaradi omejenega števila delitev netransformirane celice v pogojih *in vitro* dokaj hitro odmrejo (Freshney 2000; Freshney 2006; Gradišnik 2014, 13-18; Budel in Djabali 2017; Chung idr. 2018; Qian idr. 2019).

**Slika 6: Primer celične kulture fibroblastov, vzgojene iz koščka vezivnega tkiva, torej netransformiranih celic (A), in celične linije celic VERO (B), ki jo sestavljajo rakaste, transformirane celice. Nativni posnetek celične kulture pri 50-kratni povečavi, Nikon Diaphot 300**



Vir: Lastna raziskava 2015.

#### 2.4.4 Proces izolacije celic za poskuse *in vitro* - od tkiva do celične kulture

Številna spoznanja o fizioloških in patofizioloških mehanizmih pri človeku izhajajo iz raziskav na celičnih kulturah, ki so vključevale celice, izolirane iz poskusnih živali, in transformirane celice (Doucet in Owens 2015; Park idr. 2015; Calle idr. 2018). Njihove omejitve in uporabnosti za poskuse v funkcionalnih celičnih modelih so dobro znane. Zaradi tega ni mogoče, da bi ugotovitve raziskav, ko so bile narejene na transformiranih celičnih linijah ali pa na živalskih celicah, natančno in direktno prenesli na človeka. Razlike so vseeno prevelike in mehanizmi delovanja niso povsem enaki (Zieger idr. 2017; Chung idr. 2018; Sharma idr. 2018). Z razvojem celične biologije, napredkom tehničnih možnosti in iznajdbi novih izolacijskih postopkov pa so bili omogočeni novi načini proučevanja primarnih celičnih kultur brez opisanih omejitev, zato je vse več raziskav usmerjenih v delo z netransformiranimi celicami (Karasek 1983; Liu in Deng 2016; Johansen 2017; Qian in Tcw 2021, Reid in Kuipers 2021).

Postopke izolacije celic iz tkiva je zapleten in dolgotrajen proces. Včasih lahko traja zelo dolgo, da pridemo do uporabne kulture (Freshney 2000; Freshney 2006; Gradišnik 2014, 34-35). Postopke izolacije se med seboj zelo razlikujejo, kar se tiče korakov obdelave tkiva, ki

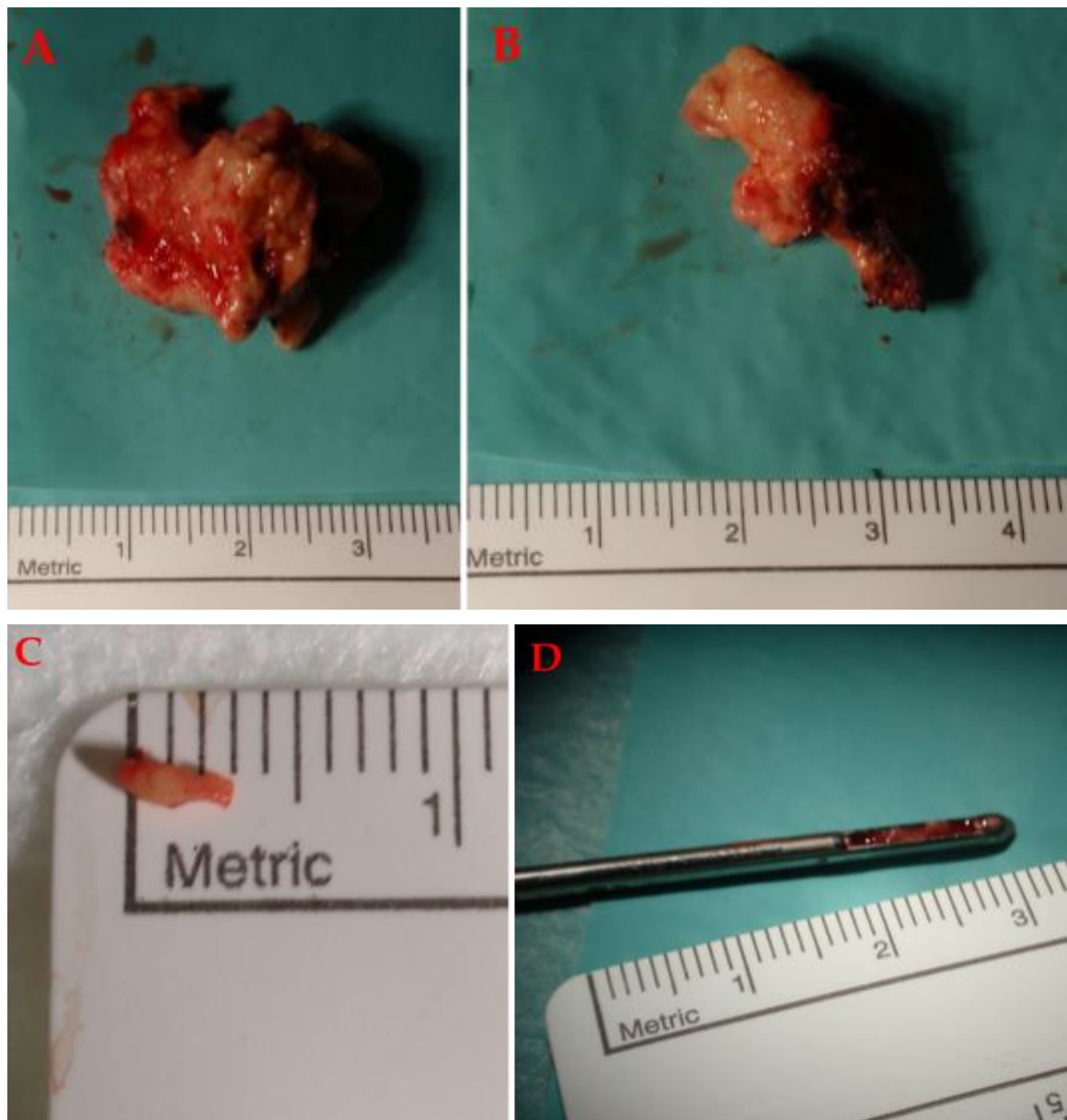
vodijo do kulture celic. Bistvene pa so razlike v celičnih označevalcih, ki so specifični za vsako vrsto celic. Ti omogočajo, da lahko različne vrste celic med seboj ločimo in jih po izolaciji tudi karakteriziramo. To pomeni, da z gotovostjo lahko potrdimo, da smo tarčne celice res izolirali. Prav tako je nekatere celice lažje izolirati in gojiti kot druge. Tako je na primer izolacija astrocitov in njihovo gojenje v celični kulturi zapleteno, zato je razumevanje njihovega delovanja oteženo, vsaj kar se tiče človeških astrocitov (Hansson 1998, 942-944; Sofroniew 2005, 400; Foo idr. 2011, 799).

Za izolacijo človeških astrocitov potrebujemo najprej ustrezno tkivo centralnega živčevja, torej tkivo možganov ali hrbtenjače (Foo idr. 2011). Vzorec možganskega tkiva, ki je lahko od odraslih darovalcev ali novorojenčkov, dobimo v bolnišnicah od tistih darovalcev, ki se z darovanjem tkiva v poskusne namene strinjajo (Sharif in Prevot 2012, 138). Etični vidik je pri takih odvzemih zelo pomemben. Neonatalno tkivo se zadnja leta vse manj uporablja, ker je ustrezen vzorec vitalnega tkiva težko dobiti in iz njega celice izolirati ter tudi zaradi etičnih vprašanj ob odvzemih (Hansson 1988, 370; Sharif in Prevot 2012, 138). Vsem potencialnim darovalcem tkiva ali njihovim svojcem natančno razložimo postopek odvzema in razloge za nadaljnjo uporabo darovanega tkiva. Darovalci ali njihovi družinski člani, ki jih zastopajo, in lečeči kirurg, ob tem tudi podpišejo poseben obrazec ali soglasje za darovanje tkiva in njegovo uporabo v eksperimentalni praksi. Pri tem je pomembno poudariti, da sta cilj zdravljenja in kolikor je mogoče ohranitev nevrološke funkcije med posegom vedno na prvem mestu in da v laboratorijih za eksperimentalne namene uporabimo samo presežne vzorce tkiva, ki niso potrebni za nadaljnjo patohistološko diagnozo. Tkiva med kirurški posegom nikoli ne odvezamo le zaradi namena izolacije same, prav tako ne odvezamo več možganskega tkiva, ki bi ga imeli na pretek za namene celične izolacije (Lacroix et al. 2001, 190-191; Sudhakar in Richardson 2019). Darovalci so bolniki, ki se kirurško zdravijo zaradi različnih bolezni centralnega živčevja, torej obolenj, ki zahtevajo operativno zdravljenje in odstranitev ali biopsijo možganske lezije zaradi bolezenskih vzrokov. Pri skoraj vseh odvzemih gre za možgansko tkivo in le izjemno redko za tkivo hrbtenjače. Tega je med kirurško resekcijo izredno malo na razpolago in tudi funkcionalna rezerva je tukaj veliko manjša kot pri možganskem tkivu (Lee idr. 2008, 13121-13122; Foo idr. 2011, 781; Kettenmann in Verhatsky 2011). Za izolacijo netransformiranih astrocitov potrebujemo zdravo možgansko tkivo. Tumorsko spremenjene možganovine za take izolacije ne moremo uporabiti, saj bi na takšen način dobili tumorske celice. Seveda imajo

te v določenih primerih tudi pomembno mesto. Vir tkiva odraslih darovalcev najpogosteje predstavlja možganska skorja. Vzorce pa dobimo pri kirurškem zdravljenju epilepsije in hudih poškodb možganov ter vaskularne patologije (operacije anevrizem, arteriovenskih malformacij in fistul, kavernomov, kadar je za prikaz žilne lezije potrebno odstraniti nekaj možganskega tkiva). Zelo dobrodošle so tudi igelne biopsije, s katerimi lahko odvzamemo tkivo iz globokih možganskih struktur, kadar ne gre za diagnostiko tumorskih sprememb (Slika 7). To je važno zato, ker se astrociti iz različnih regij možganov med seboj razlikujejo (Kimelberg 2004; Jack idr. 2015, 512; Khakh in Sofroniew 2015, 942-944; Wyss-Coray 2016). Eni in drugi vzorci so navadno majhni in predstavljajo dragocen material. Iz njega je mogoče izolirati ne le astrocite, ampak tudi druge vrste celic, kot so oligodendrociti, mikroglia, nevroni in včasih mikrovaskularne endotelijske celice. Seveda je namen izolacije odvisen od vzorca. To pomeni, da vsak vzorec možganskega tkiva tudi ni primeren za izolacijo vseh vrst celic. Možganski korteks je najpogosteje zastopan vzorec tkiva, namenjenega v celični laboratorij, tudi zaradi relativno enostavne dostopnosti (Lacroix et al. 2001, 190-191; Kimelberg 2004). Odstranjeno tkivo še med potekom operacije ustrezno zavarujejo in shranijo ter pošljejo na histopatološko preiskavo. Vzorec nato pregledajo patologi in postavijo diagnozo obolenja. Kadar je odstranjenega tkiva med odvzemanom količinsko dovolj, pa ga lahko uporabimo v raziskovalne namene. Takrat že v operacijski dvorani odvzamemo od resekcijskega vzorca možganskega tkiva čim bolj reprezentativen zdrav košček. Paziti moramo, da je čim manj kontaminiran s krvjo, saj lahko včasih veliko število eritrocitov moti izolacijski proces, čeprav jih med postopkom izolacije celic poskušamo odstraniti. Prav tako se moramo izogniti nekrotičnim in zmečkanim ali kontaminiranim delom možganskega tkiva, če je to le mogoče. V sterilnih pogojih nato odvzet košček možganskega tkiva shranimo v sterilne centrifugirke ali epruvete, ki jim dodamo celični rastni medij ali fosfatni pufer, da zavremo nekrobiotične procese v tkivnem vzorcu. Paziti moramo, da se tkivo ne izsuši in propade in da ves proces odvzema tkiva poteka sterilno, tako kot tudi vsi nadaljnji postopki med izolacijo in gojenjem celične kulture. Pri nepazljivosti se lahko namreč zgodi, da pride do kontaminacije in se celična kultura okuži z glivami in bakterijami (pogost kontaminant so mikoplazme). Taka kultura ni uporabna in celice slabo rastejo. Odvzet vzorec tkiva hranimo pri sobni temperaturi in ga čimprej prenesemo v celični laboratorij, kjer lahko začnemo s postopki izolacije celične kulture (Slika 8) (Freshney 2006; Denda in Moe 2011; Sharif in Prevot 2012, 137; Gradišnik 2014, 13-14; Wyss-Coray 2016, 180).

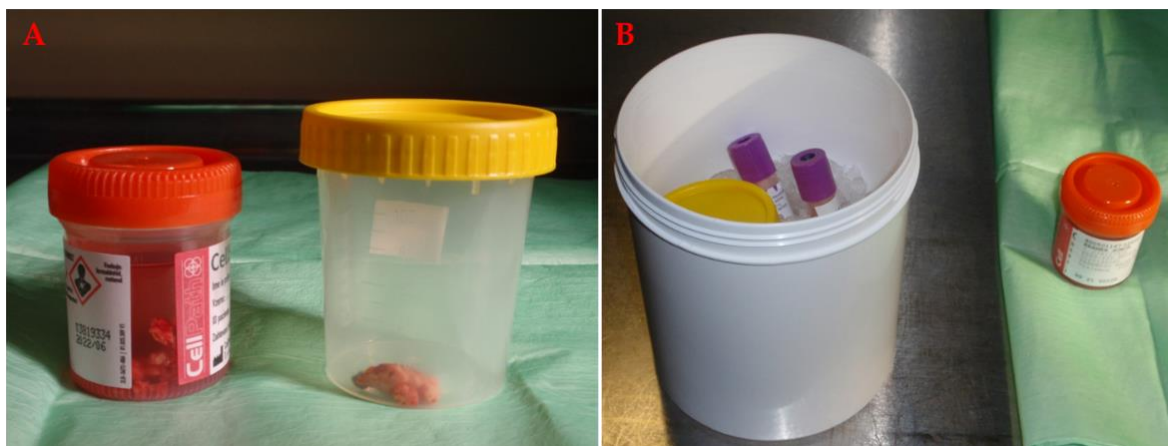


**Slika 7: Različne vrste resekcijskih vzorcev, pridobljenih med operacijami možganov, ki služijo kot vir za izolacijo različnih možganskih celic. Količina pridobljenega tkiva in način odvzema vplivata na uspeh izolacije celic. Pri klasičnih, odprtih operacijah in širokih resekcijah pridobimo veliko tkiva, ki ga bomo lahko uporabili za nadaljnjo obdelavo v celičnem laboratoriju, kot na primer pri odprti operaciji glioblastoma (A). Resekcijski vzorec glioma, pridobljen z odprto biopsijo pri minimalni trepanaciji ali kraniotomiji v obliki ključavnice (B). Vzorec glioma, pridobljen z igelno biopsijo (C). Biopsijska igla z vzorcem tkiva (D). Slike so bile posnete med rutinskimi nevrokirurškimi posegi, tkivo pa je bilo odvzeto tudi za namen izolacije celične kulture**



Vir: Tomaž Velnar, UKC Ljubljana 2021.

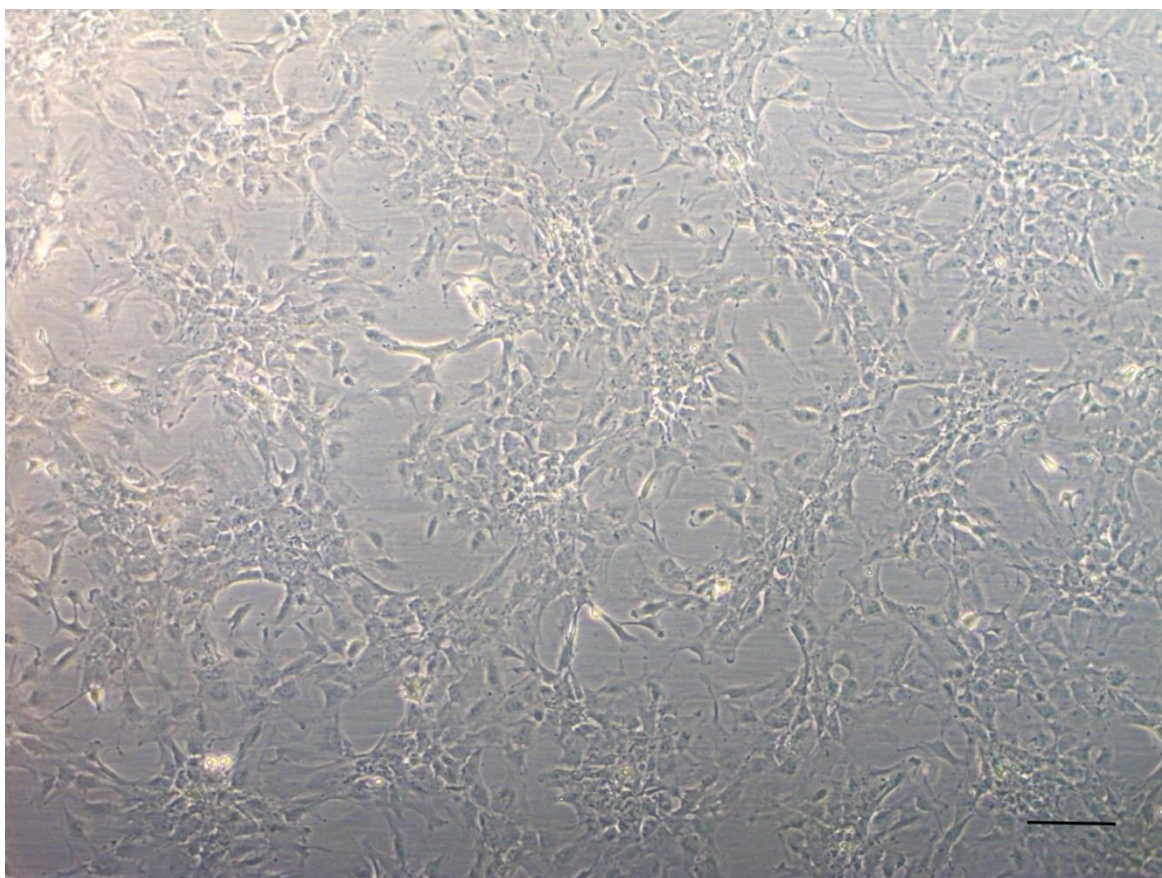
**Slika 8: Vzorec tkiva glioblastoma, pripravljen za prenos v celični laboratorij za izolacijo celic in na oddelek za patologijo za histopatološki pregled (A). Vzorec, namenjen za histopatološki pregled, je shranjen v raztopini formaldehida (levo), tkivo za celični laboratorij pa hranimo v celičnem mediju ali v fosfatnem pufri (desno). Cilj je, da tkivo transportiramo na ledu in čim hitreje, da bi s tem lahko čim bolj zmanjšali nekrobiotične procese v resekcijskem vzorcu (B)**



Vir: Lastna raziskava 2021.

Pri izolaciji astrocitov vedno uporabimo zdrav del resekcijskega vzorca (Slika 9) (Freshney 2006; Sharif in Prevot 2012, 137). Pri tem moramo paziti na vse omejitve, opisane zgoraj. Izogniti se moramo torej nekrotičnim in subviabilnim predelom, kot je penumbra. Tukaj so celice sicer še vedno žive, vendar ne delujejo normalno. Imajo spremenjen metabolizem in izražanje določenih genov, aktivirajo se stresni proteini. V možganih se ob ugodnih pogojih, torej ob ponovni vzpostavitvi pretoka krvi, ti predeli lahko popravijo in celice ne odmrejo, če pa obnovitve preskrbe s krvjo ni, se penumbra razvije v nekrozo. Lahko se zgodi, da je v odvzetih vzorcih prisotno tudi tkivo penumbre in če je takega tkiva veliko, lahko celice v kulturi slabo rastejo ali pa celo odmrejo (Sharif idr. 2006; Nimmerjahn 2009, 1639-1640; Sharif in Prevot 2012, 137; Khakh in Sofroniew 2015, 942-943).

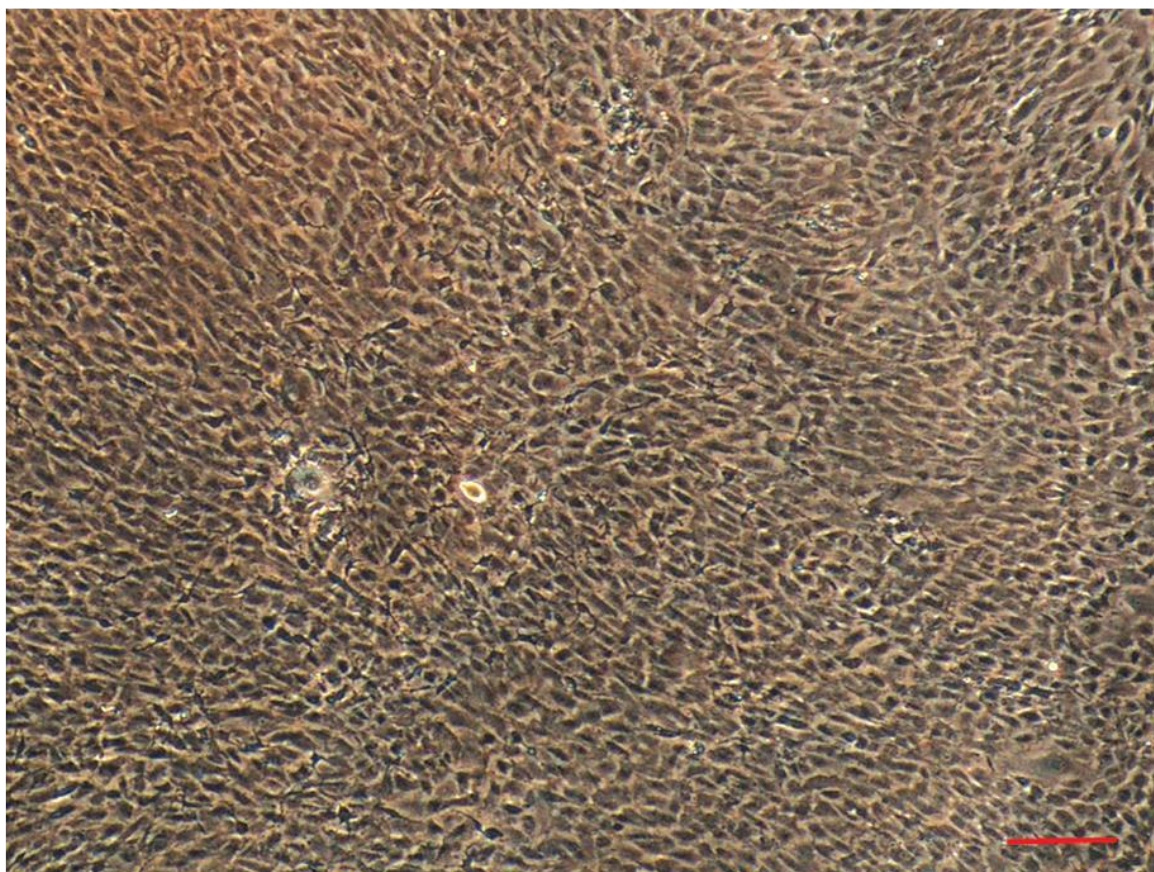
**Slika 9: Primer celične kulture astrocitov, ki je bila izolirana iz zdravega možganskega tkiva. Nativni posnetek, Nikon Diaphot 300. Merilo: 100  $\mu\text{m}$**



Vir: Lastna raziskava 2021.

Kadar pa gre za bolezensko spremenjen predel možganov, kot je rakasto tkivo, bomo tak resekcijski vzorec uporabili z namenom izolacije rakastih celice, torej transformiranih astrocitov (Slika 10). Take celice bodo imele popolnoma drugačne lastnosti. Kakšno vrsto resekcijskega vzorca bomo za celično izolacijo uporabili, zdravo ali bolno tkivo, je torej odvisno od tega, katero vrsto celic želimo izolirati in za kakšne vrste poskusov jih nameravamo uporabiti (Denda in Moe 2011; Budel in Djabali 2017; Velnar idr. 2020).

**Slika 10: Kultura glioblastomskih celic. V primerjavi z astrociti zdravih darovalcev (Slika 9) so rakaste celice popolnoma drugačnega videza, heterogene po morfolologiji in lastnostih, z malo citoplazme in jasnimi jedri. Nativni posnetek, Nikon Diaphot 300. Merilo: 100  $\mu\text{m}$**



Vir: Lastna raziskava 2021.

Odvzet vzorec tkiva je potrebno čim prej prenesti v celični laboratorij. Za možgansko tkivo je idealno, če prenos ne traja več kot 15 minut. Daljši transportni časi povečujejo število odmrlih celic in verjetnost uspešne izolacije je zato manjša (Freshney 2006; Gradišnik idr. 2020). Tkivo nato v laboratoriju obdelamo po ustreznem protokolu za izolacijo, odvisno od vrste celic, ki jih želimo izolirati. Protokoli se med seboj razlikujejo in so zelo specifični za določeno vrsto celic. Navadno tkivni vzorec najprej speremo s fosfatnim pufrom, ki mu dodamo antibiotike, da preprečimo kontaminacijo. S tem uničimo in odstranimo mikroorganizme, ki bi lahko izolirane celice okužili in kasneje motili njihovo rast. Vse delo med izolacijo poteka v sterilnih pogojih. V laminariju narežemo vzorec tkiva na majhne koščke. Tkivo lahko tudi stisnemo skozi posebne mrežice z zelo drobnimi odprtini (mikro

mrežice), tako da ga čim bolj razgradimo (Freshney 2006; Sharif idr. 2006; Sharif in Prevot 2012). Za kratek čas ga lahko tudi inkubiramo s tripsinom (Freshney 2006; Gradišnik idr. 2020). Tripsin je proteolitični encim, ki razgradi vezivno tkivo v bazalni lamini in prekine povezave med celicami. Tako jih sprosti iz tkiva. Delovanje tripsina omejimo na nekaj minut do nekaj ur, odvisno od občutljivosti celic, kompaktnosti tkiva ter vsebnosti veziva, nato pa ga deaktiviramo s svežim medijem in serumom. S tem tudi odstranimo odmrle celice in potencialne kontaminante. Previdni moramo biti, da predolgo delovanje encima ne bi razgradilo tudi celic. Včasih, če je tkivo mehko, torej pri izolaciji celic iz možganskega tkiva, tripsina niti ni nujno potrebno uporabiti. Pri izolaciji astrocitov so opisani protokoli glede mehanske razgradnje tkiva in tripsina različni, odvisno od vira tkivnega vzorca in protokola izolacije (Freshney 2006; Sharif idr. 2006; Sharif in Prevot 2012; Gradišnik idr. 2020). Tkivno zmes med procesom izolacije celic večkrat centrifugiramo, da med seboj mehansko ločimo grobe delce in ostanke vezivnega tkiva med seboj. Po večkratnem centrifugiranju v sedimentu ostanejo le celice, ki jih nato prenesemo v posebne posodice za gojenje, ki vsebujejo celični rastni medij z ustreznimi dodatki. Na voljo je več vrst celičnih medijev, odvisno od vrste celic, ki jih želimo izolirati in gojiti v kulturi. Vsaka vrsta celic namreč potrebuje določene sestavine (Freshney 2000, 123-128; Freshney 2006). Celični rastni medij je zelo hranilna raztopina, ki vsebuje vse potrebne snovi za rast celic v kulturi in tudi ostale dodatke, kot so serum govejih fetusov in antibiotiki (Gradišnik 2014, 13-18). Po potrebi celični rastni medij prilagodimo in dopolnimo glede na zahteve celične kulture. Tako lahko damo še druge dodatke, ki vključujejo aminokislino, hormone in rastne dejavnike. Celično suspenzijo nato pustimo, da se celice postopoma pritrdijo na podlago, in jo shranimo v inkubatorju v atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub> in pri temperaturi 37 °C, kjer so omogočeni posebni pogoji rasti. Celice opazujemo pod mikroskopom v določenih intervalih in redno menjavamo celični medij (Freshney 2006; Gradišnik 2014, 22-24). Sprememba barve celičnega medija je znak, da so celice porabile vse hranilne snovi. Kadar medij postane moten, je to pogosto prvi znak, da lahko gre za okužbo, ki jo dokončno potrdimo še z molekularnimi metodami, kot je verižna reakcija s polimerazo (Gradišnik 2014, 13-18). Kultura takrat ne uspeva dobro, celice slabše rastejo in se ne delijo. Predvsem so težavne okužbe z mikoplazmami. To so znotrajcelične bakterije, katerih prisotnost težko odkrijemo, zato te okužbe *in vitro* tudi težko zdravimo (Freshney 2006; Kilic idr. 2013; Gradišnik 2014, 22-24). Kadar celična kultura ne uspeva dobro, je izolacijski postopek potrebno ponoviti iz novega koščka tkiva (Freshney 2006; Kilic idr. 2013).

Kadar celice neposredno po zgoraj opisanih izolacijskih postopkih nasadimo in v kulturi dobro rastejo, najprej dobimo primarno kulturo celic. To pomeni, da je bila taka kultura celic iz tkiva neposredno izolirana. Celice lahko potem še naprej gojimo in precepljamo, lahko pa jih shranimo in jih v tekočem dušiku po posebnih postopkih globoko zamrznemo. Tako so na voljo za nadaljnje poskuse (Freshney 2006; Gradišnik 2014, 22-25). Značilnost primarne celične kulture je, da ohrani značilnosti tkiva, iz katerega smo jo izolirali, lahko pa jo sestavljajo različne vrste celic. Kasneje lahko te med seboj ločimo po morfoloških značilnostih posameznih celic, ki jih želimo izolirati (Freshney 2006; Kilic idr. 2013; Gradišnik 2014, 24-26).

Celice, ki jih v optimalnih pogojih gojimo, rastejo in se razmnožujejo. Ko dosežejo največjo gostoto, pravimo, da je celična kultura konfluentna. Celice prerastejo gojilno posodico v eni plasti in se nato nehajo deliti zaradi kontaktne inhibicije (Gradišnik 2014, 35-36). Nasprotno rakaste celice te značilnosti nimajo in rastejo v več plasteh, ne glede na gostoto celic v posodicah. Ko je kultura konfluentna, lahko celice subkultiviramo, kar pomeni, da jih s posebnimi postopki prenesemo na nova gojišča. Tako dobimo sekundarno celično kulturo, ki pa ima omejeno število delitev (Kilic idr. 2013; Gradišnik 2014, 23-26). Sekundarne celične kulture navadno lahko dosežejo do 10 pasaž. Po določenem številu delitev, ki je za vsako vrsto celic različno, se celice spreminjajo, odmrejo ali pa postanejo nesmrtni. Do tega lahko pride spontano, zaradi napak v delovanju genetskih mehanizmov, ali pa jih spremenimo v laboratoriju s postopki celične transformacije (Obinata 2001; Gradišnik 2014, 14-25). Transformacija celic poteka tako, da jih zlijemo z mielomskimi celicami ali okužimo z onkogenimi virusi. Te celice imajo neomejeno število delitev in so zato nesmrtni. Take značilnosti pa kažejo tudi rakaste celice, ki jih lahko direktno izoliramo iz rakastih tkiv. Ne glede na to, kako jih dobimo, imajo transformirane celice čisto drugačne značilnosti in se močno razlikujejo od nativnih celic. Te transformirane celice uvrščamo med celične linije (Obinata 2001; Dittmar idr. 2009; Kilic idr. 2013; Gradišnik 2014, 12-17).

Da lahko potrdimo, ali je v izolatu res tista vrsta celic, ki smo jo iz tkiva želeli izolirati, je potrebno narediti potrditev ali karakterizacijo. To je končna stopnja v dolgem procesu izolacijskih postopkov (Gradišnik 2014, 14-19). Karakterizacijo napravimo z uporabo celičnih označevalcev, ki se nahajajo v citoplazmi ali na celični membrani in so specifični za določeno vrsto celic. To so antigeni, beljakovine, ki so vključene v najrazličnejše celične funkcije, kot so pritrjevanje celic, signaliziranje, prepoznavanje podlage, ostalih celic,

hormonov in rastnih dejavnikov (Beaulieu in Menard 2012; Chougule idr. 2012) ... Za določene vrste celic so celični označevalci dobro poznani, vendar pa še ne poznamo vseh celičnih označevalcev (Dittmar idr. 2009; Beaulieu in Menard 2012; Chougule idr. 2012). Nekateri od njih so specifični za posamezne celice, drugi pa so lahko za določene vrste celic tudi skupni. Zato lahko za celično karakterizacijo uporabljamo tudi njihov genetski profil (Obinata 2001; Dittmar idr. 2009; Beaulieu in Menard 2012; Chougule idr. 2012; Gradišnik 2014, 12-18).

S karakterizacijo ali določanjem genetskega profila lahko končno potrdimo, da v celični kulturi rastejo celice, ki smo jih želeli izolirati, v našem primeru so to astrociti. Te lahko potem uporabimo za funkcionalni celični model (Gradišnik 2014, 22-25; Obinata 2001; Sauer 2015). Kulturo celic najprej razcepimo, suspenzijo nato prenesemo v posebne testne posode ali ploščice, kjer bo poskus potekal (Gradišnik 2014, 22-25). Navadno uporabljamo tako imenovane mikrotitrne ploščice. Na celični kulturi lahko proučujemo različne biomateriale, dodajamo lahko razne učinkovine, kot so toksini, zdravila in hormone. Celice lahko okužimo tudi z mikroorganizmi in na kulturi med rastjo opazujemo citopatske učinke (Draper idr. 2004; Sauer 2015; Budel in Djabali 2017; Johansen 2017). Na funkcionalnem celičnem modelu lahko tudi spreminjamo in prilagajamo poskusne pogoje, tako pa tudi vplivamo na rast in delitev celic v kulturi (Gradišnik 2014, 22-25; Obinata 2001; Sauer 2015). Med potekom poskusa opazujemo spremembe neposredno na celični kulturi pod invertnim svetlobnim ali elektronskim mikroskopom. Seveda za to veljajo posebni postopki gojenja celic, priprave in barvanja (Freshney 2006; Denda in Moe 2011; Gradišnik 2014, 22-27; Sauer 2015) ... Bolj natančen in obširen opis postopkov, ki jih pri delu s celičnimi in tkivnimi kulturami uporabljamo, presega okvir tega dela.

## **2.5 Viri tkiva za izolacijo človeških astrocitov in kirurške metode vzorčenja tkiv**

Zaradi hitrega napredka sodobnih laboratorijskih postopkov v zadnjih letih, se tehnike celičnih izolacij nadalje razvijajo in ponujajo široko paleto možnosti raziskav v pogojih *in vitro* (Mather 2021; Wu idr. 2021). Tako so izolacije človeških, rastlinskih in živalskih celic v medicinski in farmacevtski znanosti postale običajna praksa številnih raziskovalnih laboratorijev po svetu. Prvi in eden najpomembnejših korakov med izolacijo celic je pravilen odvzem ustreznega tkiva, ki ga bomo uporabili za izolacijo. To je osnova, ki določa uspeh izolacije. Tkiva za celično izolacijo najpogosteje odvezamemo med različnimi kirurškimi

posegi, saj je navadno v teh primerih tkivo na razpolago v zadostnih količinah in tudi za raziskovalce relativno lahko dostopno. Vir človeškega živčnega tkiva, ki ga uporabljamo za izolacijo astrocitov, so možgani in hrbtenjača. Do ustreznega tkivnega vzorca pa lahko pristopamo z različnimi nevrokirurškimi pristopi za vzorčenje tkiv, ki jih bomo opisali spodaj (Vunjak-Novakovic in Freshney 2006, 89; Mather 2021, 98; Wu idr. 2021).

Ko razmišljamo o operaciji možganov, se moramo zavedati, da se primarni cilji kirurgije razlikujejo glede na patologijo (Tatter 1999, 780). Vključujejo ublažitev povišanega intrakranialnega tlaka iz različnih razlogov, zdravljenje žilne patologije ali krvavitve in evakuacijo hematoma, maksimalno varno zmanjšanje tumorja, odvzem tkiva za histološko diagnozo in kirurško zdravljenje poškodb glave. Kadar govorimo o odvzemu tkiva, je potrebno tudi poudariti, da z vidika odvzema tkiva za celične izolacije, vse vrste bolezenskih sprememb možganov niso primerne. Izolacija zdravih, netransformiranih možganskih celic zahteva pridobitev tkiva iz zdravega dela možganov. Tumorsko tkivo ni primerno za takšno izolacijo, niti tkivo, pridobljeno med operacijami različnih možganskih krvavitev. Možganska snov v bližini hematoma (penumbra) ni primerna za procese izolacije celic, saj je možganovina v teh delih pogosto subviabilna ali celo nekrotična (Tatter 1999, 780; Sharif in Prevot 2012; Velnar idr. 2020). Po drugi strani pa za izolacijo neoplastičnih celic uporabljamo tumorsko možgansko tkivo, odvzeto pri operacijah astrocitomov, oligodendrogliomov ali glioblastomov (Tatter 2001; Asthagiri idr. 2007, 978).

Različna tkiva so v različni meri občutljiva na vzorčenje, prenos v laboratorij in na shranjevanje, preden začnemo z laboratorijsko obdelavo. Vsi ti pogoji so specifični za vrsto tkiva, ki ga bomo uporabili za nadaljnje raziskovanje (Brunnell idr. 2008). Živčno tkivo je še posebej občutljivo na procese razgradnje, ki se v tkivu začnejo po odvzemu. Zaradi neustreznega vzorčenja, odvzema in ravnanja lahko pride do poškodb vzorcev, kar se odraža v rezultatu izolacije celic in njihovi rasti v celični kulturi. Za uspešno izolacijo celic pa je treba upoštevati tudi kirurško tehniko odvzema tkiva. Živčno tkivo, ki ga uporabljamo kot vir za različne vrste izolacij živčnih celic, tako zdravih kot tumorskih, lahko odzamemo pri številnih nevrokirurških posegih (Knowlton idr. 2018; Kobayashi idr. 2019, 955-957; Azzarelli 2020, 1-2). Za proučevanje patofizioloških mehanizmov pri poškodbah centralnega živčevja, multipli sklerozi, epilepsiji, Alzheimerjevi in Parkinsonovi bolezni, demencah in tumorigenezi, je izolacija celic centralnega živčevja izjemnega pomena (Zielke in Mash 2018, 84-86; Hojat idr. 2019, 65-67).



Uporaba novih tehnoloških dosežkov in število manj invazivnih kirurških postopkov v medicini se povečujeta. S pojavom novih tehnoloških možnosti postajajo zato tudi nevrokirurške operacije manj invazivne do pacientov (Danaila in Radoi 2013). Vrsta nevrokirurškega posega je odvisna od številnih dejavnikov. Ti so lokacija in velikost tumorja, sestava, žilna oskrba in prežiljenost, število tumorjev v centralnem živčevju, njihova dostopnost, povezave z elokventnimi področji možganov, klinično stanje in želje pacienta ter nenazadnje tudi kirurška oprema (Astthagiri idr. 2007). Z raziskovalnega vidika se s tehničnim napredkom in novimi kirurškimi možnostmi povečujejo tudi možnosti za odvzem idealnega tkivnega vzorca. Nove tehnološke možnosti, ki jih izkoriščamo pri nevrokirurških posegih, omogočajo odvzem vzorcev možganskega tkiva pri vse večjem številu nevrokirurških patologij in iz različnih lokacij, ki so zdaj lažje dostopne. Dostop do njih pa zaradi manjše invazivnosti nosi tudi manjše tveganje za nastanek pooperativnih okvar živčevja (Teo 2010, 583-584; Sudhakar in Richardson 2019, 167). To prispeva k boljši prognozi in tudi k večjemu izkoristku celic med postopkom izolacije v laboratoriju. Pomembno je poudariti, da je cilj zdravljenja, ki vključuje ohranitev nevrološke funkcije pacienta, vedno prvi in najpomembnejši, in šele na drugem mestu je tkivo za izolacijo celic. V laboratorijih tako za eksperimentalne namene uporabljamo le presežne vzorce tkiva, ki niso potrebni za patohistološke preiskave in za nadaljnjo diagnozo (Sudhakar in Richardson 2019). Poleg tega je treba pred kakršnokoli eksperimentalno manipulacijo s tkivom pridobiti etično odobritev in soglasje bolnika in njegove družine (Lacroix idr. 2001, 190-191).

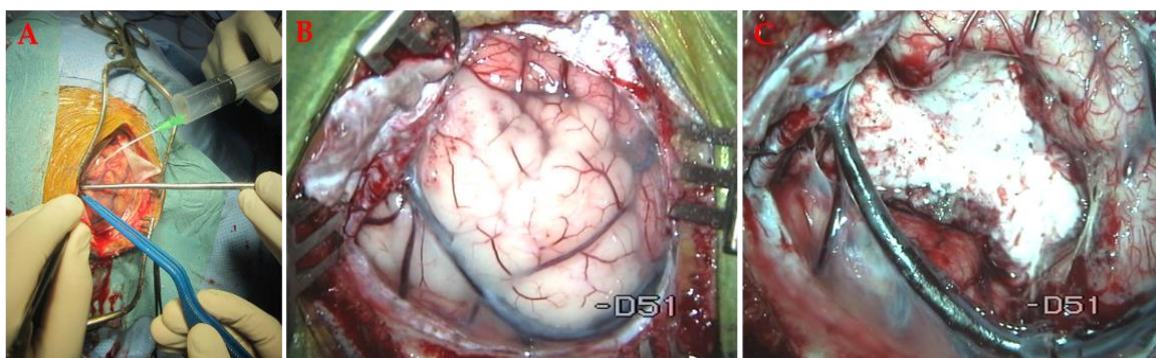
V vsakdanji klinični praksi uporabljamo številne nevrokirurške pristope, pri katerih lahko odvezamo tako zdravo kot obolelo možgansko tkivo. Vsako od njih ima svoje prednosti in slabosti, ne le z vidika zdravljenja, ampak tudi z raziskovanega vidika, saj se tkivni vzorci pri različnih vrstah kirurških odvzemov lahko različno ohranijo in tudi poškodujejo (Tatter 1999, 780; Teo 2010, 583; Velnar idr. 2020).

### 2.5.1 Klasična trepanacija

Odprta kirurgija vključuje klasično trepanacijo z različnimi modifikacijami, ki jo v nevrokirurški praksi najpogosteje uporabljamo za kirurško zdravljenje možganskih tumorjev, pa tudi za vse vrste poškodb glave in možganov ter za večino zdravljenja obolenj možganskih žil (Slika 11) (Lacroix idr. 2001, 190). Klasična trepanacija omogoča dobro vidljivost, dostopnost in možnost zmanjšanja velikih tumorjev, dobro znižanje povišanega

znotrajlobanjskega tlaka in izboljšanje nevrološke simptomatike. Površinske lezije so še posebej primerne za takšne vrste pristopov, prav tako pa tudi žilne lezije, pri katerih so stereotaktične tehnike kontraindicirane (Hall 1998, 1749-1750). Mikronevrokirurški instrumenti morajo biti vedno na voljo, operativni mikroskop pa ponuja najboljšo možno vidljivost med operacijo. V elokventnih predelih možganov lahko uporabljamo tudi intraoperativno elektrofiziološko spremljanje, da čim bolj omejimo potencialno kirurško okvaro tkiva. Odstranjevanje tumorja z odprto kirurgijo bo podalo tudi informacije o obsegu zajetnosti okoliških možganskih struktur v tumor in pomagalo zmanjšati napake, ki lahko nastanejo pri vzorčenju tkiva, s katerimi se soočamo na primer pri stereotaktičnih biopsijah (Asthağiri idr. 2007, 975-977). V primerih žilne patologije odprta kirurgija ponuja dober dostop do obolele žile ali možganske žilne spremembe, pri poškodbah možganov pa omogoča možnost dobre dekompresije možganov in potencialne nekrektomije (Tatter 1999; Asthağiri idr. 2007; Kvint idr. 2020, 1-3). Z odprtim dostopom je večinoma lahko odvzetih veliko vzorcev tkiva in tako tkivo lahko zaradi velike količine dobro uporabimo za izolacijo celic, odstranimo nekrotične predele in tako uporabo samo najprimernejše tkivne vzorce. S tem pa dobimo optimalne možnosti za uspešno izolacijo celic (Gradišnik idr. 2020, 10; Velnar idr. 2020).

**Slika 11: Odprta operacija nizkomalignega možganskega tumorja. Izpostavljenost možganov pri takem odprtem pristopu je obširna, preglednost dobra in tudi vzorci tkiva so tukaj zajetni (A). Možganski tumor je jasno viden na površini. Tumorsko tkivo je bolj edematozno in rjavo belkaste barve (B). Resekcijska votlina po odstranitvi tumorja. Drenažna žila pod tumorjem je ostala na mestu, ker je bistvena za vzdrževanje normalne možganske drenaže (C). Vse slike so bile posnete med rutinskimi nevrokirurškimi posegi v UKC Ljubljana z odobritvijo pacienta in Etične komisije**



Vir: Roman Bošnjak, UKC Ljubljana 2021.

Tipični odprti nevrokirurški pristopi vključujejo več vrst kraniotomij ali trepanacij, ki jih imenujemo po anatomskih značilnostih. Najpogostejše so pterionalna, bifrontalna, parietalna kraniotomija, trepanacija za interhemisferični pristop in okcipitalna ter subokcipitalna kraniotomija. Orbitozigomatične in transsfenoidne pristope uporabljamo manj pogosto. Ti omogočajo izboljššan dostop do lobanjske baze. Primerni so za zdravljenje lezij, ki so locirane v območju orbite in sprednje lobanjske kotanje. Dekompresivna kraniektomija je posebna oblika odprtega kirurškega dostopa, ki jo uporabljamo za zdravljenje povišanega znotrajlobanskega tlaka, najpogosteje zaradi možganskega edema različnih etologij, ki ga ne moremo zdraviti z ostalimi, nekirurškimi ukrepi. Dekompresivna kraniektomija ponuja dober dostop do možganskega tkiva in tako omogoča veliko izpostavljenost možganskih področij ter potencialno nekrektomijo v poškodovanih regijah (Miller 1986, 135; Kvint idr. 2020, 4).

Kraniotomije pri operacijah kortikalnih in subkortikalnih možganskih tumorjev običajno vključujejo celotno tumorsko območje, ki se projicira na možgansko skorjo. Do globokih tumorjev je mogoče dostopati prek manjših kraniotomij, ker se intrakranialno operativno polje poveča z naraščajočo oddaljenostjo od površine možganske skorje (Wang in Elder

2020, 527-529). Pri operacijah takih lezij je delovni kanal skozi možganski parenhim potrebno vzdrževati s spatulami pri tako imenovani dinamični retrakciji, ko z ročnimi instrumenti izmenično odmikamo možgansko tkivo med bimanualno manipulacijo tumorja. Uporabljamo pa lahko tudi posebne samodržalce (retraktorje) z navijali in lopaticami, ki pa tkivo ob delovnem kanalu bolj poškodujejo. To je potrebno posebej upoštevati predvsem pri operacijah globokih lezij, do katerih dostopamo skozi elokventne predele možganske skorje. Če je le mogoče, poskusimo transkortikalni pristop do globokih lezij nadomestiti s transsulkalnim ali transfurnim pristopom (Teo 2010, 583; Recinos idr. 2011). Elokventna območja na površini možganov in subkortikalne povezave (možganski traktusi) lahko pred operacijo prikažemo in preučujemo z uporabo magnetnoresonančnega slikanja z difuzijskimi tenzorji (angl. *diffusion-tensor magnetic resonance imaging*), digitalno traktografijo, funkcionalnim magnetnoresonančnim slikanjem (fMRI) in slikanjem z magnetno resonanco visoke ločljivosti (Asthagiri idr. 2007; Teo 2010, 583; Recinos idr. 2011, 516-117). Tako lahko določimo čim bolj varno smer za kirurški delovni kanal (Teo 2010; Recinos idr. 2011, 517).

Stopnje kirurških zapletov se pri odprtih kirurških pristopih gibljejo od 2 % do 9 %. Operativna smrtnost je 1,5-odstotna, možnost za okužbo rane 1,5-odstotna, možnost za krvavitev med operacijo in takoj po operaciji pa je 4,5-odstotna. Čeprav se pri večini pacientov po operaciji zdravstveno stanje izboljša, je kirurška obolevnost pri resekciji možganskih tumorjev okrog 9 % (Fadul idr. 1988, 134-137; Ciric idr. 1990, 375-377). Ostali pooperativni zdravstveni zapleti se lahko pojavijo pri 3 % do 9 % pacientov. Seveda imajo tisti s hudimi poškodbam glave in z akutno žilno patologijo večje tveganje za zaplete, odvisno od kliničnega stanja ob sprejemu in obsega možganskih okvar (Lacroix idr. 2001, 190).

### 2.5.2 Minimalna trepanacija ali kraniotomija v obliki ključavnice

Kraniotomijo lahko izvedemo tudi z oblikovanjem zelo majhne odprtine lobanjske kosti ali tako imenovanim pristopom v obliki ključavnice (angl. *key hole trepanation*) (Reisch idr. 2003). To je modifikacija običajne kraniotomije in je koristna za zmanjšanje pooperativne obolevnosti, povezane s kirurškim pristopom, še posebej pri zdravljenju primarnih možganskih tumorjev (Slika 12). V nasprotju s klasičnimi kraniotomijami so kraniotomije v obliki ključavnice veliko manjše od lezij, ki jih bomo operirali in ki se projicirajo na površino

možganov (Iacoangeli idr. 2016). Pristopi skozi kraniotomije take oblike, kljub majhnemu delu odstranjene lobanjske kosti, še vedno omogočajo dobro oceno lokalne anatomije in so uporabne predvsem za odstranjevanje globoko ležečih tumorjev. Ker se ob takem pristopu na površini možganov razkrije manj anatomije kot v primerjavi s klasično kraniotomijo, je običajno potrebno slikovno vodenje med operacijo z navigacijskimi napravami, kar prispeva k višji operativni varnosti (Zamorano idr. 192, 116-118).

**Slika 12: Minimalna trepanacija ali kraniotomija v obliki ključavnice, ki jo najpogosteje uporabljamo pri operacijah primarnih možganskih tumorjev, ki je modifikacija običajne kraniotomije. Namestitev bolnika pred posegom in priprava nevronavigacije za medoperativno vodenje. Ker je na površini vidnih manj anatomskih značilnosti, je slikovno vodenje zelo dobrodošlo. Uporaba nevronavigacije omogoča poleg boljše kirurške natančnosti, tudi jasno anatomsko beleženje lokacije, od koder so bili vzorci tkiva odvzeti (A). Uvajanje instrumentov za resekcijo tumorja skozi kraniotomijo v obliki ključavnice. Z uporabo te tehnike je obolevnost, povezana s kirurškim pristopom, manjša, prav tako pa tudi stopnja zapletov po operaciji**



Vir: Roman Bošnjak, UKC Ljubljana 2021.

Sočasna uporaba endoskopa lahko izboljša obseg resekcije z dostopom do preostalega tumorja v robnih delih resekcijske votline, kar je z uporabo operativnega mikroskopa včasih težje izvedljivo (Iacoangeli idr. 2016, 180-181). Nevronavigacijo lahko uporabimo kot dodatek za načrtovanje najbolj optimalne kirurške poti do lezije. V pomoč sta tudi intraoperativni ultrazvok ali intraoperativno slikanje z magnetno resonanco (MR), kadar sta ti preiskavi na razpolago (Schaller idr. 1997; Renfrow idr. 2017). Nevronavigacijo lahko v

nujnih primerih izpustimo, zlasti kadar čas, potreben za pripravo posega, podaljša operacijo. Kot pri odprtih operacijah, je tudi pri kraniotomijah v obliki ključavnice na razpolago veliko tkiva za nadaljnjo uporabo *in vitro*, predvsem pri makroskopskih resekcijah. Dejavniki, ki vplivajo na količino tkiva in njegovo razpoložljivost za uporabo v laboratoriju, vključujejo dostopnost do lezije, njeno lokacijo in lastnosti lezije (žilna mreža, konsistenca, velikost in število nerkoz, razporejenost vitalnega tkiva ...) (Reisch idr. 2003, 267; Reisch idr. 2009, 163-164).

Kraniotomije v obliki ključavnice so poleg resekcije primarnih in sekundarnih možganskih tumorjev učinkovite in varne tudi za izvedbo biopsij. Zaradi majhne površine izpostavljene možganske skorje in posledično omejene dostopnosti, pa niso primerne za kirurško zdravljenje poškodb možganov in možganskega edema (Reisch idr. 2003, 266-267; Iacoangeli idr. 2016, 183).

### 2.5.3 Operacije z neuroendoportom

Neuroendoport je operacijski retraktorski sistem v obliki valja ali cevi, ki ga uporabljamo kot koridor do globoko ležečih možganskih lezij (Slika 13). Omogoča bimanualno operacijo z mikrokirurškimi instrumenti pod endoskopsko ali mikroskopsko kontrolo (Engh idr. 2010). Neuroendoport je še posebej uporaben za dostope do globokih možganskih lezij, ki se nahajajo v možganskih prekatih in v bazalnih cisternah, v zadnjem delu talamusa, bazalnih ganglijah in pulvinarju. Pred uporabo neuroendoporta so bile takšne globoke lezije dosegljive le s stereotaktično igelno biopsijo ali z uporabo pasivnih reaktorskih sistemov in nevronavigacije (Rosenorn in Diemer 1982, 826). Kljub temu, da pasivni reaktorji omogočajo dobro vizualizacijo operativnega polja, lahko njihove lopatke v nasprotju z neuroendoportom povzročijo pritisk na možganski parenhim, kar ima za posledico krvavitev in ishemijo zaradi žilnih poškodb (Greenfield idr. 2008, 334-335). Prednost neuroendoporta je namreč bolj enakomerno porazdeljen pritisk na stene operativnega kanala, kar zmanjša poškodbe tkiva, ki jo sicer povzročajo pasivni reaktorji (Engh idr. 2010). Sodobni nevronavigacijski sistemi in različne vrste diagnostičnih preiskav pred operacijo, ki jih uporabljamo za načrtovanje operativnega pristopa, so v veliki meri izboljšali natančnost zdravljenja globokih možganskih lezij in tudi operativno varnost (Ogura idr. 2006).

**Slika 13: Neuroendoport je nameščen za uporabo. Neuroendoport je cevast koridor do globokih možganskih lezij skozi možgansko tkivo. Instrumenta, bipolarna pinceta in aspirator, nato uvedemo skozi neuroendoport v smeri lezije, pri čemer je možna vizualizacija skozi operacijski mikroskop (A). Uporabimo lahko tudi endoskop, ki je na tej sliki vstavljen skozi razširljivi neuroendoport. Sledijo ostali nevrokirurški instrumenti (B). Resekcija intraventricularnega tumorja skozi razširljivi neuroendoport. Puščice označujejo spodnji rob koridorja neuroendoporta (C)**



Vir: Roman Bošnjak in Tomaž Velnar, UKC Ljubljana 2021.

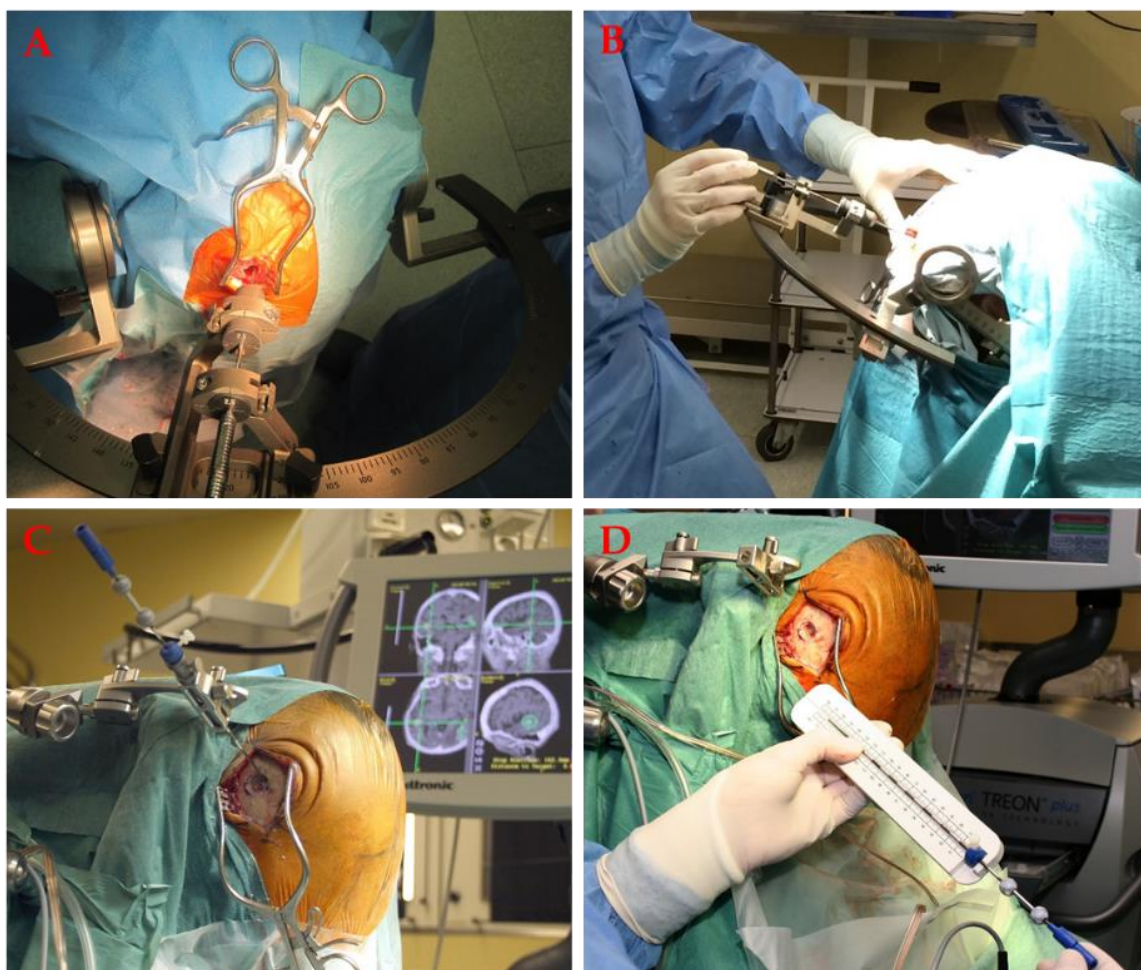
Operativna tehnika z uporabo neuroendoporta je postala nov standard pri resekciji široke palete različne možganske patologije, od tumorjev do infekcijskih obolenj in krvavitev. Najpogosteje neuroendoporte uporabljamo pri resekciji globoko ležečih lezij, kot so glioblastomi, astrocitomi, gangliogliomi, nevrocitomi, papilomi in ependimomi, intraventricularni meningiomi, možganski abscesi, kavernozi angiomi, intraparenhimski hematomi, za dostop do možganskih prekatov pri zdravljenju masivnega hematocefalusa, pri operacijah metastaz in arteriovenskih malformacij v horoidnem pletežu (Kassam idr. 2009; Romano idr. 2009). Najnovejše raziskave so pokazale, da je minimalno invazivna endoskopsko vodena operacija skozi neuroendoport učinkovita in varna (Kassam idr. 2009, 122; Margetis in Souweidane 2013, 4). Tkivni vzorci, ki jih dobimo pri teh vrstah operacij, so navadno dobro ohranjeni in dokaj veliki, tako pri kombiniranih operacijah z neuroendoportom, kjer uporabljamo operativni mikroskop ali endoskop, kot pri posegih z odprto kirurgijo ali pri kraniotomijah v obliki ključavnice. Tako je na razpolago zadostna količina tkiva za izolacijo celic. Take tkivne vzorce lahko pregledamo, odstranimo nekrotične in kontaminirane dele ter tiste, ki vsebujejo veliko število eritrocitov, saj ti motijo proces izolacije. Najbolj primerne vzorce nato uporabimo v nadaljnjih postopkih izolacije (Ogura idr. 2006, 784; Hojat idr. 2019, 66).

#### 2.5.4 Stereotaktična igelna biopsija

Stereotaktična igelna biopsija je razmeroma nova tehnika, ki je bila prvič uvedena v klinično prakso v sedemdesetih letih (Gildenberg 2013). Cilj posega je natančna lokalizacija tarče. Navadno je to zelo majhno območje ali prostornina v možganih, od koder s pomočjo vnaprej določenega minimalno invazivnega pristopa odvzamemo tkivo za diagnozo. Tarčo določimo s pomočjo referenčnega sistema, ki je sestavljen iz različnih ekstra- in intrakranialnih označevalcev (markerjev) (Nashold 1970, 91-92). Stereotaktično biopsijo lahko izvedemo s pomočjo stereotaktičnega okvirja, ki deluje kot zunanje, ekstrakranialno referenčno območje in koordinatni sistem, ali pa brez okvirja (Slika 14). Kadar uporabljamo stereotaktično tehniko z referenčnim okvirjem, je potrebna predoperativna računalniška tomografija (CT) ali magnetna resonanca, saj moramo za načrtovanje ustrezne trajektorije do lezije slike združiti in določiti referenčne točke, na osnovi katerih bomo med posegom načrtovali ustrezen pristop (Nashold 1970, 92; Gildenberg in Labuz 2006, 651-653). V zadnjih letih postajajo vse bolj priljubljeni stereotaktični sistemi brez okvirjev (slikovno vodene igelne biopsije), ker je njihova uporaba bolj enostavna in hitra, potrebno pa je le eno predoperativno slikanje, običajno z magnetno resonanco. Računalniško generiran tridimenzionalni model pacientove glave in možganov (pridobljen iz slik magnetne resonance in računalniške tomografije) določimo na dejanskem položaju pacientove glave s površinsko registracijo orbito-nazo-frontalnega območja, kadar je pacient že nameščen v splošno anestezijo. Do nekaterih globoko ležečih lezij možganskega debla in zadnje kotanje pa je mogoče natančno in varno dostopati le s stereotaktičnimi sistemi, ki temeljijo na namestitvi okvirja (Nashold 1970, 92; Maciunas idr. 1994, 682; Bullard in Nashold 1995, 27; Gildenberg in Labuz 2006, 655-658).



**Slika 14: Stereotaktična biopsija s pomočjo stereotaktičnega okvirja za operacije globokih možganskih lezij. Viden je stereotaktični lok s pritrjenim vodilom za uvajanje biopsijske igle (A). Uvajanje biopsijske igle (B). Stereotaktična biopsija brez okvirja. Biopsijsko trajektorijo med postopkom nameščanja vodila za uvajanje biopsijske igle prilagajamo glede na nevronavigacijsko podprto načrtovanje dostopa do tarče (lezije) (C). Biopsijska igla za stereotaktično biopsijo brez okvirja in prilagajanje dolžine biopsijske igle (D)**



Vir: Roman Bošnjak in Tomaž Velnar, UKC Ljubljana 2021.

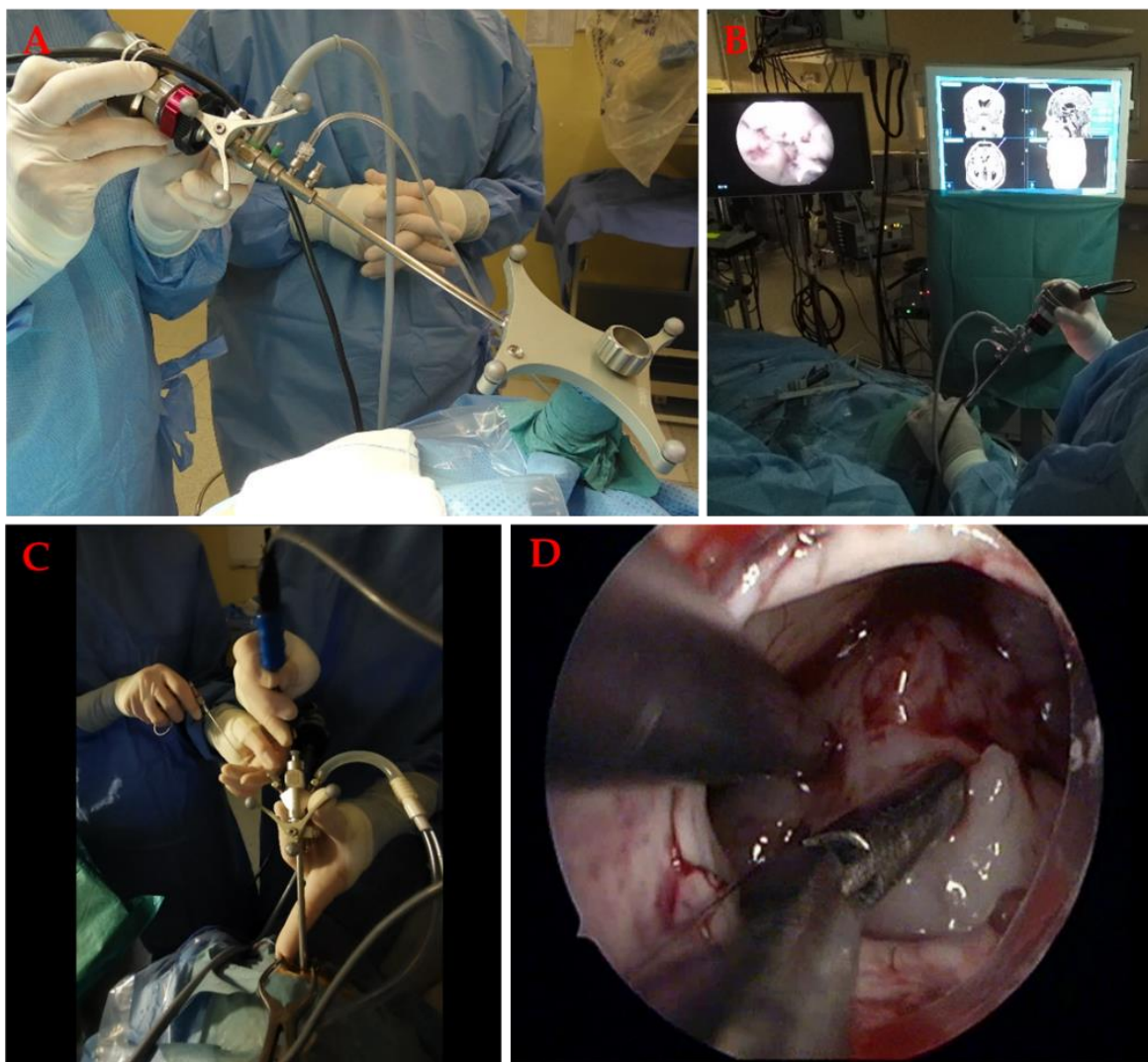
Stereotaktična biopsija lahko zagotovi natančno patološko diagnozo s ciljno natančnostjo od 2 mm do 4 mm. Diagnostična natančnost je visoka in se giblje med 70 % in 93 % (Maciunas idr. 1992, 106; Maciunas idr. 1994, 688). Diagnostično natančnost lahko še povečamo z intraoperativno uporabo fluoresceina, ki poveča diagnostični donos in izboljša operativno varnost. Nevrološko intakten pacient z majhno, globoko locirano solitarno lezijo ali z več

lezijami z minimalnim masnim učinkom je dober kandidat za takšno vrsto zdravljenja. Prav tako so primerni pacienti s cističnimi tumorji, ki jih je čisto mogoče izprazniti z aspiracijo skozi stereotaktično iglo in s tem zmanjšati pritisk na okoliško možganovino ter tako znotrajlobanjski tlak. Močno vaskularne lezije zaradi visoke nevarnosti krvavitve niso primerne za stereotaktično biopsijo. Poudariti je potrebno, da stereotaktično igelno biopsijo lahko uporabljamo izključno za tumorje in druge nevrodegenerativne lezije in je to bolj diagnostičen postopek, kot pa postopek zdravljenja (Heilbrun idr. 1992, 96-97; Shams idr. 1996, 177-178; Pennlund idr. 2021, 2-3). Smrtnost se giblje okoli 2 %, kirurških zapletov pa je okoli 3 % (Plunkett idr. 1999, 119). Tu so vzorci odvzetega tkiva majhni, običajno merijo približno 1 mm v širino in 2 mm ali 3 mm v dolžino in so včasih močno kontaminirani s krvjo. Velikost in sestava tkivnih vzorcev imata pomembno vlogo pri izolaciji celic, saj lahko vplivata na število in značilnosti rasti izoliranih celic. Računati moramo tudi na napake pri vzorčenju zaradi heterogenosti tkiva, predvsem pri vzorčenju večjih lezij (Kepes 1994, 19; Plunkett idr. 1999, 117).

#### 2.5.5 Nevroendoskopski posegi

Pri nevroendoskopiji uporabljamo endoskop za zdravljenje raznolike patologije centralnega živčnega sistema (Slika 15) (Abbott 2004; Decq idr. 2013). Ta tehnika sega v začetek 20. stoletja in se je do danes močno razvila. Sprva so bili nevroendoskopski postopki omejeni na prekate (ventrikulostomija). Danes navigirano nevroendoskopijo uporabljamo za zdravljenje številnih znotrajlobanjskih patoloških sprememb znotraj in zunaj prekatov, pri endoskopski suturektomiji za zdravljenje skafocefalijske, za implantacijo radioaktivnih vsadkov pri brahiterapiji in kot dodatek standardnim operativnim tehnikam, kjer pretežno uporabljamo operativni mikroskop (Romano idr. 2009; Decq idr. 2013; D'Angelo idr. 2020, 518).

**Slika 15: Nevroendoskopija. Nevroendoskop je potrebno najprej umeriti, to pomeni, da ga združimo z nevronavigacijskim sistemom (A). Med posegom na monitorju opazujemo kirurško polje. Natančen položaj konice endoskopa na sliki kaže drugi monitor, ki je povezan z nevronavigacijskim sistemom (B). Popoln nevroendoskopski poseg z endoskopom z dvema delovnima kanaloma (C). Pogled skozi nevroendoskop med resekcijo tumorja (D)**



Vir: Roman Bošnjak in Tomaž Velnar, UKC Ljubljana 2021.

Nevroendoskopija je ena od minimalno invazivnih tehnik, katere cilj je zmanjšati možgansko poškodbo, povezano z operativnim pristopom, in izboljšati vizualizacijo tkiva z bolj intenzivno povečavo in osvetlitvijo (Yokoh idr. 1983, 919; Decq idr. 2013). Kožna rana, kraniotomija in izpostavljenost možganov so pri tem posegu minimalni, prav tako pa tudi

premik možganskih mas, do katerega velikokrat pride med posegom. Tehnično ločimo dva načina izvajanja neuroendoskopskih operacij: popolne endoskopske posege in endoskopsko asistiranje posege. Popolno endoskopsko operacijo lahko učinkovito uporabljamo pri zdravljenju ventrikularnih obolenj (Pernecky in Fries 1998, 224-226; Fries in Pernecky 1999, 32-35). Tukaj je dostop omogočen preko delovnih kanalov neuroendoskopa, običajno sta to dva ali eden. Istočasna uporaba dveh instrumentov omogoča tudi nekaj manipulacije s tkivom med operacijo. Nasprotno pa pri endoskopsko asistiranih operacijah endoskop uporabljamo le kot pripomoček za dober prikaz tkiva in operativne votline, kar v tem primeru nadomešča operativni mikroskop. Instrumenti so pri endoskopsko asistiranih operacijah nameščeni ob strani endoskopa, kar omogoča dvoročno delo s kirurškimi instrumenti z mikrokirurško tehniko (Fries in Pernecky 1999, 30; Teo 2000, 516-517). Neuroendoskopijo lahko izvedemo skozi klasično trepanacijo, navadno skozi vrtino v lobanjski kosti ali skozi kraniotomijo v obliki ključavnice, lahko pa tudi skozi neuroendoport. Kot dodatek velikokrat uporabljamo nevronavigacijo, saj ta omogoča izbiro optimalnega položaja vrtine ali kraniotomije in uvajanja neuroendoporta ter izbiro najvarnejšega pristopa do lezije, s čimer zmanjšamo tveganje za poškodbe vitalnih struktur (Harris idr. 2005; Romano idr. 2009, 314-315). Poleg tega lahko pri nevrokirurških posegih endoskop uporabljamo tudi kot dodatek h klasični mikroskopski kirurgiji za končni pregled resekcijske votline, saj neuroendoskop omogoča tudi prikaz mrtvih kotov, ki jih včasih pri uporabi operativnega mikroskopa ni mogoče pregledati (Wilson idr. 2014, 254; D'Angelo idr. 2020, 518). Vzorci tkiv, pridobljeni med neuroendoskopijo, se razlikujejo po velikosti, odvisno od vrste neuroendoskopske metode, torej od popolnega endoskopskega posega ali endoskopsko asistiranega posega. Tisti, pridobljeni z endoskopsko asistirano tehniko, so boljše ohranjeni in večji, saj morajo biti delci tkiva, odvzeti med popolnim endoskopskim posegom, primerni za instrumente, ki drsijo skozi tesen neuroendoskopski delovni kanal. Zaradi tega so majhni, tkivo pa je pogost stisnjeno ali zdrobljeno. To lahko včasih ovira uspešno izolacijo celic zaradi večjega števila nekrotičnih arealov in krvavitev (Teo 2000, 520-522; Wilson idr. 2014, 249-254; Stachura idr. 2019, 109-112).

Vrsta nevrokirurškega pristopa je odvisna od številnih dejavnikov, povezanih s pacientom, značilnostmi tumorja in tehničnimi zmožnostmi. Z raziskovalnega vidika vse to vpliva na kakovost odvzetega tkiva, kar pa ni pomembno le za končno diagnozo in nadaljnje možnosti zdravljenja, ampak tudi za nove raziskovalne možnosti. Novi tehnološki dosežki v

nevrokirurgiji poleg boljših možnosti zdravljenja poenostavljajo tudi vzorčenje živčnega tkiva. Omogočajo odvzeme tkivnih vzorcev z različnih lokacij, z vse večjo natančnostjo, boljšo integriteto in večjo količino tkiva. Ker je ustreznost tkivnega vzorca osnova za vse nadaljnje postopke v pogojih *in vitro*, je celovitost in stanje odvzetega tkiva osnova za izolacijo celic.

## **2.6 Ocena dosedanjih raziskav o izolacijah astrocitov**

Astroцитi že dolgo časa veljajo za strukturne in podporne celice živčevja, ki ščitijo nevrone in podpirajo njihovo delovanje (Oberheim idr. 2009, 3283; Chaboub in Daneen 2012, 380). Koncept, da bi lahko motnje v delovanju astrocitov sprožile mehanizme, ki bi povzročili patološke spremembe v centralnem živčnem sistemu in prispevali k pojavu kliničnih simptomov, na splošno v raziskovalni in klinični praksi veliko časa ni bil upoštevan. Razvil se je šele v zadnjih desetletjih in zato postajajo poskusi novih tehnik njihove izolacije in proučevanje delovanja astrocitov v pogojih *in vitro* vse bolj pomembni (Oberheim idr. 2009, 32843-3287; Chaboub in Daneen 2012, 379).

Znano pa je, da sta izolacija in gojenje astrocitov v celični kulturi zapletena. Do sedaj je bilo to deloma posledica pomanjkanja laboratorijskih tehnik za preučevanje njihovih fizioloških procesov v pogojih *in vitro*. Zaradi tega je bilo tudi razumevanje njihove biologije veliko časa oteženo (Foo idr. 2011, 799). V zadnjem času pa se je znanje o oblikah astrocitov, njihovem delovanju, interakcijah, vlogah in funkciji v zdravih in patoloških razmerah močno povečalo. Danes veljajo te celice za zelo heterogeno skupino, ki imajo različne in pomembne funkcije, tako v normalnih funkcijah centralnega živčevja kot v bolezenskih stanjih (Montgomery 1994, 145; Hansson 1998, 942-944; Sofroniew 2005, 400). Ta koncept astrocitne heterogenosti je dandanes ključnega pomena pri preučevanju njihovih vlog in reakcij na zdravje in bolezni (Montgomery 1994, 145; Hansson 1998, 942; Jack idr. 2015, 512; Wyss-Coray 2016, 180). Kljub vsemu napredku pa je razumevanje delovanja astrocitov, njihovega razvoja, funkcije in signalnih interakcij z drugimi vrstami celic zaradi kompleksnosti še vedno le ena od začetnih stopenj (Araque idr. 1999, 699-700; Sofroniew 2005, 400; Khakh in Sofroniew 2015, 942-943; Shandra in Robel 2019, 234). Zaradi svoje kompleksnosti astroцитi tako postajajo vse bolj pomembni za študije fizioloških in patofizioloških procesov v pogojih *in vitro* (Sharif idr. 2006; Nimmerjahn 2009, 1639; Sharif in Prevot 2012, 137; Wyss-Coray 2016, 180). Doslej je bilo objavljenih več raziskav na

poskusnih živalih in na astrocitih, izoliranih iz živalskih tkiv, ki jih v eksperimentalni praksi največ uporabljamo, saj so relativno lahko dosegljivi in jih je mogoče do določene mere tudi vzdrževati v celičnih kulturah. Nasprotno pa je v literaturi zelo malo poročil o izolaciji človeških astrocitov (Sharif in Prevot 2012, 137; Wyss-Coray 2016, 180; Li idr. 2019, 664-667; Kwon in Koh 2020, 3-5). Znano je, da astrocitne kulture najpogosteje izolirajo iz možganov glodalcev, kar je tudi bilo poglobitnega pomena za razkritje njihovih funkcij. Posledično je veliko raziskav na teh celicah temeljilo na živalskih celičnih kulturah, kar pa je osnova proučevanja še danes (Sharif idr. 2006; Nimmerjahn 2009, 1639-1640; Khakh in Sofroniew 2015, 942-943).

Kljub uporabnosti celičnih kultur glodalcev in deloma tudi ostalih živalskih vrst, pa teh živalskih modelov zaradi pomembnih razlik med astrociti živali in človeka ni mogoče neposredno uporabiti za raziskovanje podobnih procesov pri človeku. Obstoj medvrstnih razlik zahteva previdnost pri interpretaciji rezultatov poskusov na živalskih in človeških astrocitih (Oberheim idr. 2009, 3277; John 2012, 401-402). V primerjavi z živalskimi modeli se človeški astrociti, izolirani iz možganske skorje odraslih darovalcev, razlikujejo glede na raznolikost, kompleksnost, velikost in funkcije (Araque idr. 1999, 670; Shandra in Rober 2019). Zaradi tega je za študij patofizioloških mehanizmov pri ljudeh bolj primerna in zaželena kultura človeških astrocitov, ki jih lahko pridobimo iz neonatalnih tkiv ali pa od odraslih darovalcev (Nakegawa in Schwartz 2004, 203; Chaboub in Deneen 2012, 379-380; Duong idr. 2021, 2-5).

Čeprav lahko morfologijo in funkcijo astrocitov preučujemo tudi v poskusih *in vivo*, pa je kultura astrocitov *in vitro* zelo pomembna (Chew idr. 2014). Za takšne vrste proučevanja so potrebne metode, ki omogočajo neposredno izolacijo celic iz tkiva in njihovo gojenje v kulturi (Sofroniew 2005, 401-405; Chew idr. 2014). Glavne prednosti kulture astrocitov vključujejo možnost izvajanja biokemijskih analiz v dobro in natančno nadzorovanem eksperimentalnem celičnem okolju, zmanjšano kompleksnost celic in njihovih interakcij v primerjavi s celimi možgani, možnost manipulacije ekspresije genov in izvajanje elektrofizioloških raziskav (Sofroniew 2005, 401-405). Poleg tega so astrociti, ki so bili izolirani iz različnih možganskih regij in gojeni v celični kulturi tudi heterogeni v izražanju imunoreaktivnih površinskih celičnih označevalcev, citokinov in kemokinov ter se med seboj razlikujejo po morfologiji. Zato je bolj premerno in smotrno, da te celice proučujemo ločeno od ostalih celic in njihovih medsebojnih povezav, to pomeni izolirano v pogojih *in*

*vitro* (Nakagawa in Schwartz 2004, 203; Sofroniew 2005, 403; John 2012, 402; de Majo idr. 2020, 2).

Vir človeških astrocitov je v raziskovalni praksi dostopen iz dveh izvorov. Enega predstavljajo možgani novorojenčkov, ki so vir za fetalne ali neonatalne astrocite. Drugi izvor predstavljajo odrasli darovalci, ki so vir odraslih astrocitov (Sharif in Prevot 2012, 138). Oboji imajo svoje prednosti in slabosti, ki jih moramo upoštevati v eksperimentalni praksi. Za oboje pa velja, da jih je težavno izolirati in gojiti v kulturi (Hansson 1988, 370; Sharif in Prevot 2012, 138). Kulture neonatalnih astrocitov na začetku zelo hitro rastejo in se razmnožujejo. Po štirih do šestih mesecih rasti v celični kulturi pa začnejo kazati znake celične senescence, kar je sicer za tako vrsto celic razmeroma pozno. Astrociti, ki so izolirani iz možganov odraslih darovalcev, pa imajo nasprotno zelo omejeno proliferativno aktivnost. V kulturi ne rastejo dolgo in jih tudi ni mogoče enostavno subkultivirati. Zaradi tega imajo te kulture omejeno uporabnost (Sofroniew 2005; Sharif in Prevot 2012, 137-138). So pa ti astrociti priročne in koristne celice za vključitev v celične modele za eksperimentiranje, zlasti pri proučevanju nevrodegenerativnih bolezni, saj njihovih patofizioloških mehanizmov ni mogoče preučevati na kulturi celic, izoliranih iz tkiva novorojenčkov. V primerjavi z neonatalnimi astrociti pa odrasli astrociti izražajo tudi več različnih genov in presnovnih encimov, kar jim daje drugačne značilnosti, tako *in vivo* kot *in vitro* (Montgomery 1994, 145-146; Lee idr. 2008, 13121-13122; Foo idr. 2011, 781; Kettenmann in Verhatsky 2011, 588; Espay idr. 2018, 802).

Fetalne ali neonatalne astrocite lahko dobimo iz možganskega tkiva plodov med devetim in 22 tednom starosti, odvzetega po abortusih (John 2012, 404; Sharif in Prevot 2012, 138). Ker takšnih posegov ni veliko, se postavlja vprašanje dostopnosti tkiva. Tudi čas za optimalen odvzem tkiv je pri teh posegih problematičen. Da bi lahko čim bolj upočasnili nekrobiotične procese v odvzetem tkivu in s tem zmanjšali število nekrotičnih in apoptotičnih celic, mora biti sodelovanje med kliničnim oddelkom in celičnim laboratorijem dobro in usklajeno. Poleg tega vsi neonatalni darovalci niso primerni za odvzem tkiva za celično izolacijo (Hansson 1988, 370-392; Kimelberg 2004, 193; Wyss-Coray 2016, 180-182). Po podatkih iz literature je primerno le tkivo plodov, zbranih po vakuumskih aspiracijah. Pri medikamentozno opravljenih abortusih pa tkivo ni primerno za celične izolacije, saj lahko farmacevtska sredstva, ki se uporabljajo za fetalno smrt, vplivajo na sposobnost preživetja celic in s tem zmanjšajo možnosti za uspešno vzpostavitev primarne

celične kulture (Sharif idr. 2006, 4076; John 2012, 402; Sharif in Prevot 2012, 138). Poleg tega dejavniki, ki lahko vplivajo na izolacijo astrocitov in povečajo variabilnost od primera do primera, vključujejo različna stanja možganskega tkiva neonatalnih darovalcev in starostne razlike pri neonatalnih darovalcih, saj starost ploda morda nikoli ne bo popolnoma natančna in se bo spreminjala v razponu od enega do dveh tednov. Prevoz v laboratorij se lahko razlikuje in je običajno daljši pri vzorcih možganov, odvzetih po abortusih. V teh primerih je čas prenosa v laboratorij običajno manj kot dve uri. Po drugi strani pa je pri odraslih tkivo običajno bolj stabilno, saj ga jemljemo med biopsijami in v laboratorij pride veliko hitreje, kar omogoča boljše izhodišče za izolacijske postopke (Jakocevski idr. 2009; Rustenhoven idr. 2016).

Astroцитi novorojenčkov se tudi razlikujejo od astrocitov odraslih, saj je diferenciacija neonatalnih astrocitov lahko nepopolna zaradi pomanjkanja normalnih celičnih signalov za diferenciacijo, ki jih sproščajo zrele celice (Giffard in Ouyang 2009; Sharif in Prevot 2012, 138). Poleg tega imajo neonatalni astroцитi različne lastnosti pri izražanju genov in veljajo za bolj aktivirane v primerjavi z odraslimi (Nakagawa in Schwartz 2004, 203). Število genov, izraženih v gojenih odraslih astroцитih in v neonatalnih astroцитih, je primerljivo, vendar obstajajo velike razlike v genskih razredih. Odrasli astroцитi tako izražajo več genov za proteaze in zaviralce proteaz v primerjavi z neonatalnimi. V odraslih astroцитih je aktivnih tudi več genov presnovnih encimov, kar kaže na večjo stopnjo presnovne aktivnosti. Nasprotno pa astroцитi novorojenčkov izražajo bolj aktivne gene, tiste, ki so pomembni za vezavo DNA, apoptozo, uravnavanje celičnega cikla, adhezijo celic, izdelavo citoskeleta in zunajceličnega matriksa ter gene za prenos signalov. Ugotovljeno je bilo, da samo astroцитi v postnatalnih možganih izražajo gen za glialni fibrilarni kisli protein (GFAP) (Wu idr. 1998; Nakagawa in Schwartz 2004, 203; Chew idr. 2014). Te razlike so še posebej pomembne pri uporabi astroцитnih celičnih kultur za preučevanje nevrodegenerativnih bolezni. Eksperimentalnih rezultatov iz astrocitov novorojenčkov zato ni mogoče prenesti neposredno na odrasle in prav tukaj vidimo superiornost kulture odraslih astrocitov pri preučevanju nevrodegenerativnih obolenj. Za raziskave patofiziologije odraslih so tako bolj primerne celične kulture odraslih astrocitov (Kimelberg 2004; Obeheim idr. 2009; Sofroniew in Vinters 2010; Chaboub in Deneen 2012; Sharif in Prevot 2012, 138).

Po drugi strani pa je tkivo za izolacijo odraslih astrocitov v primerjavi z možgani novorojenčkov veliko lažje dostopno (Kimelberg 2004; Lee idr. 2008, 13117-13118; Sharif



in Prevot 2012, 138). Na voljo je veliko več kirurških posegov, pri katerih lahko odvzamemo tkivo za izolacijo, navadno med odprto resekcijo ali pri različnih vrstah biopsij. Najpogostejši viri možganskega tkiva odraslih izvirajo iz možganske skorje pri operacijah možganskih tumorjev, pri kirurškem zdravljenju možganskih poškodb, epilepsije ali vaskularne patologije. Pri globoko ležečih možganskih lezijah lahko z biopsijami dostopamo do globokih možganskih struktur. To je pomembno, saj se tudi astrociti iz različnih regij možganov med seboj razlikujejo, zato je pomembno, iz katerih regij možganov so bili izolirani (Kimelberg 2004; Lee idr. 2008, 13117-13118; Jack idr. 2015, 512; Khakh in Sofroniew 2015, 942-944; Wyss-Coray 2016, 180-182). Vsi ti tkivni vzorci, ki jih bomo uporabili za izolacijske postopke, predstavljajo odvečno možgansko tkivo, ki ne bo uporabljeno za patohistološke preiskave, in ga navadno v klinični praksi po predpisanih protokolih ustrezno odstranimo (Lee idr. 2008, 13118-13119; Sharif in Prevot 2012, 139; Khakh in Sofroniew 2015, 944-950).

Na področju izolacije odraslih astroctov je publikacij malo in zato obstaja še veliko raziskovalnih možnosti. Po našem vedenju do sedaj še ni bilo opisanega protokola izolacije astrocitov iz tkiva odraslega darovalca, pridobljenega po nevrotravmi in žilnih operacijah. Zato je namen raziskave razviti tehniko celične izolacije, s katero bi lahko vzpostavili uporabno človeško astrocitno celično kulturo, ki bo boljša od dosedanjih fetalnih in živalskih celičnih kultur. Tako izolirani astrociti bodo predstavljali osnovo funkcionalnega celičnega modela za proučevanje nevrodegenerativnih obolenj v pogojih *in vitro*. Uporabni pa bodo tudi pri ostalih celičnih raziskavah, ki bodo vključevale astrocite in proučevanje njihovih interakcij z ostalimi celicami centralnega živčevja v funkcionalnih celičnih modelih. Nov prispevek raziskave je torej uspešna izolacija astrocitov odraslih darovalcev in njihovo gojenje v celični kulturi, ki bo uporabna kot funkcionalni celični model za proučevanje nevrodegenerativnih bolezni.

Izoliranim odraslim človeškim astroцитom smo dali ime MFUM-Astro-1. Pravila poimenovanja izoliranih celic namreč določajo, da je v imenu označba institucije, kjer so bile celice izolirane, sledi ime celic in številka označba izolacije. V našem primeru so to celice, ki so bile izolirane na Medicinski fakulteti Univerze v Mariboru, astrociti so oznaka za vrsto izoliranih celic, številka 1 pa določa označbo uspešne izolacijske procedure.

### **3 EMPIRIČNI DEL**

#### **3.1 Namen in cilji raziskovanja**

Namen doktorske disertacije je bil vzpostaviti nov, preprost, učinkovit in ponovljiv protokol za izolacijo in gojenje visoko obogatene primarne kulture astrocitov, pridobljene iz možganskega tkiva odraslih darovalcev po nevrotravmi in po vaskularnih operacijah, kar je novost na tem področju. Glede na pregled razpoložljive literature je takšna celična kultura astrocitov prva iz regije možganov, od koder smo vzorec odvzeli.

Cilji raziskave so bili:

- iz kortikalnih in subkortikalnih regij neokorteksa starejših darovalcev izolirati celično kulturo astrocitov,
- v laboratorijskih pogojih gojiti celično kulturo astrocitov in jo subkultivirati,
- preveriti ustreznost fenotipa celične kulture astrocitov z imunocitokemičnimi metodami za izražanje specifičnih astrocitnih označevalcev: glialni fibrilarni kisli protein (GFAP), glutamat-aspartatni transporter (GLAST) in protein S100B,
- ugotoviti morfološko primernost izoliranih astrocitov s fluorescenčnim barvanjem aktinskega citoskeleta,
- vzpostaviti celično kulturo kot osnovo za funkcionalni celični model za proučevanje nevrodegenerativnih bolezni.

#### **3.2 Raziskovalna hipoteza**

V laboratoriju bomo razvili hiter, uporaben, enostaven in ponovljiv laboratorijski protokol za izolacijo obogatene primarne kulture človeških astrocitov za izdelavo celičnega modela za proučevanje nevrodegenerativnih bolezni.

#### **3.3 Raziskovalna metodologija**

V teoretičnem delu doktorske disertacije smo uporabili deskriptivno metodo raziskovanja s sistematičnim pregledom literature, kjer smo opisali funkcije astrocitov, dosedanje raziskave

na tem področju in pomen astrocitov pri delovanju centralnega živčevja v fizioloških in patoloških razmerah. Predstavili smo tudi tehnike izolacije teh celic, njihove interakcije z ostalimi nevroglialnimi celicami ter nevroni, kirurške tehnike in metode za odvzem možganskega tkiva in izolacijske postopke za vzpostavitev astrocitne celične kulture. Pri tem smo uporabili tujo in slovensko relevantno literaturo. Proučili smo znanstvene in strokovne vire, dostopne v podatkovnih zbirkah PubMed, Researchgate in ScienceDirect, ter v Digitalni knjižnici Slovenije, knjižnici Medicinske fakultete v Ljubljani in Medicinske fakultete v Mariboru.

V raziskovalnem delu smo uporabili eksperimentalno metodo raziskovanja. V pogojih *in vitro* smo razvili izolacijski postopek za vzpostavitev celične kulture astrocitov odraslih darovalcev, ki bi bili primerni za eksperimentalno uporabo v funkcionalnih celičnih modelih pri proučevanju nevrodegenerativnih obolenj. Vzorce možganskega tkiva smo dobili pri nevrokirurških posegih, ki so bili opravljeni v Univerzitetnih kliničnih centrih v Ljubljani in Mariboru. Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko 2. 3. 2021, številka 0120-565/2020/5.

Raziskovalna aktivnost je potekala v skladu z uveljavljenimi etičnimi načeli raziskovanja s celičnimi kulturami in s privoljenjem sodelujočih darovalcev tkivnih vzorcev ter lečečih kirurgov. Testiranje smo izvedli v laboratoriju Inštituta za biomedicinske vede na Medicinski fakulteti v Mariboru. Standard, ki ureja delo in testiranje na celičnih kulturah ter preizkušanje biološke kompatibilnosti je določen pod kodo ISO 10993-1:2009 in v skladu z njim so bila tudi izvedena vsa testiranja na Inštitutu za biomedicinske vede na Medicinski fakulteti v Mariboru.

### 3.3.1 Metode in tehnike zbiranja vzorcev

#### Darovalci možganskega tkiva in odvzem tkivnih vzorcev

Tkivo za izolacijo odraslih človeških astrocitov je bilo pridobljeno pri nevrokirurških operacijah. Imeli smo dve skupini darovalcev. Darovalci tkiva so bili odrasli pacienti s hudo poškodbo možganov, kjer je bil nevrokirurški poseg potreben zaradi kontrole in evakuacije znotrajlobanjske krvavitve, zmanjšanja možganskega edema, odstranitve tujkov in rekonstrukcije poškodovane lobanjske kosti ter odstranitve nekrotičnih arealov možganovine v kortikalnih in subkortikalnih področjih, ki so bila poškodovana (Slika 16).

**Slika 16: Operativna oskrba strelne možganske poškodbe. Tujke, odmrle delčke lobanjske kosti in možganovine odstranimo. To odstranjeno tkivo, ki ga prenesemo v celični laboratorij, lahko po ustrezni obdelavi uporabimo za izolacijo možganskih celic. Na sliki je viden očiščen rob strelnega kanala, ki ga obdaja kontudirana možganovina**



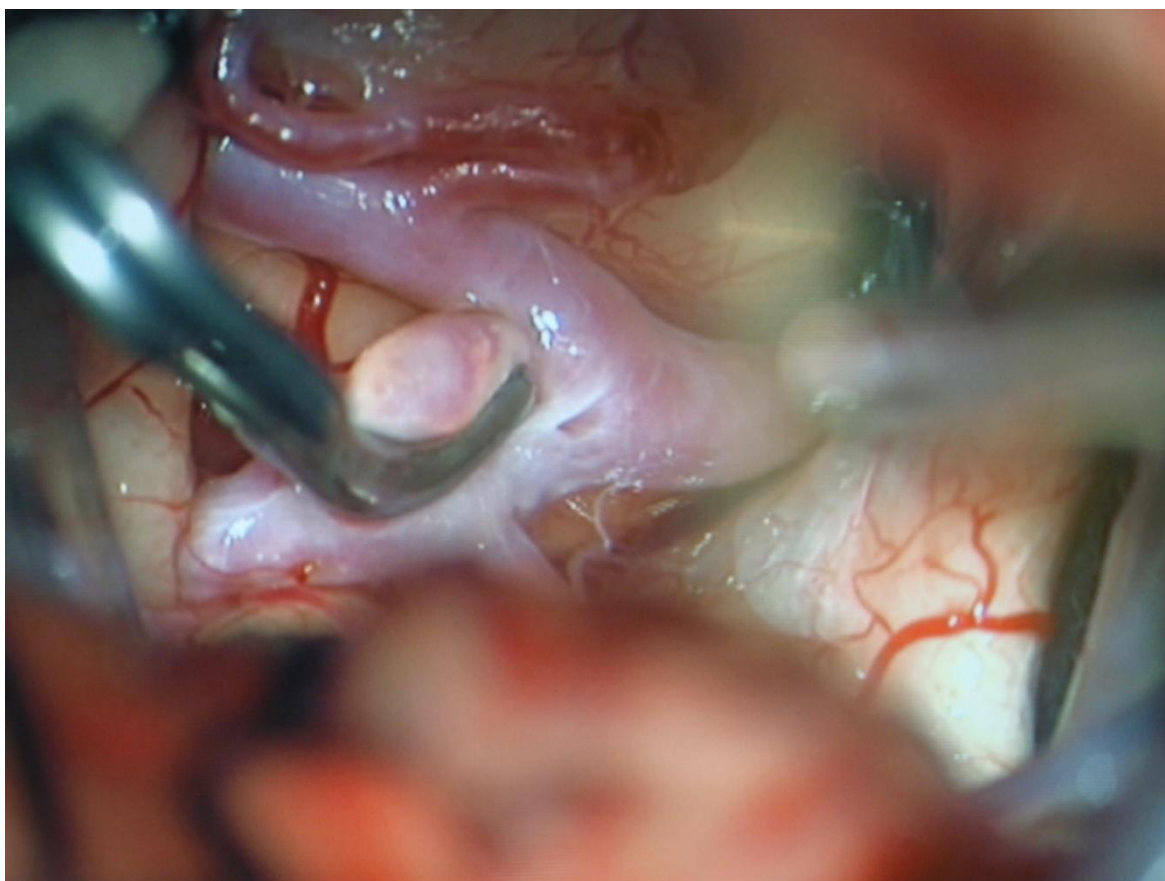
Vir: Roman Bošnjak, UKC Ljubljana 2018.

Možgansko tkivo za izolacijo celic je bilo odvzeto v sterilnih pogojih iz kortikalnih in subkortikalnih področij desnega frontoparietalnega režnja. Ti vzorci tkiva so ustrezali neokortikalnim področjem. Med operacijo je bila odvzeta tako siva, kot pod njo ležeča bela substanca. Te odstranjene dele možganskega tkiva po operacijah zavržemo, lahko pa jih uporabimo tudi za laboratorijske raziskave. Posebna skrb je bila nemenja odvzemu tkivnih vzorcev, da smo lahko za pokus uporabili najbolj reprezentativne vzorce možganovine. To pomeni, da smo nekrotične, kontaminirane in spremenjene dele odstranjene možganovine (zmečkano in obtolčeno tkivo, kontaminacija s krvjo, tkivo neposredno ob poškodbi, ki je bilo edematozno spremenjeno) zavrgli in jih nismo uporabili za izolacijo celic, saj tako tkivo ni primerno.

Druga skupina darovalcev možganskega tkiva je vključevala paciente, ki so bili operirani zaradi nerupturirane možganske anevrizme. Astrocite, ki so bili izolirani iz vzorcev

možganovine, odvzete pri teh pacientih, smo imeli za kontrolo. Operacije nerupturiranih anevrizem so elektivni posegi, kjer je možganovina mirna in celice niso izpostavljene škodljivim dražljajem, kakor pri drugih patoloških stanjih, kot so poškodbe, presnovne motnje, subarahnoidna krvavitev ... Pri teh pacientih je bilo tkivo za kontrolno kulturo vzeto iz plasti možganovine, ki je pokrivala kupolo anevrizme. Le to je bilo potrebno med operacijo izpostaviti. To tkivo med običajnimi operacijami navadno aspiriramo in zavržemo, če je odvzeto pazljivo, pa je lahko dragocen vir za celične izolacije (Slika 17).

**Slika 17: Prikaz možganske anevrizme včasih zahteva odstranitev tanke plasti kortikalne možganovine v okolici, ki zastira pogled na anevrizmatski vrat in kupolo. Če je ta plast možganovine previdno odvzeta, je lahko dragocen vir za izolacijo možganskih celic. Na sliki je anevrizma izključena iz obtoka s kirurško sponko**



Vir: Roman Bošnjak, UKC Ljubljana 2020.

Protokol izolacije astrocitov smo ponovili šestkrat, saj je bilo med viri tkiva skupaj šest bolnikov: štirje bolniki s poškodbo možganov in dva bolnika z nerupturirano možgansko anevrizmo.

## Prenos tkiva v laboratorij

Po kirurški resekciji so bili fragmenti vitalnega tkiva v sterilnih pogojih še znotraj operativnega polja shranjeni v cenrifugirke z 20 ml medija Advanced DMEM, dopoljenega s 100 IU/ml penicilina, 0,1 mg/ml streptomicina in 2 mM L-glutamina ter takoj prineseni v laboratorij (Slika 18). Za zmanjšanje avtolitičnih procesov v odvzetem tkivu smo material prenesli shranjen na ledu. Za ta prenos smo uporabili posebne transportne posode s stalno temperaturo in vlago. Čas prenosa do laboratorija je bil 15 minut.

**Slika 18: Tkivo po kirurški resekciji shranimo v različne sterilne cenrifugirke s celičnim medijem, ki mu lahko dodamo še antibiotika penicilin in streptomicin za zmanjšanje možnosti bakterijske kontaminacije. Za prenos lahko uporabimo tudi fosfatni pufer raztopino (A in B). Tako pripravljeno tkivo na ledu hitro prenesemo v celični laboratorij (C)**



Vir: Lastna raziskava 2021.

## Začetna obdelava tkiva v laboratoriju

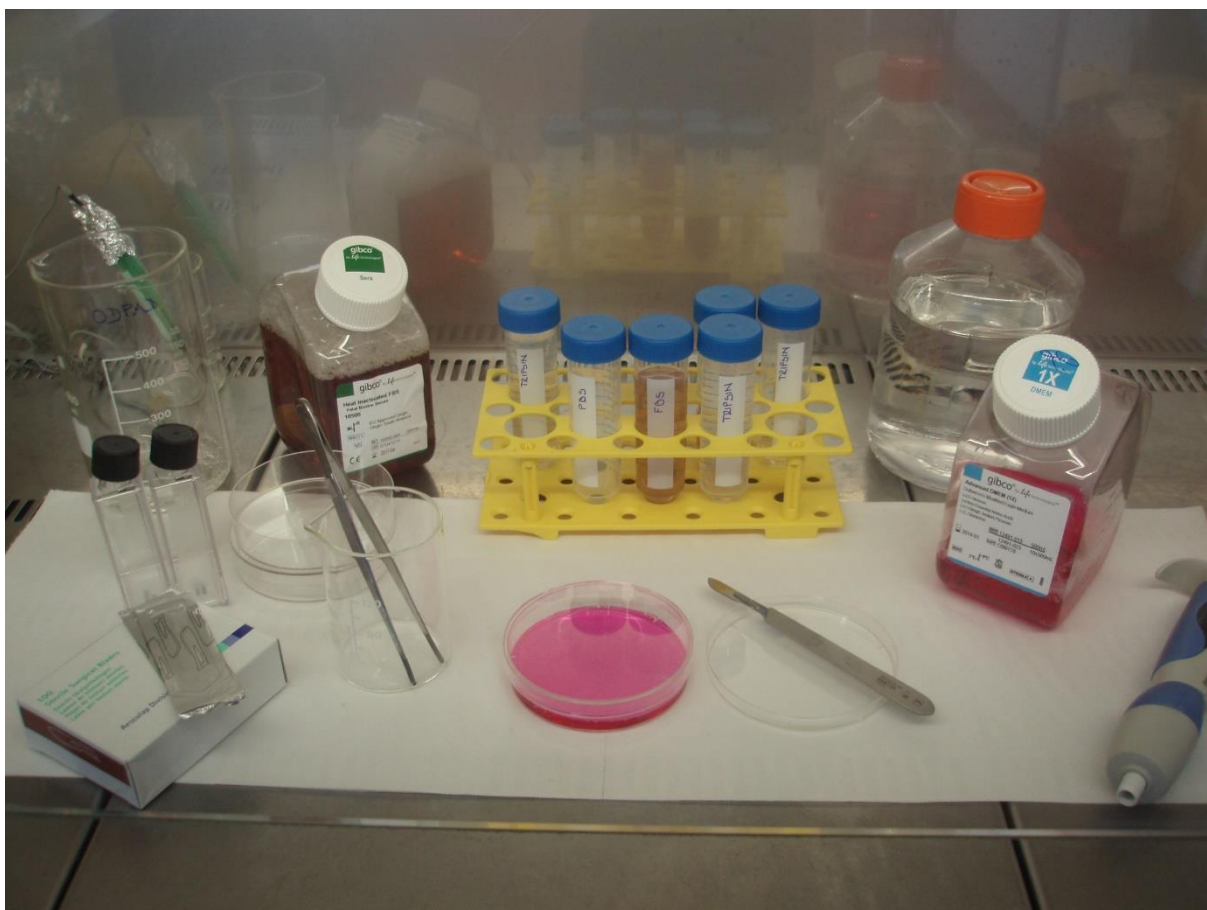
V laboratoriju smo vzorce možganskega tkiva v sterilnih pogojih v komori z laminarnim pretokom zraka odstranili iz transportnih centrifugirk in jih v petrijevkah najprej sprali s fosfatnim pufrom ter jih še enkrat pregledali (Slika 19 in Slika 20). S spiranjem izhodiščnih vzorcev tkiva smo zmanjšali možnost za kasnejšo okužbo izoliranih celic. Odstranili smo predele, ki so bili kontaminirani s krvjo in makroskopsko spremenjeni, saj takega natančnega odstranjevanja okvarjenega in odmrlega tkiva v operacijski dvorani takoj po odvzemu ne napravimo zaradi več razlogov (težnja je, da tkivo čim prej prenesemo v laboratorij, za urejanje vzorcev med operacijo ni časa in lahko to v miru naredimo v laboratoriju). Vzorce smo ves čas hranili na sobni temperaturi in v vlažnem okolju, da bi preprečili izsušitev. Vzorce smo izmerili in stehtali. Vzorci so povprečno merili od 4 mm<sup>3</sup> do 1 cm<sup>3</sup>. Tehtali so od 0,3 g do 1,1 g. Tkivo smo nato po protokolu obdelali, kar je opisano v spodnjih odstavkih.

**Slika 19: Celični laboratorij. V komori z laminarnim pretekom zraka izvajamo vsa pomembna dela s celičnimi kulturami, od priprave tkiva, izolacije, precepljanja, barvanj, karakterizacije in priprave pred zamrzovanjem**



Vir: Lastna raziskava 2021.

**Slika 20: Komora z laminarnim pretokom zraka ter vsemi potrebnimi instrumenti in kemikalijami, ki jih bomo potrebovali za celično izolacijo. V centrifugirkah je shranjeno sveže tkivo, encimi in dodatki za celični medij, v velikih posodah fosfatni pufer in celični medij, ki ga kultura potrebuje za rast. Petrijevka s celičnim medijem pa je pripravljena za tkivo, ki ga bomo pregledali in nato mehansko razgradili na manjše koščke**



Vir: Lastna raziskava 2021.

### 3.3.2 Opis instrumentarija

#### *Laboratorijski material*

- Stekleničke za gojenje celičnih kultur T25 (Corning Costar), 25 cm<sup>2</sup>.
- Mikrotitrne ploščice (Nunc) s 24 vodnjaki (P24).
- Filtri (Corning), 250 ml, 500 ml in 1000 ml.
- Skalpeli (Braun).
- Viale za zamrzovanje celičnih kultur (Simport), 1,8 ml.



- Pincete (Sanolabor).
- Centrifugirke (BD), sterilne, plastične, 15 ml in 50 ml.
- Laboratorijske steklenice (Schott Duran), 250 ml in 500 ml.
- Nastavki za pipeto (Thermo): 250  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l in 5 ml.

### ***Laboratorijska oprema***

- Inkubator za gojenje celičnih kultur z dovodom CO<sub>2</sub> (Sanyo), kjer celice rastejo v nadzorovani atmosferi (5 % CO<sub>2</sub>, 95 % O<sub>2</sub> in 37° C).
- Zaščitna mikrobiološka komora Telstar Bio II Advance za sterilno delo.
- Vodna kopel Precision GP 20 (Thermo Scientific) za segrevanje raztopin in celičnih rastnih medijev, ki jih potrebujemo za delo s celičnimi kulturami, na temperaturo 37° C.
- Avtoklav A-65 V (Kambič) za sterilizacijo plastičnih materialov in nekaterih medijev ter raztopin. Sterilizacijo v avtoklavu izvajamo 20 minut pri tlaku 1,5 bara in temperaturi 121° C.
- Stresalnik za epruvete Vibromix 10 (Tehtnica) za resuspendiranje celičnih sedimentov.
- Centrifuga Centrifuge 5804 (Eppendorf) za koncentriranje celic in vzorcev. Suspenzijo celic po tripsiniziranju navadno pet minut centrifugiramo na 320 x g.
- Hemocitometer (Malassez, Assistant) za štetje celic. Celice, ki jih obarvamo s tripankim modrilom, preštujemo v notranjosti mreže hemocitometra, rezultat pa podamo s številom celic v 1 ml suspenzije.
- Invertni mikroskop Axiovert 40 CFL, Zeiss za opazovanje celic. Mikroskop je povezan s kamero, ki omogoča slikanje posameznih faz poskusa.
- Hladilnik Kirsch za shranjevanje medijev. Medije za gojenje celičnih kultur je potrebno shranjevati v hladilnikih pri temperaturi 4° C.
- Posoda s tekočim dušikom GT38 (Scan) za trajno shranjevanje celičnih kultur pri temperaturi minus 196° C.
- Priprava za zamrzovanje celičnih kultur (Mr. Frosty, Nalgene).
- Zamrzovalnik (Thermo) za shranjevanje reagentov in celičnih kultur pri temperaturi minus 80° C.
- Zamrzovalnik Kirsch za shranjevanje reagentov pri temperaturi minus 20° C.
- Tehtnica CP 423S (Alba).
- Ultravijolična (UV) žarnica za sterilizacijo.

- Filtrirne membrane.
- Pipete (Thermo).

### ***Mediji za gojenje celičnih kultur***

- Medij Advanced DMEM (Thermo Fisher Scientific). Celični medij je osnovna sestavina, ki jo uporabljamo za gojenje celic. Pred uporabo smo mu primešali antibiotika penicilin (100 IE/ml) in streptomycin (0,1 mg/ml) za zaščito celične kulture pred bakterijsko okužbo ter aminokislino L-glutamin (2 mM), ki jo celice potrebujejo za rast.
- Serum govejega zarodka (FBS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA). Dodajamo ga mediju Advanced DMEM v 5 % koncentraciji. Serum je običajen in pomemben dodatek različnim medijem, ki jih uporabljamo za gojenje celičnih kultur. Serum govejega zarodka, kot ga uporabljamo v laboratorijski praksi, pridobivajo iz krvnega seruma nerojenih govejih mladičkov. Je toplotno inaktiviran in vsebuje različne rastne dejavnike, ki so potrebni za normalno delovanje in rast celic v kulturi.
- Trypsin (Sigma) je encim, ki razgrajuje beljakovine. Uporabljamo ga za ločevanje celic od podlage in komponent zunajceličnega matriksa. Pripravljamo ga v 0,25 % koncentraciji z dodatkom 0,5 mM EDTA.

### ***Raztopine in reagenti***

- Fosfatni pufer (PBS) (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija): 1 tableto raztopimo v 200 ml destilirane vode in steriliziramo v avtoklavu. Tako pripravljenemu puftru dodamo še antibiotika penicilin (100 IE/ml) in streptomycin (0,1 mg/ml), uporabljamo pa ga za prenos tkiva v epruvetah iz operacijski sobe do laboratorija.
- 0,1 % tripansko modrilo (Sigma). Barvilo uporabljamo za opazovanje in štetje celic pod mikroskopom. Tripansko modrilo vstopa samo v mrtve celice in jih obarva modro. Žive celice imajo nepoškodovano celično membrano in se zato ne obarvajo.
- L-glutamin (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija). To je neesencialna aminokislina, ki predstavlja pomemben vir energije za celice. Mediju za celične kulture jo dodajamo v koncentraciji 2 mM.
- Penicilin (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija): Antibiotik, ki deluje predvsem na grampozitivne bakterije. Mediju za celične kulture ga dodajamo v koncentraciji 100 IE/ml.

- Streptomycin (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija): Antibiotik, ki deluje proti grampozitivnim in gramnegativnim bakterijam. Mediju za celične kulture ga dodajamo v koncentraciji 0,1 mg/ml.
- Dimetil sulfoksid (DMSO): Dodajamo ga v 5 % do 10 % koncentraciji suspenziji celic v FBS, kadar jih zamrzujemo. DMSO uporabljamo kot krioprotektor pri zamrzovanju celic in tkiv. Navadno dodamo 50 µl DMSO k 950 µl suspenzije celic v FBS.
- Fiksacijska raztopina (Merck Millipore KGaA, Darmstadt, Nemčija). Raztopino uporabljamo za fiksacijo celic pred barvanjem z imunocitokemičnimi metodami.
- Monoklonsko protitelo cGFAP (131-17719) Alexa Fluor 488, poliklonsko protitelo GLAST, poliklonsko protitelo S100B, kozje sekundarno protitelo proti zajčjemu IgG (H+L) Alexa Fluor Plus 555 in kozje sekundarno protitelo proti zajčjemu IgG (H+L) DyLight 488 so bili kupljeni pri Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, ZDA), reagent CytoPainter Phalloidin-iFluor 555 (ab176756) in Fluoroshield Mounting Medium with DAPI (ab104139) sta bila kupljena pri podjetju AbCam (Cambridge, Združeno kraljestvo), fiksacijska raztopina (5x) pa pri podjetju Millipore (Merck, Millipore, Darmstadt, Nemčija).
- 70 % etanol (Sigma): za razkuževanje vseh delovnih površin in materialov.
- Voda Milliq in sterilizirana vodovodna voda.
- Goveji serumski albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija).
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija).

### 3.3.2 Opis vzorca

Vzorec človeškega možganskega tkiva smo v laboratoriju po grobem spiranju s fosfatnim pufrom v sterilnih pogojih in po odstranjevanju neuporabnih delov tkiva, kot je opisano zgoraj, še nadalje sprali s fosfatnim pufrom z dodatkom antibiotikov ter na ta način zmanjšali možnost kontaminacije celične kulture (Slika 21). Tkivo smo v petrijevki narezali na majhne koščke. To je bila groba, primarna mehanična dekompozicija tkiva. Ker je možgansko tkivo mehko, dodatna mehanična razgradnja, kjer ga stisnemo skozi posebne mrežaste filtre, ni bila potrebna. Na ta način bi le povečali število nekrotičnih celic, kar bi se kasneje poznalo na rasti celične kulture. Prav tako zaradi ugodne konsistence tkiva za razgradnjo v tej fazi nismo potrebovali tripsina. Koščkom tkiva smo nato dodali celični medij Advanced DMEM s penicilinom (100 IE/ml) in streptomycinom (0,1 mg/ml). Koščki tkiva so bili ves čas

izolacije potopljeni v tekočino, da bi preprečili njihovo izsušitev. Tako pripravljeno tkivo smo prenesi v centrifugirke. Sledilo je 15-minutno centrifugiranje pri 300 x g (Slika 22). Odstranili smo supernatant, celični sediment pa resuspendirali v mediju za celične kulture Advanced DMEM, ki je vseboval penicilin (100 IU/ml), streptomycin (0,1 mg/ml), L-glutamin (2 mM) in 5 % FBS ter ponovno centrifugirali deset minut pri 300 x g (Slika 23). Ta sediment smo nato še enkrat resuspendirali v 20 ml celičnega medija ter ga nanesti v dve gojilni posodici za celične kulture T25 (Slika 24). Nastalo celično suspenzijo smo inkubirali en mesec v inkubatorju z nadzorovano atmosfero pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>, da so se celice začele pritrjati na podlago gojilnih posodic in se deliti (Slika 25). V takih pogojih smo omogočili prednostno razmnoževanje in preživetje astroglijskih celic, zavirali pa rast ostalih celic, ki bi celično kulturo lahko kontaminirale in jo napravile nečisto. Večji del kontaminirajočih celic, vključno z mikroglijo, smo sicer odstranili že v začetnih fazah poskusa s centrifugiranjem in resuspendiranjem vzorcev, kasneje pa z menjavo celičnega medija ter z nežnim izpiranjem kulture s celičnim medijem in odstranjevanjem ohlapno prilepljenih celic (Slika 26). Med rastjo smo celični medij menjavali dvakrat tedensko, ko smo opazili spremembe v barvi medija (Slika 27). Celični medij smo pred začetkom dela segreli na temperaturo 37 °C (Slika 28). Ko se je oblikovala konfluentna plast ali monosloj ploščatih celic, smo ocenili čistost celičnih kultur (Slika 29). Tako smo dobili kulturo primarnih astrocitov.

**Slika 21: Spiraje fragmentov možganskega tkiva s fosfatnim pufrom. Zaradi boljšega izpiranja si velikokrat pomagamo s stresalnikom**



Vir: Lastna raziskava 2021.

**Slika 22: Centrifuga in centrifugirke s celično suspenzijo pred centrifugiranjem**



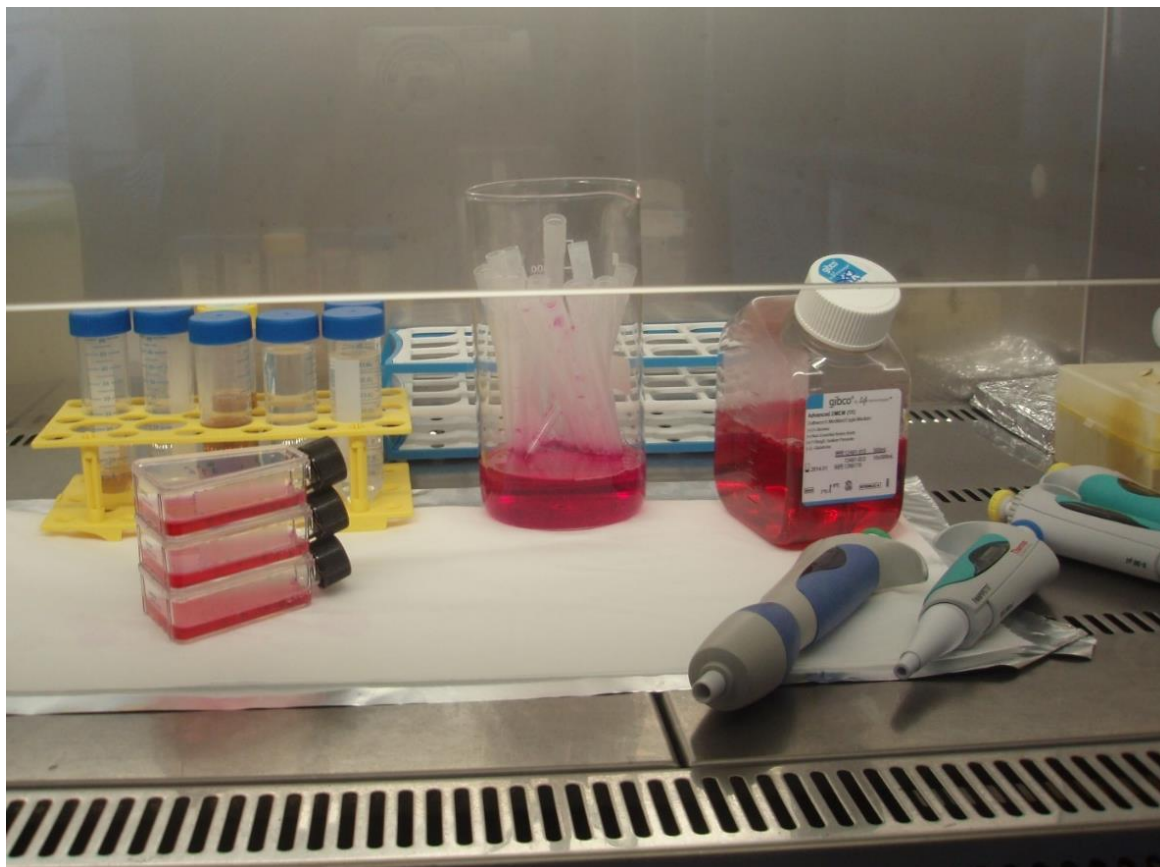
Vir: Lastna raziskava 2021.

**Slika 23: Centrifugirki s celičnim sedimentom, začasno shranjeni v inkubatorju. Celični sediment vsebuje celice, ki jih bomo v naslednjih fazah poskusa spet resuspendirali v celičnem mediju in jih pripravili za gojišče**



Vir: Lastna raziskava 2021.

**Slika 24: Gojilne posodice T25. Celični sediment iz centrifugirk smo resuspendirali v celičnem mediju z dodatki in ga odpipetirali v gojilne posodice. Te so narejene iz posebej obdelane plastike, ki spodbuja pritrnitev celic na podlago, da se lahko oblikuje celična kolonija. Posodice T25 smo shranili v inkubator z nadzorovano atmosfero in temperaturo, kjer so celice rasle naslednje tedne**



Vir: Lastna raziskava 2021.

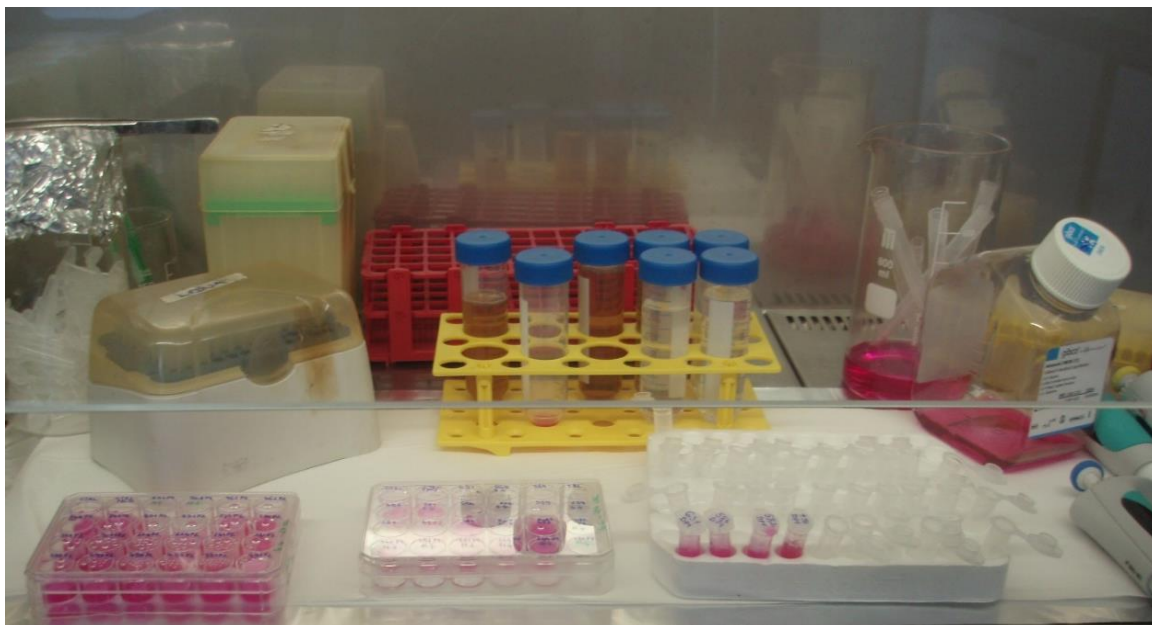
**Slika 25: Inkubator za celične kulture (A) in stekleničke s celičnimi kulturami v inkubatorju (B). Celice rastejo v okolju z nadzorovano atmosfero pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>**



Vir: Lastna raziskava 2021.

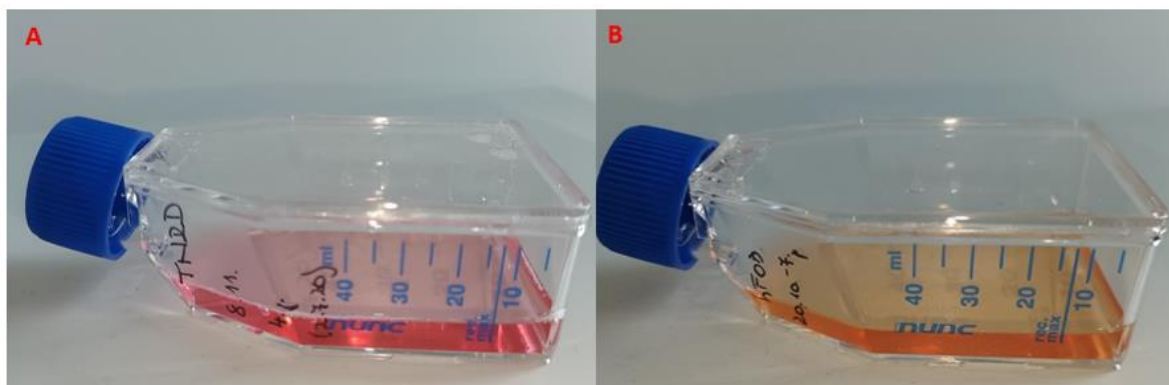


**Slika 26:** Postopki za odstranjevanje kontaminirajočih celic med različnimi fazami poskusa. V komori z laminarnim pretokom zraka so vidne centrifugirke s celičnim sedimentom in različni celični dodatki, material in instrumenti za delo s celičnimi kulturami ter odpadne raztopine, v stojalu spredaj pa resuspendirane celične kulture, ki so pripravljene za nadaljnje gojenje v inkubatorju



Vir: Lastna raziskava 2021.

**Slika 27:** Gojilna posodica T25 s celičnim medijem. Rdeča barva svežega medija z vsemi potrebnimi dodatki za rast celične kulture (A). Celični medij pred menjavo po treh dneh gojenja celic v kulturi. Celice so med rastjo porabile hranilne snovi iz medija, zato se je barva spremenila v rdeče-rjavo (B)



Vir: Lastna raziskava 2021.

**Slika 28: Vodna kopel, ki jo v laboratoriju uporabljamo za segrevanje kemikalij in dodatkov pri delu s celičnimi kulturami, navadno na temperaturo 37 °C, in laboratorijski avtoklav za sterilizacijo laboratorijskega materiala**



Vir: Lastna raziskava 2021.

**Slika 29: Svetlobni invertni mikroskop z nameščeno kamero za opazovanje celičnih kultur med rastjo je nepogrešljiv aparat za delo s celičnimi kulturami. Desno na zaslonu je posnetek primarne celične kulture astrocitov, lepo so vidne stekleničke za gojenje celic**

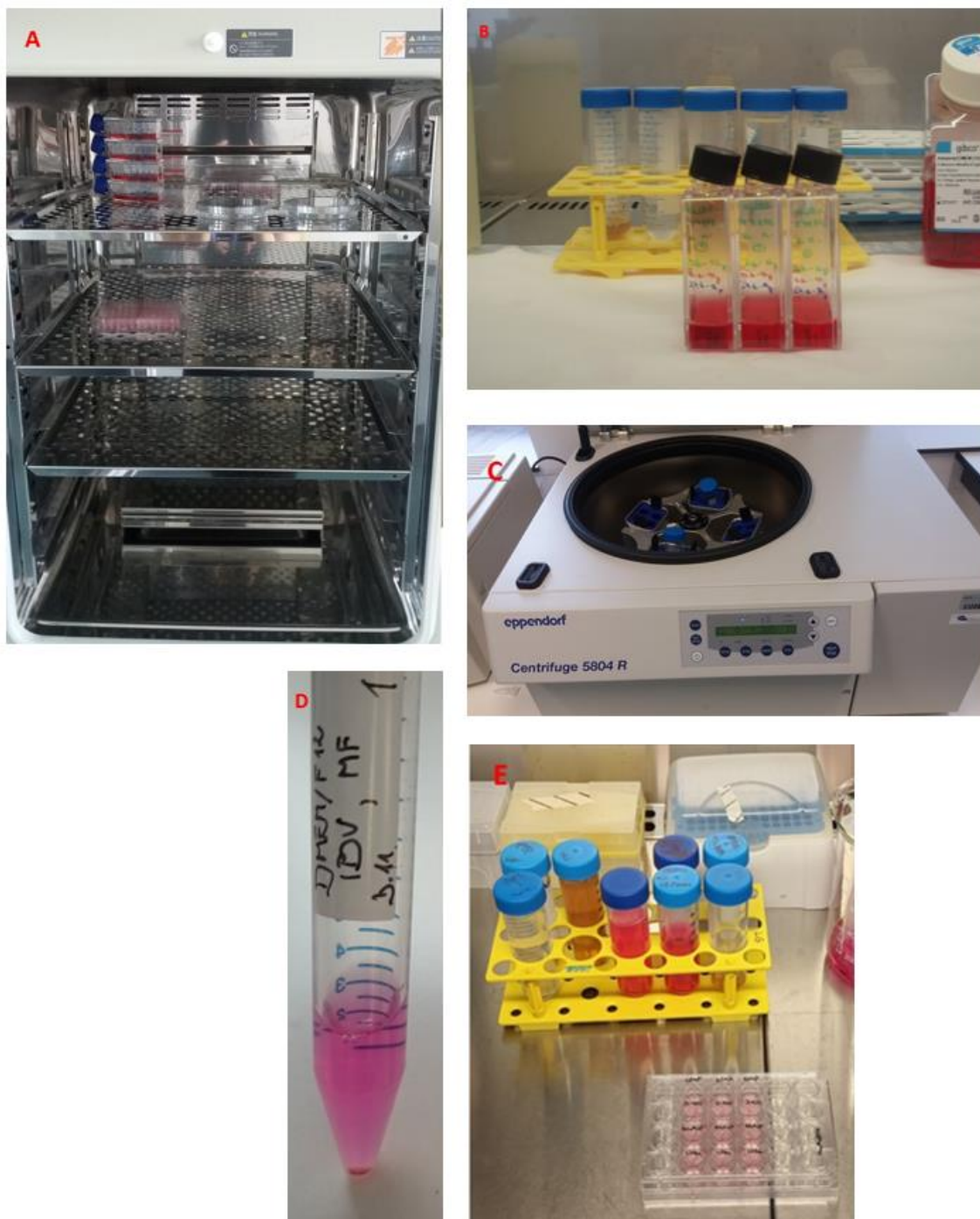


Vir: Lastna raziskava 2021.

## Kultura primarnih astrocitov

Primarne astrocite smo gojili v gojilnih posodicah T25 in jih inkubirali pri 37 °C v nadzorovani atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>. Dvakrat na teden smo celični medij z dodatki zamenjali. Po enem mesecu gojenja je celična kultura postala 100 % konfluentna, kar pomeni, da so celice popolnoma prerasle površine gojilnih posodic v eni plasti. Takrat smo kulturo primarnih astrocitov odlepili od podlage z 0,25 % tripsinom-EDTA. Sledilo je centrifugiranje pri 320 x g za pet minut. Celični sediment smo ponovno resuspendirali v 9 ml svežega medija Advanced DMEM z dodatki in celično suspenzijo ponovno prenesli v gojilne posodice T25 v razmerju 1 : 3, tako da smo vsake 3 ml celične suspenzije dopolnili s 7 ml celičnega medija z dodatki (Slika 30). Tako nasajene celice smo nato zopet inkubirali in spremljali njihovo rast. Na ta način smo dobili celično kulturo prve pasaže.

**Slika 30: Gojenje primarnih astrocitov in inkubacija v nadzorovani atmosferi (A), celična kultura v posodah T25 po precepljanju s svežim medijem Advanced DMEM z dodatki, pripravljena za nadaljnje gojenje (B), centrifugiranje celične suspenzije v različnih fazah gojenja (C), celični sediment z astrociti na dnu centrifugirke (D), ki ga bomo resuspendirali v posodice za nadaljnje gojenje in karakterizacijo (E)**



Vir: Lastna raziskava 2021.

Astrociti prve pasaže so rasli sedem dni in po tem času je kultura postala 95 % konfluentna. Sledila je imunokarakterizacija celic z astrocitnimi označevalci: glialnim fibrilarnim kislim proteinom (GFAP), glutamatnim-aspartatnim transporterjem (GLAST) in proteinom S100B. Morfologijo celic smo določili z barvanjem aktinskega citoskeleta s fluorescenčnim barvilom Phalloidinom. Postopke karakterizacije celic opisujemo v poglavju 3.3.4 *Opis obdelave podatkov*.

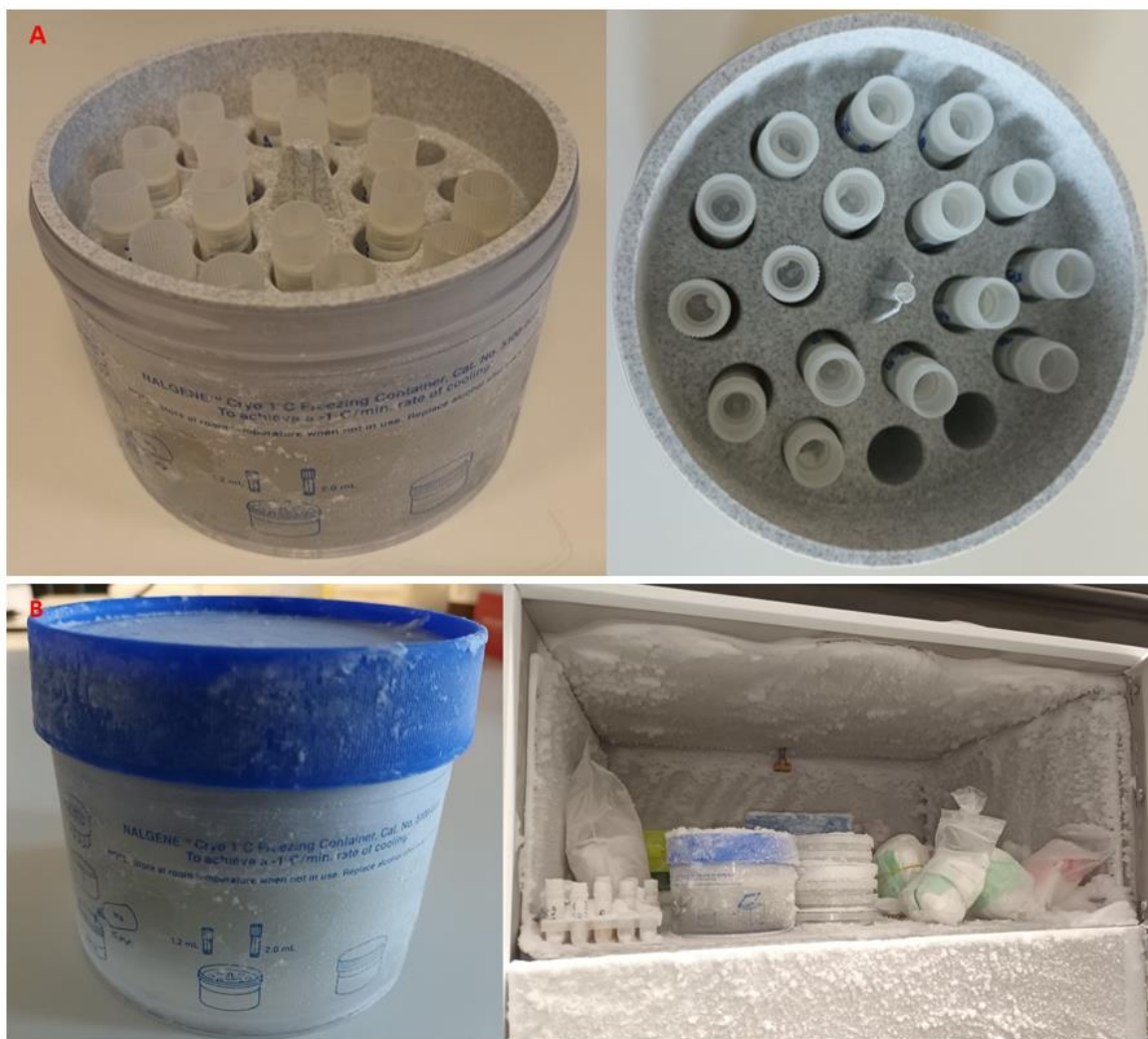
V tej fazi poskusa smo tudi čim več celic zmrznili za kasnejše poskuse. Med gojenjem smo celične kulture vsak dan opazovali pod invertnim mikroskopom in ocenjevali obliko celic in njihove povezave, gostoto rasti, morebitne odmrle celice, ki so prosto plavale v celičnem mediju, ter značilnosti celičnega medija.

Gojenje, precepljanje, zamrzovanje in odtajanje celic

Astrocite prve pasaže smo gojili v posodicah T25 in menjavali celični medij dvakrat tedensko. Ko je celična kultura postala 95 % konfluentna, smo jo razcepili z 0,25 % tripsinom-EDTA v razmerju 1 : 3 in suspenzijo celic centrifugirali pri 320 x g za pet minut. Celični sediment smo nato resuspendirali v 9 ml svežega medija Advanced DMEM z dodatki in takšno suspenzijo prenesli v gojilne posodice T25. Tudi tukaj smo vsakim 3 ml celične suspenzije dodali 7 ml celičnega medija z dodatki. Nasajene celice smo ponovno inkubirali in spremljali njihovo rast.

Za nadaljnje poskuse smo celice shranili v krioviale in jih globoko zamrznili v tekočem dušiku. Tako smo pripravili zadostne zaloge celic za naprej. Ko je bila celična kultura 95 % konfluentna, smo jo najprej precepili, kot je opisano v zgornjih odstavkih. Celični sediment smo nato resuspendirali v 1 ml seruma govejega zarodka s 10 % DMSO. Krioviale smo označili in jih zatesnili ter najprej predhodno zamrznili z napravo za zamrzovanje celičnih kultur (Mr. Frosty, Nalgene) (Slika 31). Najprej smo krioviale čez noč postopoma ohladili v zamrzovalniku pri temperaturi minus 80 °C, nato pa smo jih shranili v pločevinaste posodice s tekočim dušikom pri temperaturi minus 196 °C (Slika 32).

**Slika 31: Za nadaljnje poskuse celice shranimo v krioviale v 1 ml seruma govejega zarodka in 10 % DMSO in prehodno postopoma zamrznemo s pomočjo posebne posodice za zamrzovanje (Mr. Frosty) (A). Nato jih pred trajnim zamrzovanjem v tekočem dušiku v posodicah Mr. Frosty čez noč postopoma ohladimo v zamrzovalniku pri temperaturi minus 80 °C (B)**



Vir: Lastna raziskava 2021.

**Slika 32: Po postopnem ohlajanju kriovial v zamrzovalniku pri temperaturi minus 80 °C, jih lahko trajno hranimo v tekočem dušiku pri temperaturi minus 196 °C. Kontejnerji s tekočim dušikom (A), ki vsebujejo pločevinaste posodice s kriovialami (B)**

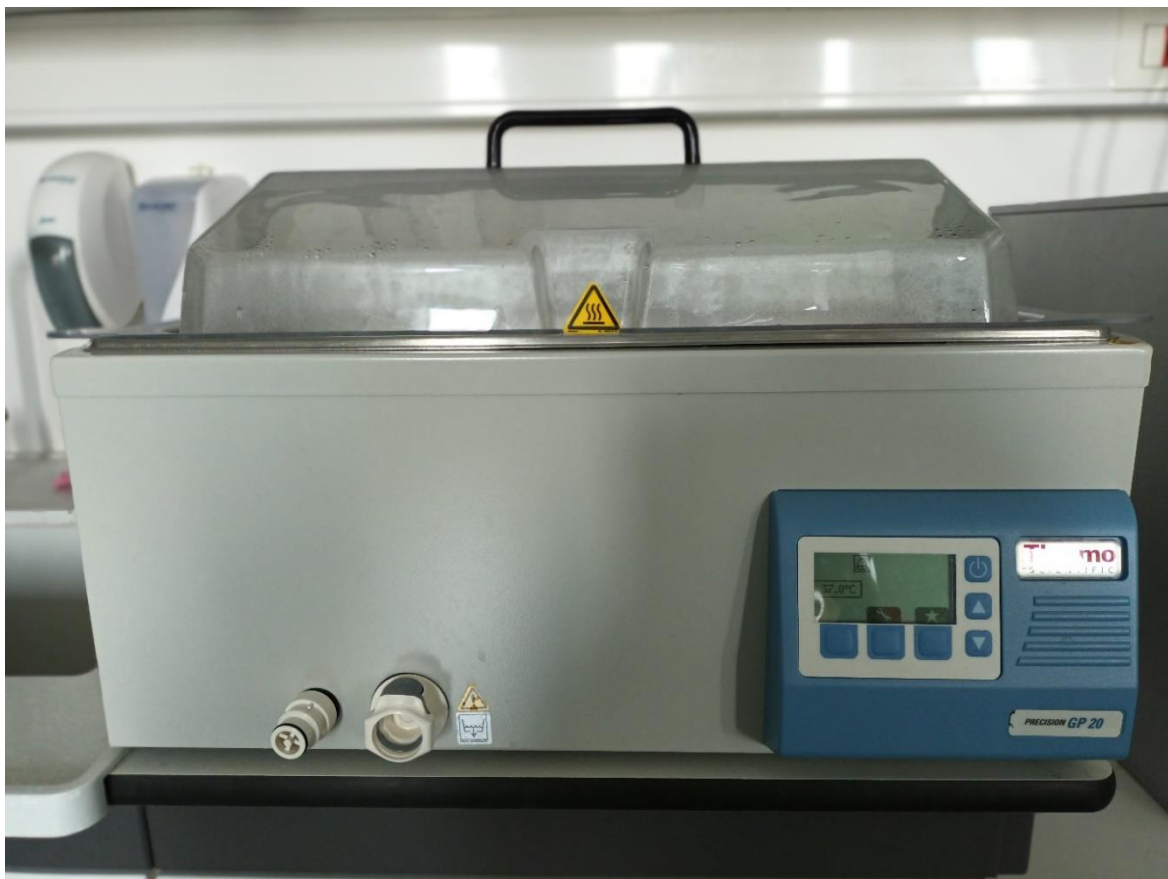


Vir: Lastna raziskava 2021.

Med poskusom s celičnimi kulturami je potrebno vedno preveriti, ali imajo zamrznjene zaloge celic rastni potencial. Zato smo jih med potekom poskusa tudi odtalili. Na ta način smo se želeli prepričati, da so celice, shranjene v celični suspenziji, ki smo jih zamrznili in shranili po opisanem protokolu, še vedno žive. Zato smo preverili viabilnost ali živost celic. Odtajanje kriovial je potekalo v vodni kopeli, segreti na temperaturo 37 °C (Slika 33). Nato smo jih razkužili s 70 % etanolom in jih prenesli v mikrobiološko komoro. Iz krioviale smo celično kulturo previdno prenesli v 15 ml centrifugirke s celičnim medijem, prav tako segretim na temperaturo 37 °C. Sledilo je centrifugiranje celične suspenzije pri 320 x g za pet minut in nato smo celični sediment resuspendirali v 10 ml svežega celičnega medija Advanced DMEM, ki je vseboval penicilin (100 IU/ml), streptomycin (0,1 mg/ml), L-glutamin (2 mM) in 5 % FBS ter ga prenesli v gojilne posodice T25. Hranili smo jih v

inkubatorju pri standardnih pogojih, opisanih zgoraj (Slika 34). Tudi tukaj smo celice med rastjo redno opazovali pod invertnim svetlobnim mikroskopom (Slika 35).

**Slika 33: Postopno odtajanje kriovial z astrociti v vodni kopeli pri temperaturi 37 °C**



Vir: Lastna raziskava 2021.



**Slika 34: Postopki resuspendiranja, centrifugiranja, odstranjevanja supernatanta in ponovnega resuspendiranja celičnega sedimenta astrocitov ter nasaditve celične kulture in gojenja v inkubatorju so podobni kot pri precepljanju celic med gojenjem (A do C)**



Vir: Lastna raziskava 2021.

**Slika 35: Opazovanje živosti celične kulture astrocitov med rastjo po odtajanju na invertnem mikroskopu**



Vir: Lastna raziskava 2021.

### 3.3.3 Opis obdelave podatkov

#### Karakterizacija astrocitne celične kulture

Celično kulturo smo karakterizirali na specifične celične označevalce, kar je zadnja stopnja izolacije celic. S karakterizacijskimi postopki smo določili prisotnost celičnih označevalcev, značilnih za astrocite. S tem smo želeli potrditi prisotnost teh označevalcev na celični kulturi in s tem dokazati, da so izolirane celice res astrociti (Sika 36).

**Slika 36: Zadnja stopnja izolacije celic je karakterizacija celične kulture na specifične celične označevalce. Na sliki so vidne petrijevke z objektnimi stekelci, kjer so trajni preparati izoliranih celic, karakteriziranih s specifični protitelesi**



Vir: Lastna raziskava 2021.

Karakterizacijo smo izvedli z imunocitokemičnimi metodami in tako smo lahko celično kulturo opredelili glede prisotnosti specifičnih astrocitnih označevalcev: GFAP, GLAST in S100B. Za določanje morfologije izoliranih celic smo uporabili imunocitokemično barvanje aktinskega citoskeleta (Slika 37).

**Slika 37: Shramba z različnimi kemikalijami, ki jih potrebujemo pri delu s celičnimi kulturami**

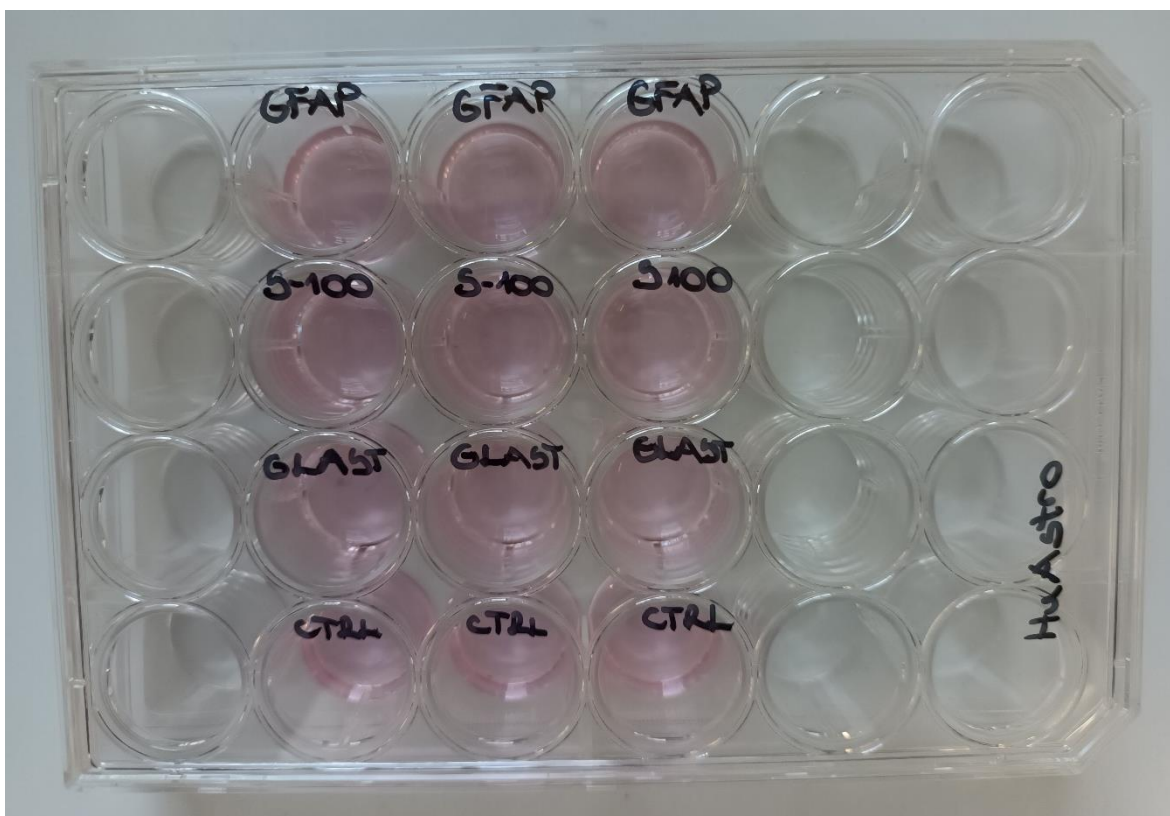


Vir: Lastna raziskava 2021.

Celice smo nasadili na mikrotitrne ploščice s 24 vodnjaki (P24) in jih pokrili z 12-milimetrskimi okroglimi krovnimi stekli. Začetna gostota nasaditve je bila 50000 celic na vodnjak. Po 24 urah inkubacije v kontrolirani atmosferi pri temperaturi 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> smo celični medij odstranili in celični monosloj v vsakem vodnjaku na kratko sprali s

fosfatnim pufrom. Celice smo 15 minut fiksirali s fiksacijsko raztopino (Merck Millipore) pri sobni temperaturi in jih nato trikrat sprali z ledeno hladnim fosfatnim pufrom. Poskus je potekal v triplikatih (Slika 38).

**Slika 38: Celice na mikrotitrskih ploščicah s 24 vodnjaki (P24), ki so pripravljene za zaključne faze karakterizacije**



Vir: Lastna raziskava 2021.

#### Določanje GFAP

Prisotnost GFAP smo določili z monoklonskim protitelesom GFAP Alexa Fluor 488 1:100 v fosfatnem pufri z 1 % govejim serumskim albuminom in 0,1 % Tween 20. Celice smo 30 minut inkubirali z blokirno raztopino (fosfatni pufer + 1 % goveji serumski albumin + 0,1 % Tween 20). Po nočni inkubaciji z razredčenimi protitelesi pri 4 °C smo celice trikrat oprali s fosfatnim pufrom in jim dodali dve kapljici posebnega medija, ki ohrani signal med mikroskopiranjem (ang. *mounting medium*). Slike smo posneli pri 10-kratni povečavi s fluorescenčnim mikroskopom EVOS FL (Ex/Em = 488/519 nm).

## Določanje GLAST in S100B

Prisotnost drugih dveh ključnih označevalnih celičnih beljakovin, GLAST in S100B, smo določili s poliklonskimi protitelesi:

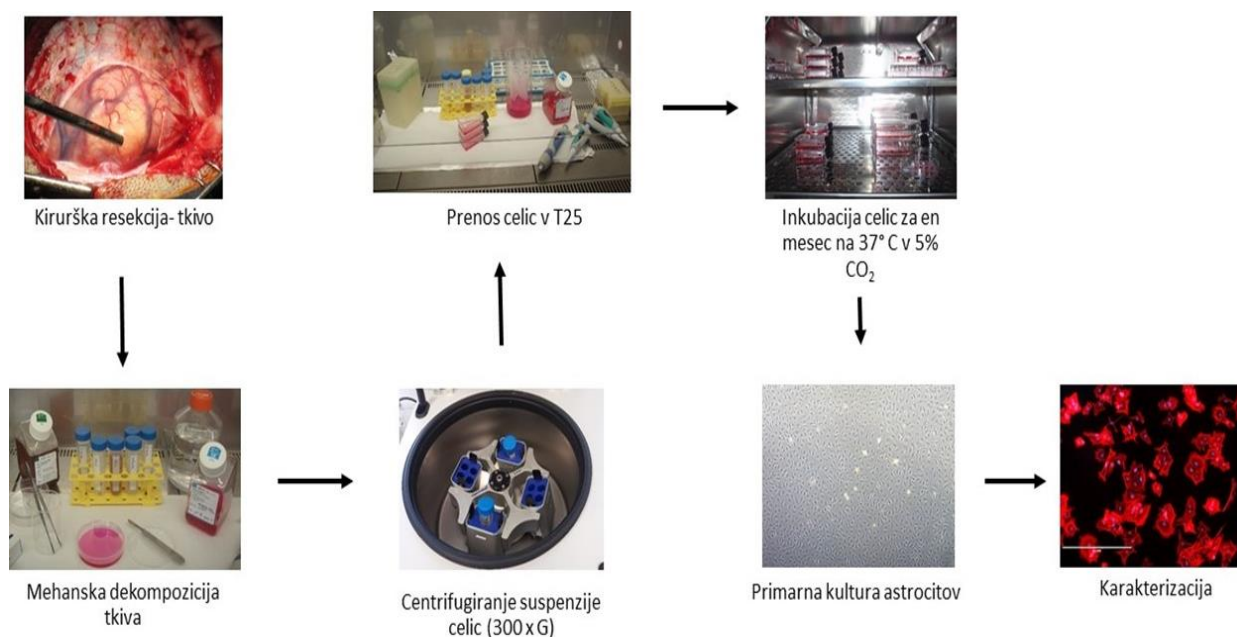
- GLAST s poliklonskim protitelesom GLAST 1:200 v PBS z 1 % govejim serumskim albuminom in 0,1 % Tween 20,
- beljakovino S100B pa s poliklonskim protitelesom S100B 1:50 v fosfatnem pufru z 1 % govejim serumskim albuminom in 0,1 % Tween 20.

Celice smo naprej 30 minut inkubirali z blokirno raztopino. Po nočni inkubaciji v razredčenih protitelesih pri 4 °C smo celice trikrat sprali s fosfatnim pufrom. Nato smo dodali dve sekundarni protitelesi: kozje protitelo proti zajčjemu IgG (H+L) Alexa Fluor Plus 555 1:200 v fosfatnem pufru z 1 % govejim serumskim albuminom za vizualizacijo GLAST in kozje protitelo proti zajčjemu IgG (H+L) DyLight 488 1:100 v fosfatnem pufru z 1 % govejim serumskim albuminom za vizualizacijo S100B. Celice smo z razredčenimi sekundarnimi protitelesi v temi eno uro inkubirali pri sobni temperaturi in jih nato trikrat sprali s fosfatnim pufrom. Dodali smo dve kapljici medija, ki ohrani signal med mikroskopiranjem. Slike smo posneli pri 10-kratni povečavi s fluorescenčnim mikroskopom EVOS FL (GLAST in S100B, Ex/Em = 553/568 nm oziroma Ex/Em = 493/518 nm).

Za barvanje aktinskega citoskeleta smo celice obarvali z reagentom CytoPainter Phalloidin-iFluor 555 v razmerju 1:1000 v fosfatnem pufru z 1 % govejim serumskim albuminom. Po 90 minutah inkubacije v temi pri sobni temperaturi smo celice trikrat sprali s fosfatnim pufrom in jim dodali dve kapljici medija, ki ohrani signal med mikroskopiranjem. Slike smo posneli pri 10-kratni povečavi s fluorescenčnim mikroskopom EVOS FL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA) (Ex/Em = 556/574 nm).

Celoten povzetek metode izolacije astrocitov je prikazan na Sliki 39.

**Slika 39: Shematski prikaz izolacijskega postopka odraslih humanih astrocitov**



Vir: Lastna raziskava 2021.

### 3.4 Rezultati

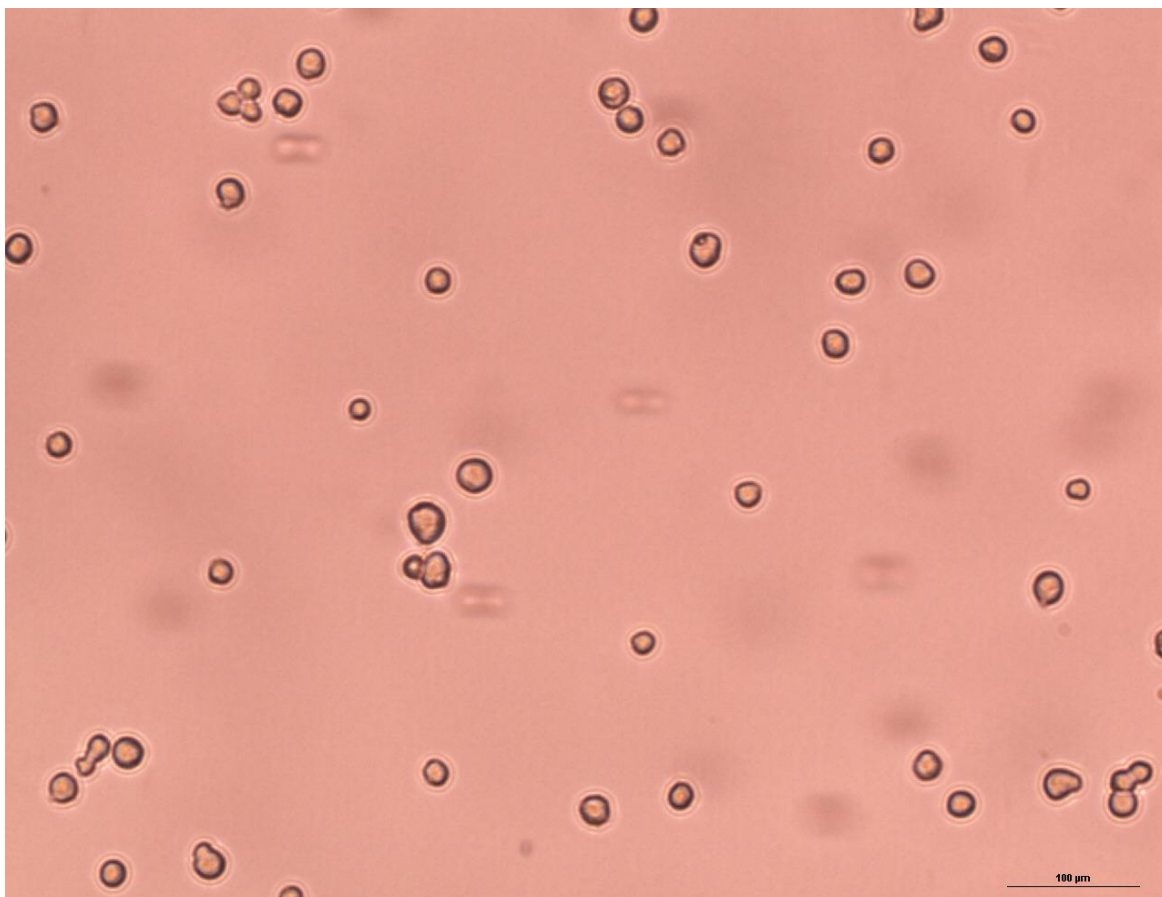
Predstavljamo rezultate izolacije in karakterizacije odraslih človeških astrocitov (MFUM-Astro-1).

#### 3.4.1 Rezultati izolacije celic MFUM-Astro-1.

Kultura celice MFUM-Astro-1 je bila sestavljena iz hitro rastočih celic, ki so bile izolirane iz možganskega tkiva odraslega darovalca. Po sekvenčnem centrifugiranju smo pri postopku izolacije astrocitov odvzeli supernatant s celično suspenzijo in jo resuspendirali v stekleničke za gojenje celic. V celični suspenziji so bile prisotne različne vrste celic in v začetni fazi nasaditve so bile vse okrogle oblike (Slika 40). Postopoma so se po nekaj urah celice začele pritrditi na podlago stekleničk za gojenje in takrat se je njihova oblika začela spreminjati, tako da so začele dobivati svojo značilno obliko (Slika 41). Celice mikroglije so bile majhne in okrogle, oligodendrociti so bili ploščate oblike, astrociti pa bolj vretenasti. Tako smo dobili primarno celično kulturo možganskih celic. Primarna kultura astrocitov je bila po enem mesecu 100 % konfluentna. Celice so bile nato razcepljene v razmerju 1 : 3 in

po sedmih dneh smo dobili 95-odstotno konfluentno kulturo prve pasaže. Celice smo dalje subkultivirali do pete pasaže (Slike 42 do 44).

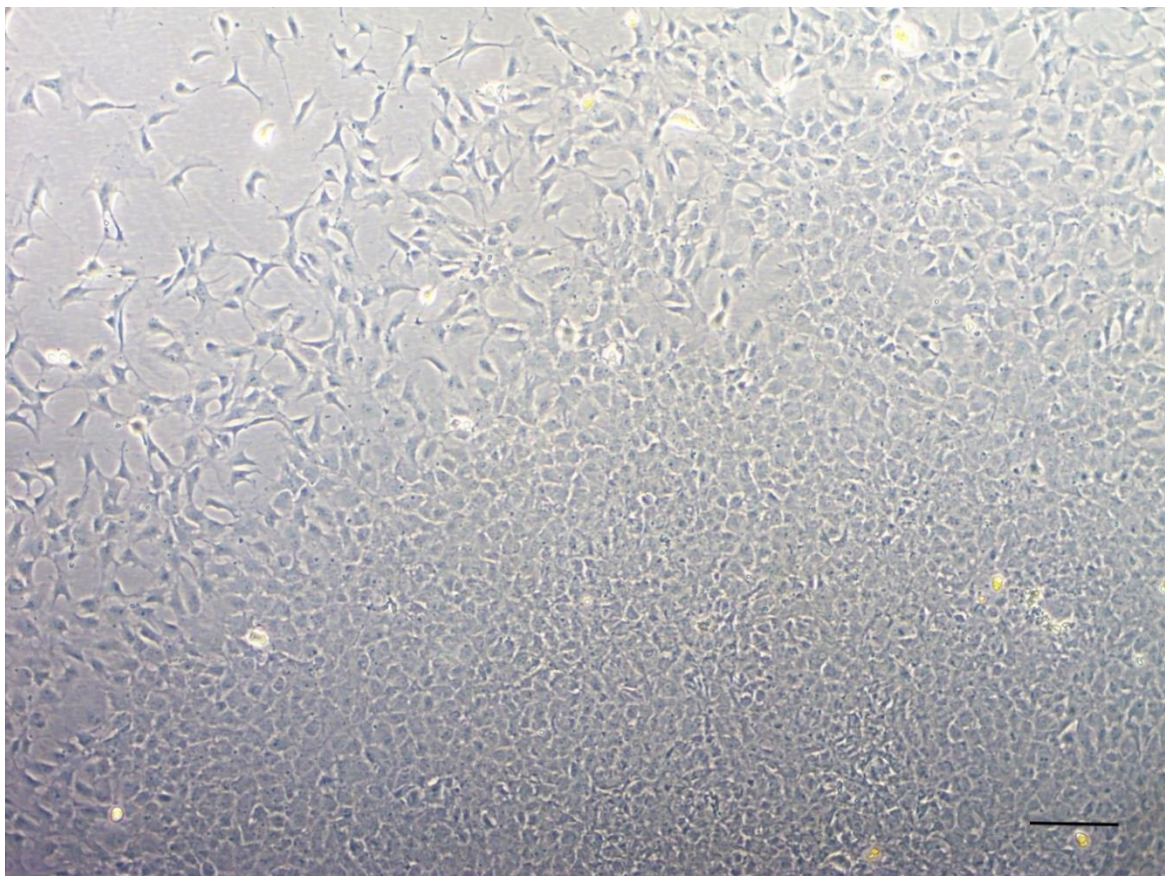
**Slika 40: Celice MFUM-Astro-1 takoj po nasaditvi v gojilne posodice. V celični suspenziji plavajo okrogle celice, ki se bodo čez nekaj ur začele pritrjati in spreminjati obliko. Slike so bile posnete pri povečavi 40x na invertnem mikroskopu Nikon Diaphot 300. Merilo: 100  $\mu\text{m}$**



Vir: Lastna raziskava 2021.

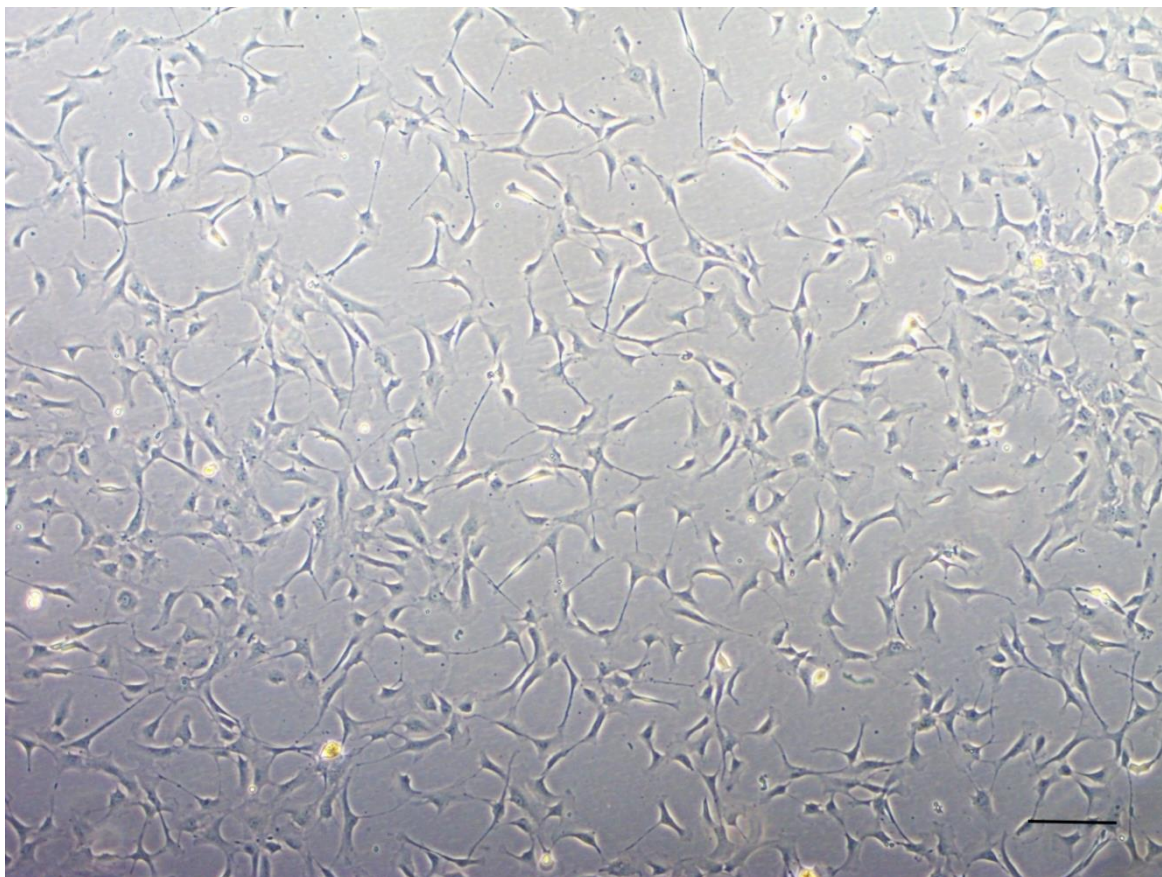


**Slika 41: Primarna kultura odraslih človeških astrocitov. Spodnji desni del slike prikazuje primarne astrocite v kulturi z visoko gostoto. V zgornjem levem kotu je vidna celična kultura z nizko gostoto s posameznimi astrociti poligonalne oblike. Slike so bile posnete pri povečavi 50x na invertnem mikroskopu Zeiss Axiovert 40. Merilo: 200  $\mu\text{m}$**



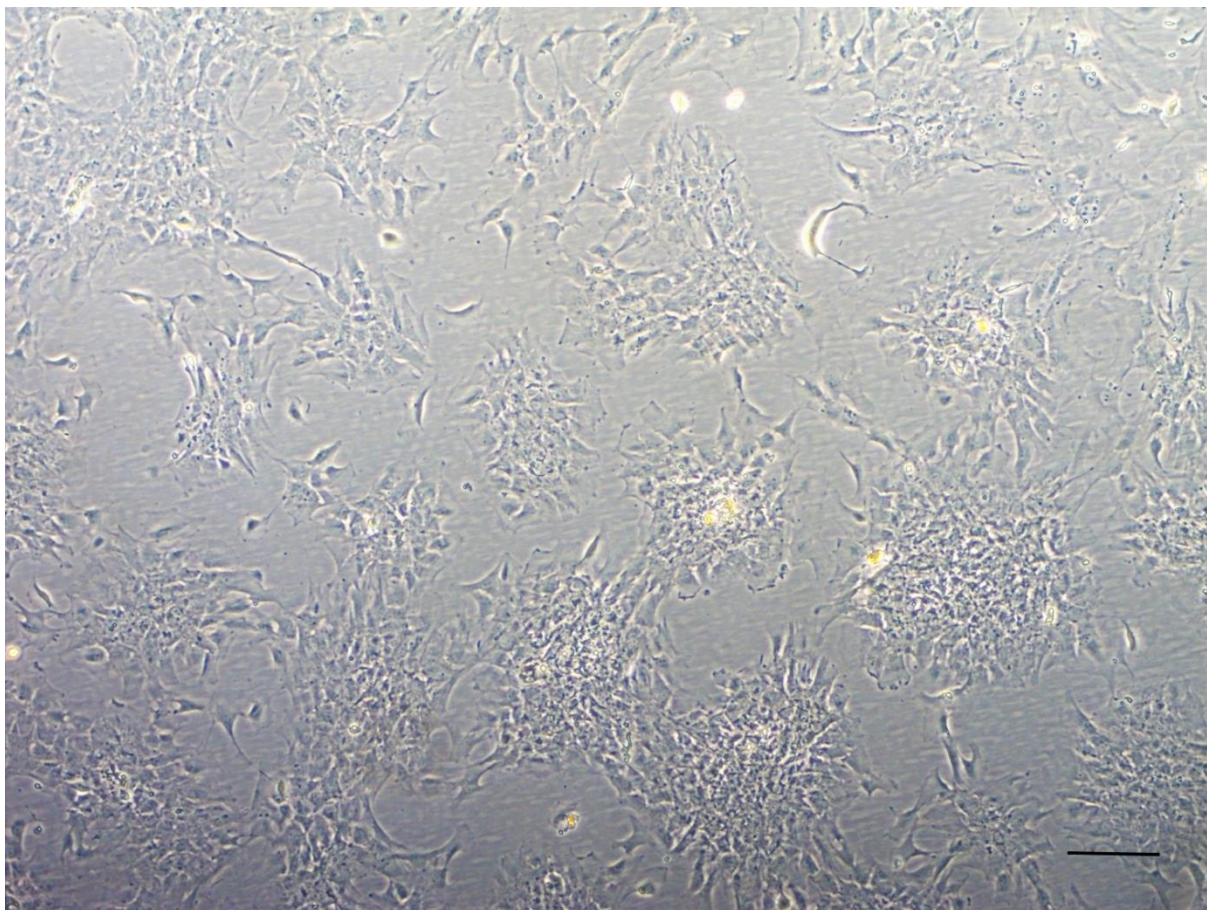
Vir: Lastna raziskava 2021.

**Slika 42: Celice MFUM-Astro-1 dva tedna po izolaciji. Celice intenzivno rastejo po površini gojilne posodice in že začenjajo oblikovati medcelične stike. Posnetki so bili narejeni na invertnem mikroskopu Zeiss Axiovert 40 pri povečavi 50x. Merilo: 200  $\mu$ m**



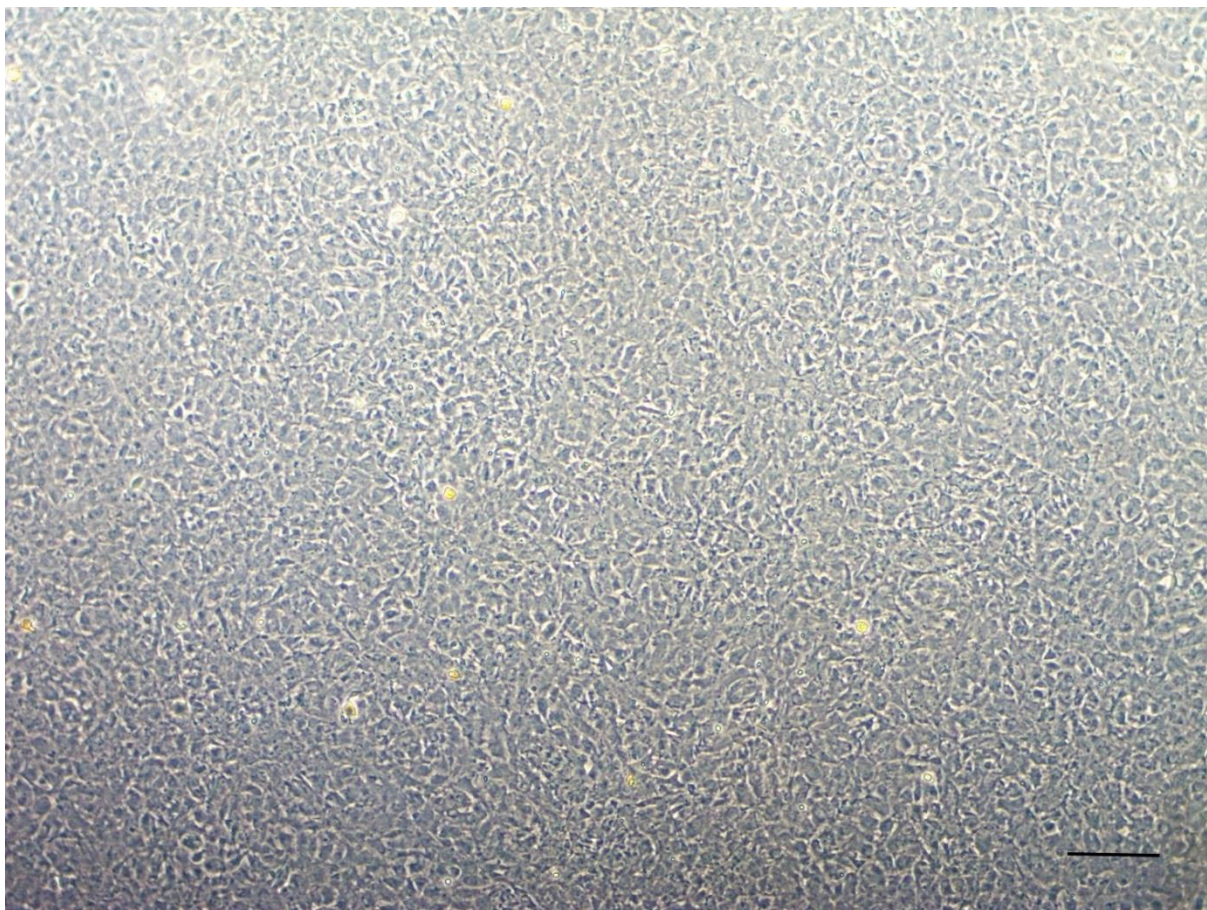
Vir: Lastna raziskava 2021.

**Slika 43: Tri tedne po izolaciji gostota celične kulture narašča. Celice rastejo v obliki majhnih otočkov in se med seboj povezujejo. Slike so bile posnete pri povečavi 50x na invertnem mikroskopu Zeiss Axiovert 40. Merilo: 200  $\mu\text{m}$**



Vir: Lastna raziskava 2021.

**Slika 44:** En mesec po izolaciji astrociti popolnoma prerastejo površino gojilnih posodic in oblikujejo močne medcelične povezave (100-odstotna konfluenca). Celce rastejo le v eni plasti in se ne kopijo v skupke ali večplastne formacije, kar je sicer značilnost transformiranih celic. Slike so bile posnete pri povečavi 50x na invertnem mikroskopu Zeiss Axiovert 40. Merilo: 200  $\mu\text{m}$

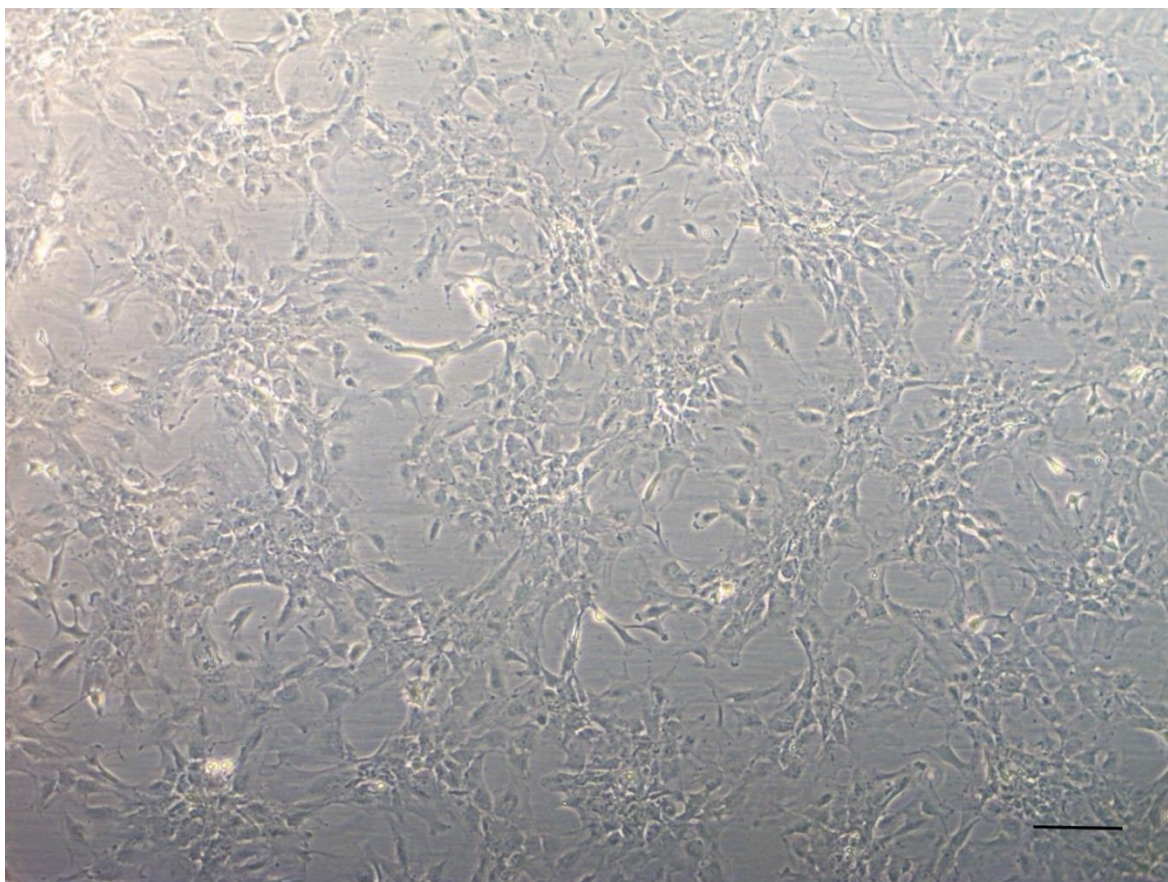


Vir: Lastna raziskava 2021.

V naslednjih fazah smo v postopku kloniranja, ko smo celice primarne kulture v stekleničke za gojenje nasejali zelo na redko, dobili sekundarno kulturo astrocitov. Med tem procesom smo na ta način posamezne eritrocite odstranili s spiranjem s celičnim medijem, med postopkom rasti in precepljanja celične kulture pa smo prav tako odstranili celice mikroglije in oligodendrocite. Slednji so zaradi nizke koncentracije in prevladujoče rasti astrocitov postopoma izginili iz celične kulture. Astocite smo nato še nadalje gojili in precepljali, s tem pa smo jih rafinirali in prečistili, tako da je nastala homogena astrocitna kultura. Del teh celic smo shranili v tekočem dušiku. Ko smo jih odmrznili in jih ponovno nasejali, je bilo njihovo

preživetje 95-odstotno. S tem smo potrdili, da je celična kultura viabilna in torej uporabna tudi po zamrznitvi in odtajanju (Slika 45).

**Slika 45: Odrasli človeški astrociti MFUM-Astro-1 v prvi fazi po odmrznitvi. Kultura je 50 % konfluentna in vitalnost je ocenjena na 95 %. Slike so bile posnete pri povečavi 50x na invertnem mikroskopu Zeiss Axiovert 40. Merilo: 200  $\mu$ m**

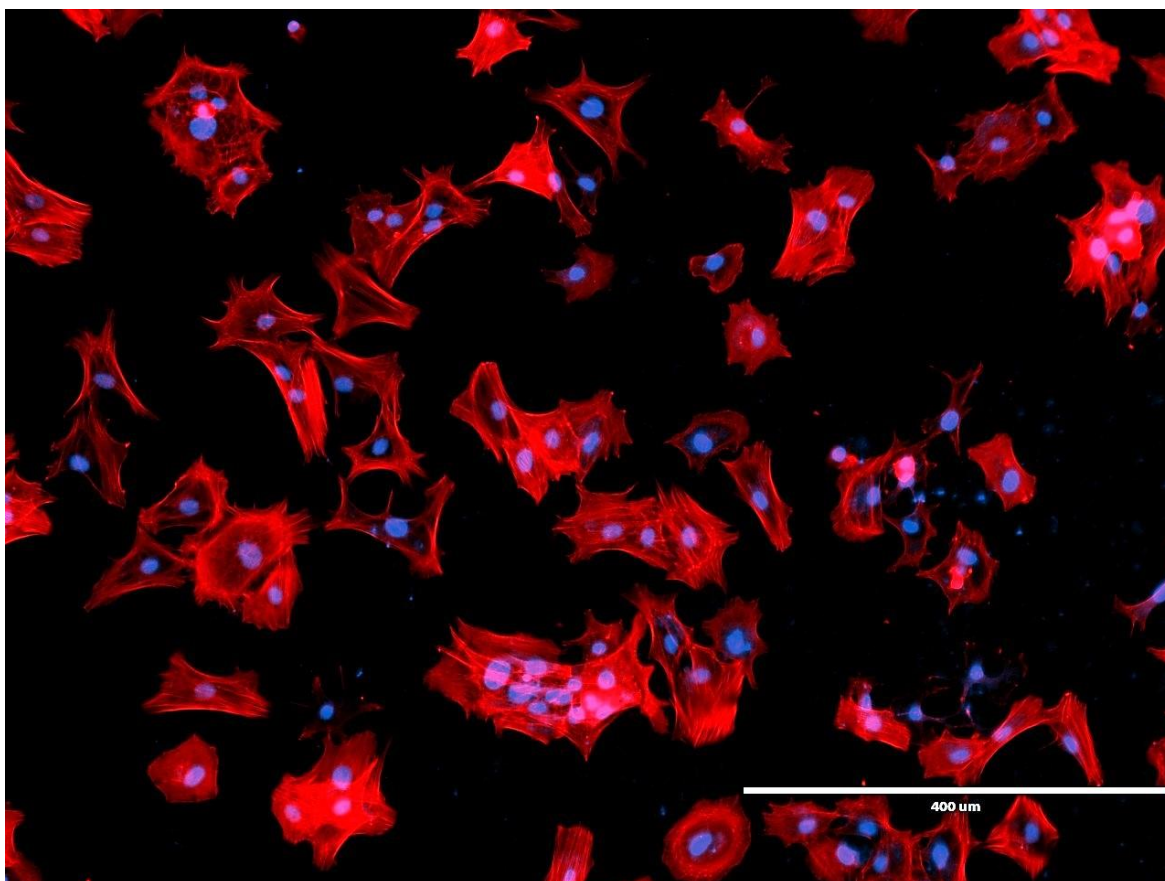


Vir: Lastna raziskava 2021.

Pregled morfoloških lastnosti celic z barvanjem s fluorescenčnim barvilom faloidinom je pokazal značilen videz izoliranih astrocitov. Značilna oblika jedra je bila poligonalna do okrogla in trikotna z redko nukeloplazmo in večinoma z dobro vidnimi nukleoli (Slika 46). Preden so se celice pritrdele na podlago, so plavale v suspenziji in so bile okrogle oblike. Oblika celic se je med postopkom pritrjevanja in rasti spreminjala od okrogle ali ovalne do poligonalne, kar je bilo značilno za rast celic v konfluentni kulturi. Nekatere celce so imele značilne celične podaljške ali psevdopodije, ki so kasneje med rastjo v visoki konfluenci izginili. Po šestih do desetih urah se je približno polovica celic že pritrčila na podlago posodic za gojenje. Po 24 urah je bila večina celic pritrjena na podlago in takrat so bile vidne

spremembe oblike iz okrogle v poligonalno, kar je bilo bolj značilno za visoko gostoto rasti v konfluentni kulturi, kar smo opazili navadno tik pred precepljanjem.

**Slika 46: Imunocitokemična karakterizacija odraslih človeških astrocitov MFUM-Astro-1 v prvi fazi. Morfologija celic je bila prikazana z uporabo oranžnega fluorescenčnega konjugata Phalloidina, ki se selektivno veže na aktinske filamente (rdeče). V kulturah z nizko gostoto imajo odrasli astrociti poligonalno obliko z aktinskimi filamentami, prikazanimi ob celični membrani. Jedro je obarvano z DAPI (modro). Značilna oblika jedra je bila poligonalna do okrogla ali ponekod trikotna, z redko nukeloplazmo in z dobro vidnimi nukleoli. Slike so bile posnete pri povečavi 10x na fluorescenčnem mikroskopu EVOS FL. Merilo: 400  $\mu\text{m}$**

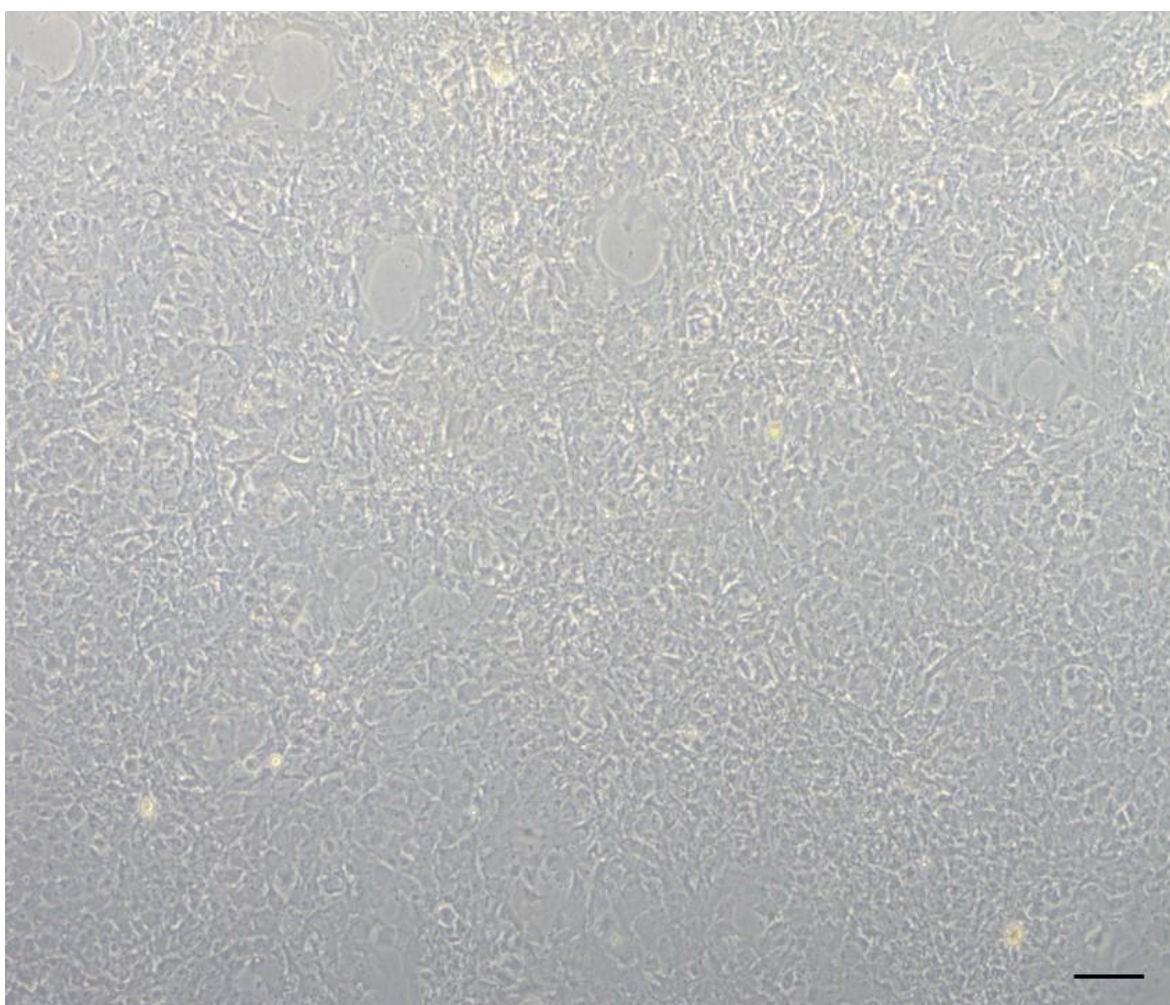


Vir: Lastna raziskava 2021.

Celice so dobro rasle in jih je bilo med rastjo relativno enostavno vzdrževati v kulturi. Zaradi poligonalne oblike celic je ta na nekaterih predelih imela videz kamnitega tlaka z jasnimi celičnimi mejami, kar je značilnost astrocitnih celic, ki rastejo v kulturi. To je bilo najbolj opazno pri visokih konfluencah. Povprečni čas do nastanka konfluentne kulture je bil en

meseč. Nato se je rast ustavila zaradi kontaktne inhibicije, kar pomeni, da so celice prerasle posodice v eni plasti in se niso kopičile v več plasteh ali v kupolah. To je značilno za primarne epiteljske celice, pri rakastih celicah pa tega ne opazimo (Slika 47).

**Slika 47: Polno konfluentna celična kultura astrocitov MFUM-Astro-1 pred precepljanjem. Celce imajo zaradi poligonalne oblike celic na nekaterih predelih videz kamnitega tlaka z jasnimi celičnimi mejami, kar je značilnost astrocitnih celic, ki rastejo v celični kulturi. Te značilnosti so najbolj opazne pri visokih konfluencah. Slike so bile posnete pri povečavi 50x na invertnem mikroskopu Zeiss Axiovert 40. Merilo: 200  $\mu\text{m}$**



Vir: Lastna raziskava 2021.

Celice MFUM-Astro-1 so dobro rasle in znakov okužbe z glivami in bakterijami nismo opazili. S precepljanjem smo naredili tudi zaloge celičnih kultur za nadaljnje poskuse, za

namen postopkov karakterizacije in tudi shranjevanja za kasnejše teste. Celice smo shranili tako, da smo jih zamrznili v tekočem dušiku. Ko smo jih odtalili in ponovno zasejali na gojišča, je bilo njihova sposobnost preživetja 95-odstotna in tudi rast v kulturi je bila dobra.

Med gojenjem celic MFUM-Astro-1 in med njihovo rastjo je bilo ves čas potrebno spremljati barvo in motnost celičnega medija. Ob nasaditvi celic, ko smo dodali svež celični medij, je bil ta zaradi indikatorja fenol rdeče, ki je bil dodan celičnemu mediju, obarvan rdečkasto (Slika 27). Barva medija se spreminja v odvisnosti od pH, ta pa je odvisen od tega, koliko sestavin celice iz medija porabijo za svojo rast. Medij je pri pH 7, torej pri nevtralni vrednosti, rdeče barve. Kadar medij postane bazičen, se njegova barva spremeni v roza barvo, pri nizkem pH, torej v kislem, pa se medij obarva v rumeno ali rjavo. Med rastjo v kulturi celice iz medija porabljajo hranila in vanj izločajo svoje produkte, kot so hormoni in rastni faktorji, ter odpadne snovi, ki na stajajo pri presnovi. Takrat se pH medija začne nižati in zato se po nekaj dneh začne spreminjati tudi njegova barva iz rdečkaste v rjavkasto. To je znak, da so celice iz medija izčrpale vse hranilne snovi in da je zato potrebno medij zamenjati ali pa celično kulturo precepiti, če so celice že prerasle vso površino gojilne posodice.

Celice MFUM-Astro-1 so se na površino gojilnih posodic dobro pritrjale. Čas, potreben za odlepljanje celic s tripsinom, je znašal od štiri do pet minut. Potrebno je bilo tudi rahlo stresanje gojilnih posodic, da so se lahko močno pritrjene celice enakomerno in v celoti odlepili od podlage. Med tripsinizacijo so celice izgubile svojo značilno poligonalno obliko in so postajale vse bolj ovalne in okrogle. Ko so se odlepili od površine, so bili v suspenziji opazni majhni skupki celic in posamezne celice okrogle oblike. Tako odlepljene celice smo nato precepili v nove gojilne posodice in s tem zagotovili zadostno zalogo celice za nadaljnje poskuse. Celično suspenzijo pa smo tudi zamrznili in shranili v tekočem dušiku. Na ta način smo zagotovili zadostno dolgoročno zalogo celic in jih tako shranili za daljši čas. Živost shranjenih celičnih kultur smo preverili tako, da smo nekaj vialic po protokolu odtalili in celice ponovno nasadili v gojilne posodice. Tako ponovno nasajeno kulturo astrocitov so sestavljale hitro rastoče celice, ki so prav tako postale konfluentne po enem mesecu rasti. S tem smo potrdili, da kultura astrocitov MFUM-Astro-1 ohrani živost na dolgi rok in da je taka celična kultura uporabna, saj ima ohranjeno sposobnost preživetja. V našem poskusu smo ugotovili, da znaša 95 %.



Opisani protokol je bil natančno ponovljen za možgansko tkivo vsakega darovalca. To pomeni, da smo postopek izolacije ponovili petkrat. Štirje darovalci možganskega tkiva so bili pacienti po poškodbi možganov, kjer je bila potrebna nevrokirurška operacija, pri enem darovalcu pa je bilo možgansko tkivo odvzeto med operacijo nerupturirane možganske anevrizme. Rezultat izolacije astrocitov iz možganskega tkiva vseh darovalcev je pripeljal do viabline in dobro rastoče celične kulture.

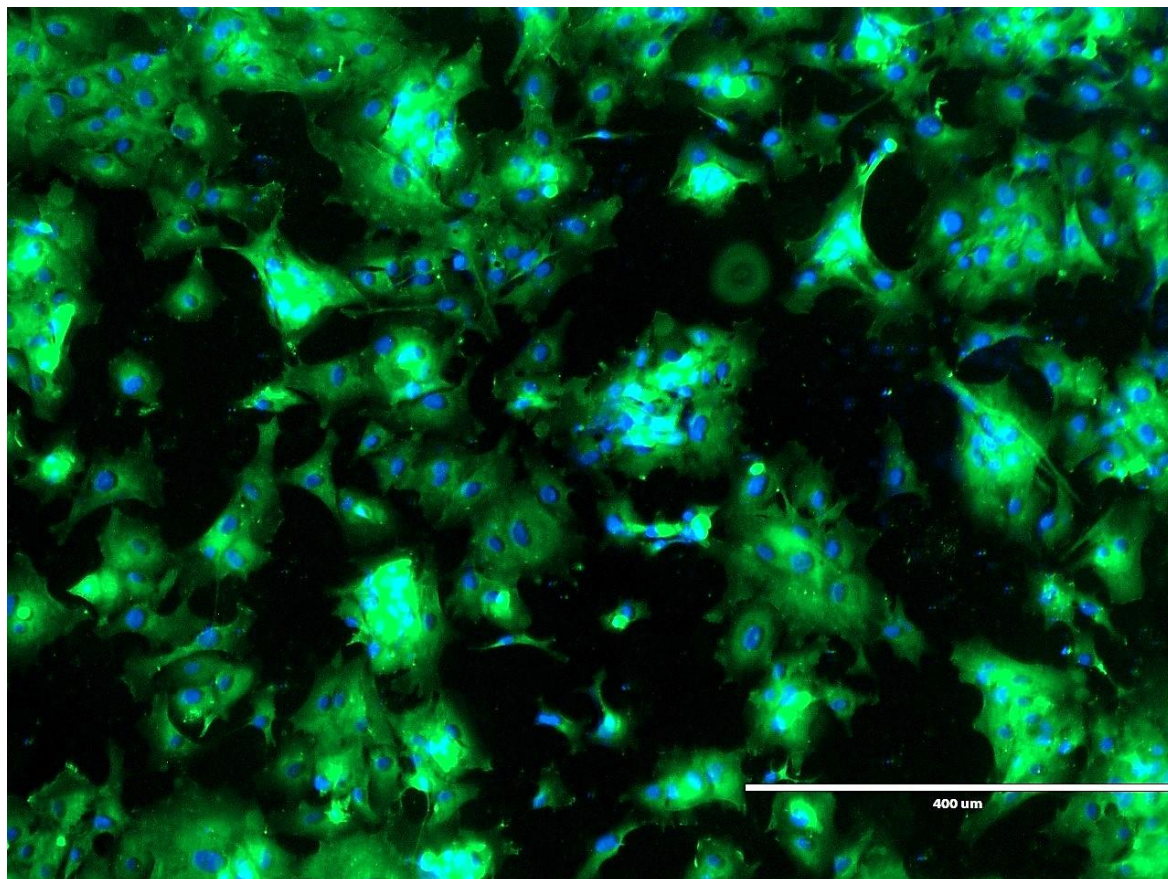
#### 3.4.2 Rezultati karakterizacije celic MFUM-Astro-1

S postopki karakterizacije celic smo na osnovi celičnih označevalcev lahko dokončno potrdili, da so iz vzorcev možganov odraslih darovalcev izolirane celice res odrasli astrociti. Celice smo zato opredelili z imunocitokemičnim barvanjem. S karakterizacijo smo v celični kulturi iskali prisotnost sledečih celičnih označevalcev, ki so značilni za astrocite in zato nujni za njihovo potrditev:

- glialni fibrilarni kisli protein (GFAP),
- glutamatni aspartatni transporter (GLAST) in
- protein S100B.

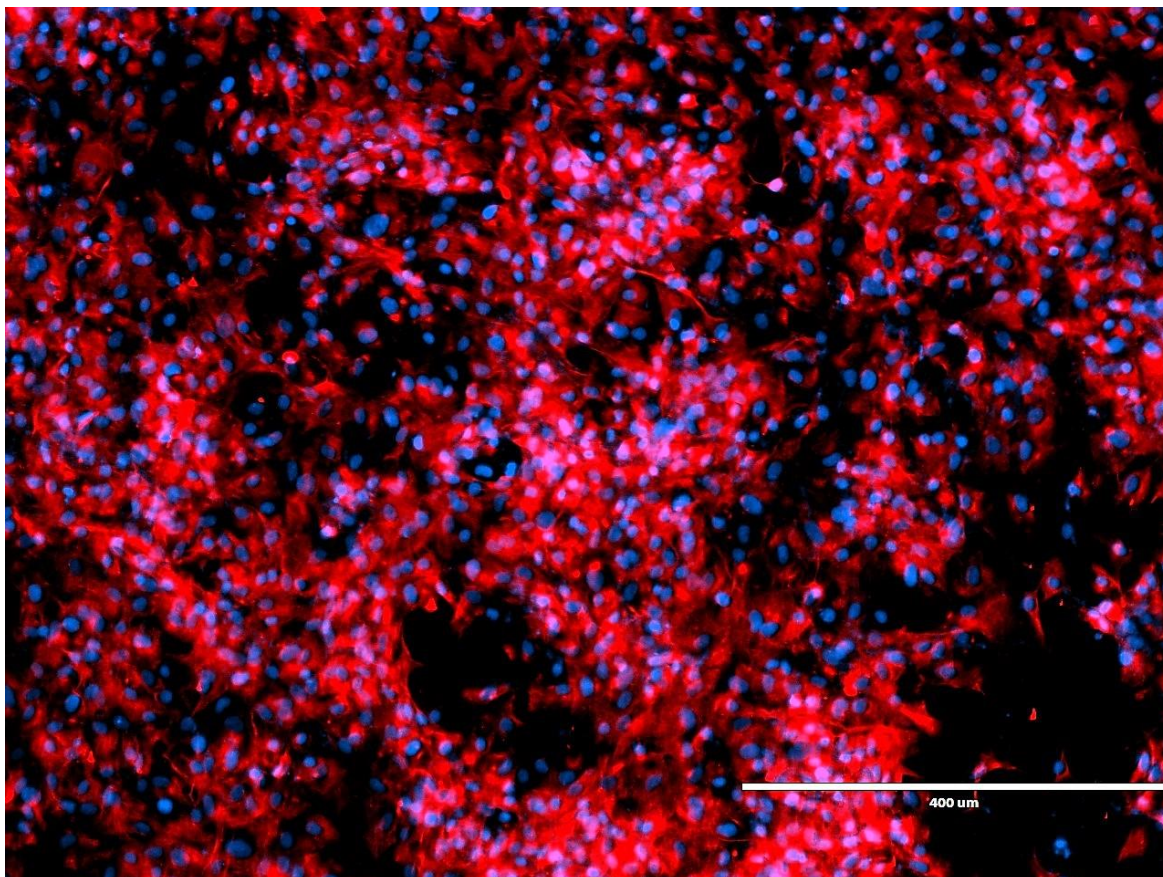
Imunocitokemična karakterizacija je pokazala, da je več kot 95 % gojenih celic izražalo astrocitne označevalce GFAP, GLAST in S100B (Slike 48, 49 in 50). Prisotnost teh specifičnih označevalcev je dokončno potrdila, da je izolirana kultura celic astrocitna.

**Slika 48: Celice, pozitivne na GFAP, so obarvane zeleno. Jedra so kontrastno obarvana z DAPI (modro). Slike so bile posnete pri povečavi 10x na fluorescenčnem mikroskopu EVOS FL. Merilo: 400  $\mu$ m**



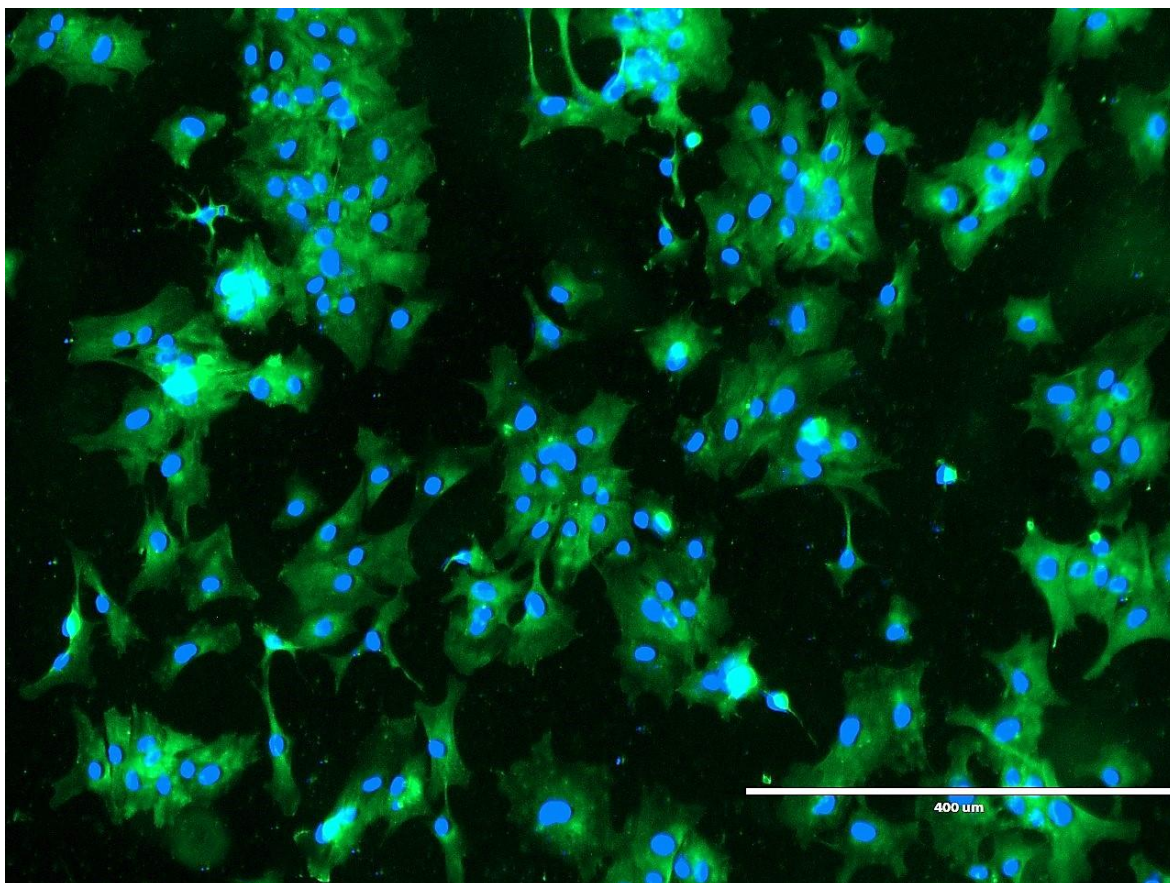
Vir: Lastna raziskava 2021.

**Slika 49: Prisotnost označevalca GLAST v citoplazmi je prikazana z rdečo barvo. Kontrastno obarvanje celičnih jeder z DAPI (modro). Slike smo posneli pri povečavi 10x na fluorescenčnem mikroskopu EVOS FL. Merilo: 400  $\mu$ m**



Vir: Lastna raziskava 2021.

**Slika 50:** Beljakovina S-100 v celični citoplazmi se pri imunocitokemični karakterizaciji prikaže v zeleni barvi. Jedra so kontrastno obarvana z DAPI (modro). Jedra so kontrastno obarvana z DAPI (modro). Slike so bile posnete pri povečavi 10x na fluorescenčnem mikroskopu EVOS FL. Merilo: 400  $\mu\text{m}$



Vir: Lastna raziskava 2021.

### **3.5 Razprava**

#### **3.5.1 Uvod**

Astrociti so ključne celice centralnega živčnega sistema in imajo pomembno vlogo v številnih fizioloških in patoloških okoliščinah (Nimmerjahn 2009; Kettenmann in Verkhratsky 2011; Bedner idr. 2019). Ker sodelujejo pri mnogih pomembnih funkcijah, se tudi morfološko in funkcionalno razlikujejo med seboj. Zato je njihovo proučevanje pri človeku in živalih potrebno in zanimivo iz več vzrokov. Ker pa je razumevanje njihovega delovanja in povezav na nivoju organa ali organizma preveč zapleteno, jih lahko nekoliko

bolj poenostavljeno proučujemo v celičnih kulturah in na funkcionalnih celičnih modelih, torej izolirane od vplivov ostalih celic in povezav v organizmu. Uporabne primarne kulture astrocitov predstavljajo pomemben temelj pri bazičnih in translacijskih nevroznanstvenih raziskavah, zlasti kot komponenta eksperimentalnih celičnih modelov v pogojih *in vitro* (Nimmerjahn 2009; Kettenmann in Verkhratsky 2011; Nimmerjahn in Bergles 2015). V zadnjih letih, ko postaja vse bolj pomembno tudi razumevanje patofizioloških procesov neurodegenerativnih obolenj, kjer igrajo astrociti odločilno vlogo, je zato tudi poudarek na njihovi izolaciji vse večji (Sharif in Prevot 2012). Težava pri takih raziskavah pa je, da večinoma operiramo z astrociti, ki so bili izolirani iz živalskih tkiv, kar pa predstavlja oviro, kadar želimo raziskovalne izsledke projicirati na človeka. Zato stremimo k uporabi astrocitov, izoliranih iz človeškega živčnega tkiva. V raziskavi smo tako želeli razviti laboratorijski protokol, ki bi bil uporaben za nadaljnje poskuse v pogojih *in vitro* in bi iz vzorca možganov omogočal vzpostavitev uporabne celične kulture človeških astrocitov odraslih darovalcev.

Celične kulture astrocitov, ki jih navadno uporabljamo v raziskovalni praksi, so v veliki večini živalskega izvora. Izoliramo jih iz živalskih tkiv, torej možganov in hrbtenjače. Najpogosteje dobimo izvorno živčno tkivo od glodavcev (Denis-Donini idr. 1984; Garcia-Abreu idr. 1995). To tkivo je lahko dostopno in na razpolago v zadostnih količinah. Velikokrat pride v poštev tudi tkivo drugih sesalcev, redkeje so izvor tkiva nižji vretenčarji. Kljub določenim prednostim, ki poleg dostopnosti tkiva in ugodnih možnosti za izolacijske postopke vključujejo tudi dobro rast izoliranih celic v kulturi, pa rezultatov poskusov na živalskih celicah ni mogoče neposredno prenesti na človeka. Izsledki raziskav na živalskih in človeških celicah so namreč včasih popolnoma nasprotni, prav zaradi različnih fizioloških lastnosti celic (Kimmelberg 2004; Lee idr. 2008). Celice živalskega izvora imajo namreč drugačne značilnosti in prav zato v eksperimentalni praksi težimo k uporabi človeških kultur (Kimmelberg 2004; Sofroniew in Vinters 2010, 7-9; Chew idr. 2014, 124-125).

Ena od glavnih težav, ki so povezane s človeškimi astrociti je, da jih je težko izolirati in gojiti v celični kulturi (Sharif in Prevot 2012). V pogojih *in vitro* te celice počasi rastejo, njihovo gojenje je zapleteno in izkupiček izolacije majhen. Poročil o izolaciji človeških astrocitov zato ni veliko in v eksperimentalni praksi so celice živalskega izvora bolj pogoste, čeprav manj uporabne (Nimmerjahn 2009; Sharif in Prevot 2012). Do sedaj je bilo opisanih je le nekaj zapletenih protokolov za izolacijo humanih astrocitov fetalnega izvora, ki jih

dobimo iz neonatalnih možganov (Sharif in Prevot 2012). Podatkov o izolacijskih postopkih astrocitov odraslih darovalcev ni, predvsem pa ni opisanih kratkih in izboljšanih izolacijskih protokolov, ki bi bili uporabni za izolacijo astrocitov pri darovalcih po poškodbi glave in po operacijah nerupturiranih možganskih anevrizem (Oberheim idr. 2009, 3276; Chaboub in Deneen 2012; Sharif in Prevot 2012, 137-138). Znano je namreč, da astrociti na različne vrste možganskih izultov odgovorijo zelo burno, kar se pozna tudi med izolacijo in kasneje na morfoloških in funkcionalnih značilnostih med rastjo teh celic v kulturi. Prav tako za izolacijo primarne kulture astrocitov ni primerno možgansko tkivo, ki je bilo pridobljeno od bolnikov z možganskimi tumorji ali nevrološkimi obolenji, saj gre tukaj za degenerirane, spremenjene in bolne celice. Nasprotno pa imajo astrociti, če je možgansko tkivo pravilno odvzeto pri kirurških oskrbah po poškodbi glave in nerupturiranih možganskih anevrizem, drugačne značilnosti, ki so primerljive s tistimi v zdravi, mirni možganovini. Za proučevanje celičnih modelov neurodegenerativnih obolenj in za razumevanje vloge astrocitov v takšnih razmerah zato potrebujemo zdrave človeške astrocite (Oberheim idr. 2009, 3277; Sofroniew in Vinters 2010, 8; Sharif in Prevot 2012, 137). Z namenom izolacije človeških astrocitov, ki bi bili uporabni za celično kulturo v funkcionalnih celičnih modelih neurodegenerativnih bolezni, smo zato v doktorski disertaciji razvili hiter, uporaben in enostaven protokol za izolacijo in gojenje človeških astrocitov, pridobljenih iz vzorcev možganske skorje starejših darovalcev. Menimo, da so celice takšnega izvora najbolj primerne za opisane raziskave. Proučevali smo rast celic in njihove značilnosti v celični kulturi. Cilj raziskave je bil potrditi, da je uporabljen laboratorijski protokol učinkovit ter da je na takšen način pridobljena celična kultura vitalna in stabilna, kar je temelj za nadaljnjo propagacijo teh celic v kulturi in njihovo uporabo v raziskovalnih laboratorijskih aktivnostih. Po našem vedenju je to prvo poročilo o izolaciji odraslih človeških netransformiranih astrocitov, ki so bili pridobljeni iz možganskega tkiva po poškodbi glave in po operacijah nerupturiranih možganskih anevrizem.

### 3.5.2 Izbira tkiva za izolacijo in postopek izolacije astrocitov

Na začetku raziskave je bilo najprej potrebno izbrati ustrezno tkivo, ki bi ga lahko uporabili za izolacijo celic. Astrocite je sicer mogoče izolirati iz najrazličnejših virov. Poleg človeka so opisane tudi izolacije astrocitov iz centralnega živčevja ostalih nevretenčarjev in vretenčarjev (Abbott idr. 2012; Bobilya 2012; Zusso in Debetto 2012; Alunni in Bally-Cuif

2016; Lopez-Ramirez idr. 2016). V znanstveni literaturi je opisanih veliko takšnih vrst izolacij teh celic in tudi veliko poskusov izvajajo na takih celičnih kulturah. Problem uporabe živalskih celičnih kultur pa je, da njihovih značilnosti ni mogoče popolnoma prenesti na človeka, zato težimo k uporabi človeških tkiv, iz katerih lahko take celice dobimo. Astroците je mogoče izolirati iz različnih delov človeških možganov in znano je, da imajo astrociti iz različnih regij možganov tudi različne značilnosti (Grupp idr. 2010; Oberheim idr. 2012; Bellaver idr. 2017). Vzorci človeškega tkiva so lahko pridobljeni iz možganov novorojenčkov ali odraslih. Prvi so vir fetalnih ali neonatalnih astrocitov, drugi pa so vir odraslih astrocitov (Sharif in Prevot 2012). Oboji imajo v raziskovalni praksi svoje prednosti in slabosti. Fetalne ali neonatalne astrocite lahko dobimo iz možganskega tkiva plodov med devetim in 22 tednom starosti, odvzetega po abortusih (John 2012, 404; Sharif in Prevot 2012). Dostopnost možganskega tkiva neonatalnega izvora je težavna, saj takšnih posegov ni veliko, problematičen pa je tudi čas za optimalen odvzem tkiva, saj se lahko zaradi hitro potekajočih nekrobiotičnih procesov tkivo okvari. Dodatno na preživetje celic vpliva tudi čas prenosa tkiva v laboratorij, ki se lahko zelo razlikuje. Ta čas je običajno pri vzorcih možganov, odvzetih po abortusih, daljši kakor pri vzorcih možganov, odvzetih med operacijami odraslih. Vsi neonatalni darovalci tudi niso primerni za odvzem tkiva za celično izolacijo, saj lahko farmacevtska sredstva, ki se uporabljajo za fetalno smrt, vplivajo na preživetje celic in tako zmanjšajo možnosti za uspešno vzpostavitev primarne celične kulture. Tudi različna patološka ter fiziološka stanja možganskega tkiva neonatalnih darovalcev in starostne razlike pri neonatalnih darovalcih lahko vplivajo na izolacijo astrocitov in povečajo variabilnost od primera do primera (Sharif idr. 2006; Sharif in Prevot 2012). Poleg tega postaja odvzem neonatalnega tkiva v zadnjih letih tudi etično vprašljiv in velikokrat poskusov z neonatalnih tkivom ni dovoljeno izvajati (Hansson 1988; Kimelberg 2004; John 2012, 402; Wyss-Coray 2016). Iz naštetih razlogov se v naši raziskavi nismo odločili za neonatalni izvor tkiva, ampak smo se usmerili na možgansko tkivo odraslih. Tukaj vzorce možganskega tkiva najpogosteje odvezamemo med različnimi nevrokirurškimi posegi, ki vključujejo kraniotomije zaradi možganskih tumorjev, epilepsije ali med operacijami različnih vrst krvavitev, kot so anevrizme, arteriovenske malformacije ali znotrajmožganski hematomi (Mizee idr. 2017; Sharif in Prevot 2012). V našem poskusu smo se odločili za resekcijske vzorce iz kortikalnih in subkortikalnih področij možganov pri dveh skupinah pacientov. Prva je vključevala tiste, ki so bili operirani zaradi hude možganske poškodbe, kjer je bila operacija potrebna zaradi nekrektomije poškodovanih možganskih

področij. Druga skupina pa je zajemala darovalce pri operacijah nerupturiranih možganskih anevrizem, kjer je bilo možgansko tkivo odstranjeno s kupole anevrizme. To je pomembno, da lahko med operacijo natančno prikažemo celotno anevrizmatsko vrečo, preden nanjo lahko namestimo kirurško sponko in jo tako izključimo iz krvnega obtoka. Ker je bil cilj vzpostaviti netrasmirano kulturo človeških astrocitov, je bilo treba pridobiti zdrav del možganov. Bolezensko spremenjeno tkivo, kot je na primer tumorsko tkivo, ki ga odstranimo med kirurškim posegom kot del zdravljenja osnovne bolezni, ni primerno za izolacijo, saj se celice ob bolezenskih procesih spremenijo. Prav tako ne moremo uporabiti tkiva, pridobljenega med operacijami različnih možganskih krvavitev in po kirurški oskrbi možganskih poškodb, kjer je tkivo neposredno poškodovano, čeprav je včasih takšnih vzorcev veliko na razpolago. Možganska substanca v bližini hematoma ali poškodbe (penumbra) ni primerna za izolacijo celic, ker je pogosto nekrotična ali subviabilna (takrat, kadar striktno govorimo o območju penumbre) (Kimelberg idr. 2006; Sharif in Prevot 2012). Zato je bilo pri načrtovanju našega poskusa zelo pomembno, da je bil vzorec možganovine pri pacientih s poškodbo glave odvzet nekoliko stran od nekrotičnih predelov, tako da je bilo tkivo čim bolj ohranjeno. Vzorci možganovine pri operacijah anevrizem so zajemali tanko plast možganskega tkiva, ki je pokrivalo anevrizmatsko vrečo in je bilo intaktno ter zaradi tega idealno za izolacijske postopke. Izolacijski postopki so tukaj zato enostavnejši in izplen izolacije je ob večji koncentraciji celic boljši. Vsi pridobljeni tkivni vzorci, ki smo jih uporabili pri poskusu, so bili odvečno možgansko tkivo, ki je ustrezalo neokorteksu in spodaj ležeči beli substanci možganov. Kadar klinični posegi in etične zahteve dovoljujejo odvzem takšne vrste vzorcev, ki jih v normalnih operacijskih razmerah zavržemo, jih lahko koristno uporabimo za izolacijo.

Čas prenosa možganskega tkiva iz operacijskih prostorov do celičnega laboratorija je eden od bistvenih pogojev za uspešno izolacijo celic (Jakocevski idr. 2009). V našem primeru je znašal do 20 minut. Ostali avtorji navajajo, da je optimalen čas prenosa običajno do dveh ur in da je čas prenosa pri neonatalnih možganih, odvzetih po abortusih, zaradi vseh dodatnih postopkov priprave po odvzemu daljši, kakor pa pri odvzemu tkiva odraslih darovalcev po nevrokirurških posegih. To tkivo je običajno tudi bolj stabilno, zato ker je navadno manj izpostavljeno medikamentoznim vplivom in v laboratorij pride veliko hitreje, kar omogoča boljše izhodišče za izolacijske postopke (Jakocevski idr. 2009; Rustenhoven idr. 2016).



Glede na uspešno izolacijo astrocitov in dobro rast celic v našem poskusu, je bil pomemben dejavnik gotovo tudi čas prenosa tkiva v laboratorij.

Pred izvedbo poskusa je bilo potrebno najprej določiti vrsto, velikost in število resekcijskih vzorcev, ki bi bili primerni za izolacijo odraslih astrocitov. Ker je bil cilj poskusa izolacija netransformiranih celic, torej vzpostavitev nespremenjene, zdrave celične kulture, smo za to potrebovali zdrav del možganov. Skrbno odstranjen zdrav del možganskega tkiva je bil odvzet v sterilnih pogojih v operacijski dvorani in pri sobni temperaturi takoj shranjen v sterilno epruveto s fosfatnim pufrom ali celičnim medijem, da bi preprečili izsušitev in zgodni razpad tkiva. Vzorce smo takoj odnesli v celični laboratorij in začeli s postopki izolacije, da bi zaradi avtolitičnih procesov v tkivu, ki se začnejo že takoj po odvzemu, odmrlo čim manj celic in da bi tako bila izolacija celic čim bolj učinkovita. Skupno smo odvzeli več vzorcev možganskega tkiva. Štirje so izvirali od pacientov s poškodbo možganov, dva pa od pacientov po operaciji nerupturirane možganske anevrizme. Ta dva vzorca sta bila uporabljena kot kontrola. V tem stanju so namreč možgani mirni in celice niso izpostavljene škodljivim dražljajem, kot pri poškodbah ali subarahnoidni krvavitvi. Kljub temu, da smo iz tkivnih vzorcev možganskega tkiva, ki smo jih dobili od darovalcev po poškodbi glave, odstranili vse nekrotične areale in uporabili le popolnoma vitalne dele vzorca in torej sklepali, da je nevroglia v tem delu nedotaknjena in neaktivirana, smo vseeno želeli za kontrolne izolate uporabiti popolnoma intaktno možgansko tkivo, ki nikakor ni bilo izpostavljeno kakršnimkoli inzultom. Idealni tkivni vzorci so zato predstavljali tiste dele tkiva, ki smo jih odvzeli od pacientov pri operacijah anevrizme.

Pri začetni obdelavi možganskega tkiva, odvzetega po poškodbi glave, smo v laboratoriju posebno skrb namenili pazljivi obdelavi vzorca. Ločili smo poškodovano možgansko tkivo, uporabili pa le intaktne dele vzorca. Tudi ostali avtorji navajajo, da sta kvaliteta tkiva in njegova priprava bistveni za uspeh izolacije, predvsem kar se tiče obdelave tkivnega vzorca pred izolacijskimi postopki (Kimelberg 2004; Lee idr. 2008; Oberheim idr. 2009; Sharif in Prevot 2012). Potrebno je odstraniti vse nekrotične dele, kar lahko opravimo v grobem že v operacijski dvorani, takoj po odvzemu tkiva, ali pa v celičnem laboratoriju, kje lahko še bolj natančno ločimo neuporabne dele od zdravih, uporabnih. Predvsem moramo biti pozorni, da tkivni vzorci niso preveč kontaminirani s krvjo, saj eritrociti lahko motijo proces celične izolacije. Tudi odmrle celice, kadar jih je v vzorcu preveč, lahko zavirajo rast primarne kulture ali pa povečajo možnost njene kontaminacije (Sharif in Prevot 2012; Wu idr. 2019;

Zhang idr. 2020). V našem poskusu smo vse nekrotično tkivo odstranili, število eritrocitov pa smo zmanjšali z večkratnim spiranjem s fosfatnim pufrom in rastnim medijem. Med rastjo astrocitov nismo imeli težav zaradi prisotnosti drugih vrst kontaminantnih celic.

Med izolacijskimi postopki je bilo potrebno razviti učinkovito tehniko za vzdrževanje izoliranih celic, kar pogosto predstavlja izziv (Lee idr. 1992; Sarthy 2007; Chaboub in Deneen 2012). Izolacija odraslih človeških astrocitov je namreč težavna, saj se lahko zgodi, da v pogojih *in vitro* te celice hitro odmrejo. Poleg tega lahko med postopki izolacije pride do kontaminacije z bakterijami in glivami, kar vodi do slabe rasti in propada celične kulture. Naslednja nevarnost je, da se lahko kljub idealnim lastnostim netransformirana celična kultura dediferencira in celice po določenem številu pasaž izgubijo svoje fenotipske značilnosti. To je mogoče nekoliko popraviti s posebnimi pogoji gojenja in selektivnimi celičnimi gojišči (Lee idr. 1992; Kimelberg idr. 2000; Chaboub in Deneen 2012; Mizee idr. 2017). Naši astrociti so ohranili značilnosti tkiva, iz katerega so bili izolirani. Tudi bakterijskih ali glivičnih okužb nismo beležili.

Vsi postopki izolacije astrocitov in značilnosti rasti so bili pri vseh šestih izolacijah podobni. Celice so dobro rasle in nismo opazili, da bi bili izolati po poškodbi možganov drugačni, da bi imele celice spremenjene lastnosti, da bi počasneje rasle ali da bi se od kontrole razlikovale po morfologiji. Tudi odstopanj v karakterizaciji celic, opisani v sledečih odstavkih, nismo opazili. Primarna kultura je bila konfluentna po enem mesecu in v kulturah ni bilo opaziti morfoloških razlik. Vitalnost kultur po ponovnem nasajanju in odmrzovanju je bila 95 %. Za doseganje konfluente so celice potrebovale en mesec, do zamrznitve pa smo celice v kulturi gojili štiri mesece. Enako so ugotovili tudi Sharif in sod., ki so poročali, da so fetalni astrociti prav tako potrebovali en mesec, da so dosegli konfluenco (Sharif idr. 2006; Sharif in Prevot 2012). Nasprotno pa so se fetalni astrociti razmnoževali štiri do šest mesecev, po tem času pa so začeli kazati znake staranja (Sharif in Prevot 2012).

Naše celice smo gojili do pete pasaže, nato pa smo jih zamrznili, shranili v tekočem dušiku, jih nato odmrznili in ponovno nasadili. Tudi te celice so normalno rasle. Glede na te rezultate menimo, da je metoda, opisana v protokolu, ponovljiva.

### 3.5.3 Značilnosti izolacije odraslih astrocitov

Tipične značilnosti astrocitov smo med rastjo opazovali pod invertnim svetlobnim mikroskopom. Astrociti v celični kulturi nimajo enake oblike kot v pogojih *in vivo* in lahko spremenijo svojo morfologijo, odvisno od koncentracije celic v kulturi in od gostote gojenja (Sharif in Prevot 2012; Rustenhoven idr. 2016). V poskusu smo opazili, da so se astrociti med rastjo kulture spreminjali. Takoj po nasaditvi in med zgodnjim pritrjanjem so bile celice najprej okrogle in zaobljene. Po 24 urah se je večina celic pritrčila na podlago in takrat so bile vidne spremembe oblike iz okrogle v bolj poligonalno. V kulturah z nizko gostoto so odrasli astrociti kazali poligonalno obliko z gostimi aktinskimi filamentami ob celičnih membranah. Značilna oblika jedra je variirala od poligonalne do okrogle in trikotne, oblika celic pa se je med postopkom pritrjevanja in predvsem med rastjo spreminjala od okrogle ali ovalne do poligonalne ali fusiformne, kar je bilo značilno za njihovo rast v konfluentni kulturi. Celice so imele kratke, debele izrastke in dolge, tanke podaljške. Nasprotno pa so celice v polni konfluenci spremenile svojo morfologijo in so postale bolj okrogle. O podobnih opažanjih so poročali tudi drugi raziskovalci. Ko so astrociti nacepljeni v gojilne posodice, se med rastjo oblikujejo najprej enoslojne kolonije celic, ki vsebujejo velike, okrogle in ploščate celice. Te gojilne posodice vsebujejo intakten monosloj astrocitov, ki so podolgovati, ploščati in podobni fibroblastom (Oberheim idr 2009; Kim in Magrané 2011; Sharif in Prevot 2012). Po enem mesecu *in vitro* je kultura sestavljena iz enoslojnih ploščatih celic, ki že izražajo GFAP. V kulturah z nizko gostoto imajo astrociti poligonalno obliko. V kulturah z visoko gostoto pa se aktinski citoskelet sosednjih celic prekriva in prerazporedi. Tukaj postanejo celice zato bolj zaobljene (John 2012; Oberheim idr 2009; Sharif in Prevot 2012). To je odvisno tudi od tega, od kod so astrociti izolirani, npr. iz hipotalamusa, možganske skorje in subkortikalne možganovine. Astrociti iz hipotalamusa imajo, na primer, bolj heterogene morfološke značilnosti (Sharif in Prevot 2012).

V konfluentni kulturi so imeli odrasli astrociti videz blede obarvanih celic, z ovalnimi do okroglimi (pri protoplazmatskih astrociti) ali lobatnimi (pri fibroznih astrociti) jedri z malo ali nič opazne nukleoplazme. Celice so rasle v gojilnih posodicah v enem sloju, ko je kultura postala konfluentna, pa se je rast ustavila. Celice se niso kopičile v kupolah ali rasle v več plasteh. To kaže, da je bila kontaktna inhibicija ohranjena, kar je edinstvena značilnost netransformiranih celic in je ne opazimo pri rakavih linijah (Allen in Barres 2009; Sharif in

Prevot 2012; Allen 2014). Celice med rastjo do pete pasaže tudi niso kazale znakov celične senescence. Po podatkih iz literature je znano, da imajo astrociti, pridobljeni iz možganov odraslih darovalcev, zelo omejeno proliferacijsko aktivnost in jih ni mogoče zlahka subkultivirati (Sharif in Prevot 2012). V našem poskusu smo dokazali, da se astrociti, pridobljeni iz odraslih možganov, v kulturi zlahka razmnožujejo in lepo rastejo. Tako izolirani astrociti iz odraslih možganov in gojeni z opisano tehniko na osnovi medija, ki izkorišča adherentne lastnosti teh celic, kažejo visoko stopnjo čistosti, zaradi katere so primerni za skoraj vse vrste raziskav *in vitro*.

Primarne kulture astrocitov izražajo pomembne označevalce. Najpomembnejši so GFAP, S100B in GLAST (Kimelberg 2004; Lee idr. 2008; Bedner idr. 2009; Nimmerjahn 2009; Sofroniew in Vinters 2010). Zato smo fenotipsko in funkcionalno opredelitev izoliranih celic opravili z imunocitokemijo in določanjem teh ključnih astrocitnih označevalcev. Imunocitokemične tehnike omogočajo odkrivanje specifičnih molekularnih označevalcev v astrocitih in so bistveno orodje za identifikacijo in karakterizacijo izoliranih celic. Glavna prepoznavna ultrastrukturalna značilnost astrocitov je prisotnost intermediarnih filamentov (glijalnih fibril), ki so veliko bolj izraziti pri fibroznih kot pri protoplazmatskih astrocitih. Glavna sestavina glijalnih fibril je GFAP, ki je specifičen za astrocite, tako *in situ*, kot v celični kulturi. GFAP je prototipni označevalec za imunocitokemično identifikacijo astrocitov, saj je zelo občutljiv in zanesljiv označevalec, zato ga vedno uporabljamo pri imunocitokemičnih opredelitvah astrocitnih kultur (Kimelberg 2004; Lee idr. 2008; Sofroniew in Vinters 2010; Sharif in Prevot 2012). Poleg GFAP pa primarne kulture astrocitov izražajo tudi druge pomembne označevalce, kot sta proteina GLAST in S100B, ki se specifično izražata le v astrocitih (Kimelberg 2004; Nimmerjahn 2009; Bedner idr. 2019). Astrociti, ki smo jih izolirali, so bili označeni s protitelesi, usmerjenimi proti GFAP, GLAST in S100B, torej proti glavnim in najpomembnejšim astrocitnim označevalcem. Glede na imunocitokemično analizo je več kot 95 % celic izražalo testirane označevalce. Imunocitokemična karakterizacija naših celic je potrdila, da kultura *in vitro* izraža testirane astrocitne označevalce. V primerih z več pozitivnimi označevalci v kulturi je ta kombinacija označevalcev boljša in zadostuje za potrditev fenotipa astrocitnih celic (Eng idr. 2000; Sofroniew in Vinters 2010; Sharif in Prevot 2012; Sofie idr. 2012; Barres 2014; Chew idr. 2014; Verhatski idr. 2014; Goldman in Kuypers 2015). Ker smo za naše astrocite iz

človeških možganov uporabili kombinacijo specifičnih označevalcev (GFAP, GLAST, S100B, ki so bili vsi pozitivni), smo lahko prepričani, da so bile izolirane celice res astrociti.

Morfologijo izoliranih astrocitov smo določili z barvanjem s fluorescenčnim barvilom Phalloidinom, ki selektivno obarva aktinski citoskelet. V celični kulturi smo dokumentirali spremembe v obliki celic, ki so se spreminjale med poligonalnimi in zvezdastimi (stelatnimi) oblikami. Glede na intenzivnost barvanja se je razlikovala tudi vsebnost znotrajceličnega aktina. Pri stelatnih oblikah ni posameznih aktinskih vlaken, namesto tega pa se vzpostavijo aktinske mreže. Nasprotno pa astrociti, ki zavzamejo poligonalno obliko v pogojih *in vitro*, vsebujejo vidna posamezna aktinska vlakna (Rotty idr. 2015). Pregled morfoloških lastnosti celične kulture astrocitov je tudi pokazal, da so se odrasli astrociti delili do konfluente in so izražali bistvene glialne lastnosti. Njihov profil je bil tako bolj podoben tistim v odraslih možganih, kar je še posebej pomembno pri uporabi teh celic za raziskovanje staranja živčevja. Funkcionalni celični model s takimi celicami bi lahko predstavljal koristno podlago za študije funkcij odraslih astrocitov v pogojih *in vitro* (Sofroniew in Vinters 2010; Verkhratsky 2010; Shandra in Robel 2019).

#### 3.5.4 Prednosti in slabosti celične kulture astrocitov ter potencialne težave med izolacijo

Pri izolaciji astrocitov je ena glavnih omejitev ta, da metode gojenja zrelih ali odraslih astrocitov še niso popolnoma razvite (Sofroniew in Vinters 2010). Tehnika, ki sta jo leta 1980 razvila McCarthy in de Vellis, pri kateri so bili astrociti izolirani iz možganov zarodkov glodavcev, je dolgo služila kot prototip za njihovo izolacijo. Veliko našega znanja o delovanju astrocitov, sinaptogenezi in njihovi vlogi pri preživetju nevronov izhaja prav iz študij teh celic (Sofroniew in Vinters 2010; Verkhratsky 2010). Čeprav so astrocitne kulture, izolirane s tehniko po McCarthyju in de Vellis, izboljšale naše razumevanje o delovanju astrocitov, saj je bilo s tem omogočeno širše dostopno proučevanje izoliranih astrocitnih kultur, pa imajo številne pomanjkljivosti. Ena glavnih je, da s to izolacijsko tehniko dobimo populacijo celic, ki izražajo astrocitne označevalce, za katere pa se zdi, da določajo nezrel ali reaktiven fenotip celic. Med postopkom izolacije preživi in se razmnožuje le majhen odstotek celic in zato taka populacija celic ni perspektivna na dolgi rok, saj je izjemno hitro podvržena celični senescenci. Poleg tega se na ta način izolirane celice sčasoma razslojuje v dve populaciji, astrocite in oligodendrocite. Slednji v celični kulturi rastejo čisto na površini gojilnih posodic, na vrhu astrocitov, in jih je mogoče ločiti, tako da v čisti kulturi končno

ostanejo le astrociti (Nimmerjahn 2009; Verkhratsky 2010). Tehnika izolacije po McCarthyju in de Vellisju je zapletena in je bila prvotno razvita za izolacijo astrocitov glodavcev, z nekaterimi spremembami pa je bila prenesena in uporabljena za izolacijo človeških astrocitov, saj drugih izolacijskih tehnik takrat ni bilo na razpolago. Tudi danes jo večinoma uporabljamo le še za izolacijo astrocitov glodavcev in za človeške astrocitate novorojenčkov, saj lahko ti lažje preživijo in se razmnožujejo v pogojih *in vitro*, če jih primerjamo z astrociti odraslih darovalcev (Bignami idr. 1972; Chaboub in Deneen 2012). Druge tehnike izolacije so prav tako dolgotrajne in zapletene, predvsem kar se tiče purifikacijskih postopkov in načina gojenja astrocitov v kulturi, saj je znano, da astrociti v kulturi ne rastejo enostavno (Sharif in Prevot 2012). Posebna in zelo dobra izolacijska tehnika je imunopaning. To je nova tehnika, ki omogoča tako imenovano prospektivno izolacijo astrocitov (Giffard in Ouyang 2009; Chaboub in Deneen 2012). Ker vključuje neposredno izbiro celic brez številnih korakov, kot jih imamo pri do sedaj opisanih izolacijah, omogoča izbiro reprezentativne populacije astrocitov iz celotne celične suspenzije. Imunopaning je zelo nežen postopek, pri katerem dobimo vitalne celice, ki jih lahko na koncu priprave gojimo v gojišču brez seruma, ki vsebuje heparin vezujoči epidermalni rastni dejavnik (ang. *heparin binding epidermal growth factor*). Ta rastni dejavnik je ključen za preživetje astrocitov v celični kulturi. Astrocitate, izolirane z metodo imunopaninga, lahko v celični kulturi dolgo vzdržujemo. Celice lahko tako rastejo celo več kot dva tedna. V nasprotju z astrociti, izoliranimi z imunopaningom, imajo celice, izolirane z drugimi tehnikami, krajšo življenjsko dobo v pogojih *in vitro*. Dobra stran je tudi, da astrociti, izolirani z imunopaningom, ohranijo svoje genske profile in fenotipske značilnosti in to celo bolj kot tisti, izolirani z metodo po McCarthyju in de Vellisju. Ugotovili so, da lahko tudi v pogojih *in vitro* spodbujajo preživetje nevronov ter oblikovanje in delovanje sinaps. Ti rezultati kažejo na pomembnost izolacije astrocitov z imunopaningom za namene preučevanja njihovih bioloških značilnosti. Poleg tega je ta tehnika izolacije primerna tudi za izolacijo astrocitov pri drugih živalskih vrstah, ne le pri glodavcih. V literaturi je do sedaj le nekaj opisov izolacije astrocitov s to tehniko pri človeku, za metodo pa je potreba posebna oprema in postopki, ki pa jih v vseh raziskovalnih laboratorijih nimajo ali pa ne uporabljajo (Hansson 1988; Montgomery 1994; Giffard in Ouyang 2009; Nimmerjahn 2009; Chaboub in Deneen 2012). Z metodo, ki smo jo opisali v naši raziskavi, pa smo dokazali, da je mogoče stabilno in uporabno kulturo teh celic pridobiti tudi s hitro in relativno enostavno tehniko, ki jo lahko uporabimo v večini celičnih laboratorijev.

Med postopkom izolacije astrocitov vedno obstaja dvom, da celice, ki smo jih izolirali in jih gojimo v kulturi, morda niso ciljne celice. Pri izolaciji katerihkoli možganskih celic, v našem primeru astrocitov, so vedno prisotne tudi druge, neželene celice ali kontaminantne celice, vključno z mikroglijo in oligodendroglijo (Giffard in Ouyang 2009; Chew idr. 2014). Astroцитi so najštevilnejša vrsta celic v možganih (Bignami idr. 1972; Montgomery 1994; Nimmerjahn 2009; Sofroniew in Vinters 2010; Zhang in Barres 2010; Chaboub in Deneen 2012; Chew idr. 2014). Delež astrocitov se med možganskimi regijami in v nekaterih možganskih območjih sicer razlikuje. Tako astroцитi lahko predstavljajo tudi od 20 % do 25 % ali celo do 50 % celotne mase možganov (Hansson 1988; Montgomery 1994; Nimmerjahn 2009). Oligodendrociti niso tako pogosto zastopani kot astroцитi. Med izolacijo je zato potrebno postopke prilagajati in na različnih stopnjah preverjati, ali so neželene celice odstranjene ter ali v kulturi res raste ciljna vrsta celic (Bignami idr. 1972; Hansson 1988; Nimmerjahn 2009; Chaboub in Deneen 2012). Tudi postopki izolacije različnih vrst možganskih celic se zato med seboj razlikujejo. Postopek izolacije astrocitov je drugačen v primerjavi z izolacijo oligodendroglije.

Izolacija astrocitov je razmeroma lažja od izolacije oligodendrocitov (ali oligodendrocitnih progenitornih celic (OPC)). Je tudi tehnično manj zapletena in hitrejša. Prvič, delež astrocitov v možganih je večji v primerjavi z oligodendrociti, zato so to glavne celice v mešani primarni celični kulturi (Bignami idr. 1972; Montgomery 1994; Nimmerjahn 2009; Sofroniew in Vinters 2010; Zhang in Barres 2010; Chaboub in Deneen 2012; Jungblut idr. 2012; Chew idr. 2014). Astroцитne kulture običajno vsebujejo manj kot 5 % mikroglije in neznatno število nevronov ali oligodendrocitov (Giffard in Ouyang 2009).

Drugič, protokol za izolacijo oligodendrocitov se močno razlikuje od protokola za astroците in je težji tudi od gojenja drugih vrst celic, na primer mikroglije, ependimskih ali vaskularnih celic. V mešanih glijalnih kulturah iz možganskega tkiva astroците in oligodendrocite pogosto lahko pridobimo z vzpostavitvijo mešanih glijalnih kultur (Levine 1989; Chew idr. 2014). Protokoli za izolacijo oligodendrocitov so opisani drugje (Giffard in Ouyang 2009; Jakovcevski idr. 2009; Goldman in Kuypers 2015). Pri gojenju primarne kulture je mogoče dobiti čiste pripravke astrocitov z več kot 95 % homogenostjo. V približno enem tednu se astroцитi že razmnožijo in zrastejo v enoslojno plast. Gojilne posodice tako vsebujejo monosloj astrocitov in nekaj oligodendrocitov, razpršenih po površini (Giffard in Ouyang 2009). V našem poskusu med rastjo kulture nismo opazili dodatnih celičnih plasti nad

astrociti. Gojilne posodice so vsebovale le eno plast astrocitov. Oligodendrocite in OPC smo odstranili med menjavanjem celičnega medija, z izpiranjem celične kulture in med precepljanjem celic. Astrociti se tudi hitreje razmnožujejo kot oligodendrociti. Poleg tega pa celice, ki so v celični kulturi zastopane v manjšini, med rastjo prevladujoče vrste celic postopoma izginejo iz kulture (Levine 1989; Chew idr. 2014; Goldman in Kuypers 2015). Tudi v literaturi opisani protokoli, čeprav redki za izolacijo človeških astrocitov, so skladni z našimi opažanji in ne poročajo o težavah z oligodendrociti kot kontaminantami (Levine 1989; Giffard in Ouyang 2009; Jakovcevski idr. 2009; Chew idr. 2014; Goldman in Kuypers 2015).

Tretjič, oligodendrociti v kulturi se po velikosti, obliki, morfologiji in razvejanosti celičnih izrastkov popolnoma razlikujejo od astrocitov, zato je pod mikroskopom mogoče razlikovati eno vrsto celic od druge (Giffard in Ouyang 2009; Jakovcevski idr. 2009; Chew idr. 2014; Goldman in Kuypers 2015). V naši kulturi nismo opazili nobenih celic, ki bi bile podobne oligodendrocitom.

Četrto, označevalci v oligodendrocitih se močno razlikujejo od označevalcev v astrocitih. GFAP se v oligodendrocitih ne izraža (Sarthy 2007; Giffard in Ouyang 2009; Nimmerjahn 2009; Middeldorp idr. 2011; Sofie idr. 2012; Barres 2014; Chew idr. 2014). Poleg tega je uporaba izražanja GFAP kot označevalca za astrocite utemeljena z ugotovitvami, da so samo astrociti v postnatalnih možganih izražali gen za GFAP in da se njegovo izražanje poveča med sedmim in 15. dnevom v rasti *in vitro* (Nakagawa in Schwartz 2004; Giffard in Ouyang 2009). Za identifikacijo naših celic smo zaradi večje natančnosti in varnosti določali več celičnih označevalcev. Ker je bilo več kot 95 % izoliranih astrocitov nanje imunopozitivnih, smo lahko potrdili, da so bile izolirane celice res astrociti. Nasprotno so nekateri drugi avtorji astrocite potrdili le na podlagi pozitivnosti na GFAP (Temple in Alvarez-Buylla 1999; Kimelberg 2004; Sarthy 2007; Wang in Bordey 2008; Barres 2014). Tudi celice mikroglije predstavljajo enega od potencialnih kontaminant. V človeških možganih je mikroglija prisotna v vseh regijah in predstavlja velik delež vseh možganskih celic, po ocenah tudi do 12 % (Parhkurst in Gan 2010). Čeprav je celične kulture astrocitov razmeroma enostavno vzpostaviti, so te lahko pogosto kontaminirane z mikroglialnimi celicami, ki so lahko prisotne tako nad kot pod monoslojem astrocitov. Mikroglijo odstranimo z mehanskim ločevanjem z uporabo fizikalnih lastnosti teh celic (Montgomery 1994; Oberheim idr. 2009; Sharif in Prevot 2012; Chew idr. 2014; Condic idr. 2014; Agalave 2020). Da bi lahko iz



naših izolatov odstranili celice mikroglije, smo osnovni protokol za izolacijo astrocitov kasneje prilagodili. Ta je najprej vključeval pripravo primarne celične kulture iz možganskega tkiva, nato pa smo celice mikroglije med menjavanjem gojišča odstranili z izpiranjem s celičnim medijem, saj so bile te le ohlapno pritrjene na površino gojilnih posodic. Količino mikroglije je na takšen način mogoče zmanjšati do 5 % ali manj, po mnenju nekaterih avtorjev pa celo na manj kot 1 % (Giffard in Ouyang 2009; Uliasz idr. 2012; Welser in Milner 2012). Naše kulture so imele visoko čistost astrocitov, celice mikroglije pa smo odstranili, kot je opisano zgoraj. Na ta način smo v vseh korakih med procesom gojenja astrocitov količino mikroglijalnih celic zmanjšali na manj kot 5 %.

Vir in stanje vzorca možganskega tkiva sta izjemno pomembna za uspeh izolacije vseh možganskih celic, ne le astrocitov (Knowlton idr. 2018; Kobayashi idr. 2019, 956-957; Azzarelli 2020, 2). Pacienti po poškodbi glave so pogosto darovalci tkiva za izolacijo astrocitov (Oberheim idr 2009; Sharif in Prevot 2012). Ena od pomembnih funkcionalnih in morfoloških sprememb astrocitov v takšnem patofiziološkem stanju je njihovo nabrekanje ali otekanje zaradi nastanka citotoksičnega edema (Montgomery 1994; Nakagawa in Schwartz 2004; Sofroniew in Vinters 2010). Poleg poškodbenih vzrokov se lahko z otekanjem astrocitov kažejo tudi druge motnje v delovanju živčnega sistema, kot so presnovne bolezni (hiperamonemija in hipoglikemija), ishemija, hipoksija in celične spremembe med epileptičnimi napadi. Vse to so nenadzorovana stanja, saj na celice neposredno ne moremo vplivati, vsaj ne takoj na začetku oziroma takoj po koncu delovanja škodljivih dejavnikov. Pri pacientih po možganski poškodbi pride do različnih sprememb, med drugim do sprememb v koncentraciji zunajceličnih ionov, vključno z zmanjšanjem koncentracije  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  in  $\text{Ca}^{2+}$ , povečanjem koncentracije  $\text{K}^+$ , zmanjšanjem zunajceličnega pH in kopičenjem ekscitatornih neurotransmiterjev. To je lahko povezano z več spremembami v delovanju, izražanju celičnih proteinov, tudi stresnih, in v morfologiji astrocitov (Montgomery 1994, 146; Sofroniew in Vinters 2010, 8-9). Reaktivni astrociti v odraslih možganih, ki nastanejo kot odgovor na poškodbo in se nato razmnožijo v kulturi, tako ponovno izražajo nekatere označevalce razvijajočih se astrocitov, ki jih sicer pri odraslih celicah ni več, vključno z geni za vezavo DNK, apoptozo, uravnavanje celičnega cikla, celično adhezijo, citoskelet in tvorbo molekul ekstracelularnega matriksa ter geni za prenos signalov. Običajno odrasli astrociti v primerjavi z neonatalnimi izražajo več genov za presnovne encime (Nakagawa in Schwartz 2004, 203-206; Chew idr. 2014, 125-134).

Najbolj opazna morfološka sprememba je nabrekanje astrocitov, ki je reverzibilna, morfolologija pa se spremeni, ko se celice ustalijo v kulturi. Tudi učinek neurotransmiterjev sčasoma zbledi in med nadaljnjim precepljanjem v celični kulturi morfološke razlike niso več tako izrazite (Montgomery 1994; Sofroniew in Vinters 2010; John 2012; Sharif in Prevot 2012). Drugi avtorji so opisali enaka opažanja, kot smo jih potrdili pri naših celicah (Oberheim idr. 2009; Sharif in Prevot 2012). Omejitve izolacije astrocitov iz možganskega tkiva, pridobljenega po možganskih poškodbah, torej vključujejo ponovno izražanje in spreminjanje celičnih označevalcev, spremembe v izražanju beljakovin in posledično spremembe v imunocitoloških barvanjih, morfološke spremembe, možne poškodbe celic zaradi zunajceličnega in znotrajceličnega edema, ki ga povzroči poškodba (tukaj ne mislimo le na travmo ampak na vsak inzult, ki vpliva na celično delovanje), posledično težave v rasti celične kulture in manjše število pasaž (Kimmelberg 2004; Middeldorp in Hol 2011; Sharif in Prevot 2012; Chew idr. 2014; Barres 2014). Do določene mere se tem težavam med celično izolacijo lahko izognemo s skrbno pripravo tkivnega vzorca, ki pa se začne že takoj po odvzemu. Morfološke spremembe so namreč odvisne od lokacije tkiva, ki je bilo poškodovano, to je od lokacije poškodbe, ki je prizadela možgansko tkivo (Tatter 1999, 780; Sharif in Prevot 2012). V našem poskusu tkiva nismo odvzeli neposredno iz področja poškodbe (na primer zmečkana, kontudirana možganovina) ali iz penumbre, kjer je možganovina sicer poškodovana, vendar še vedno vitalna. Pazili smo, da smo uporabili tkivo z roba izrezanega vzorca, kjer je bilo mikroskopsko intaktno. Na ta način je mogoče delno uravnotežiti vir tkiva in stanje celic, ki so namenjene izolaciji, tako da uporabimo le čim bolj ohranjeno tkivo. V veliki meri je to tudi odvisno do narave poškodbe in vrste kirurškega posega, zato vsi darovalci po poškodbi glave tudi niso primerni za odzem (Tatter 1999; Sudhakar in Richardson 2019). Za kontrolno smo v poskusu uporabili vzorec možganskega tkiva, ki je bil odvzet med operacijo nerupturirane anevrizme, torej tega tkiva niso prizadela patološka stanja. V celični kulturi nismo opazili razlik v morfologiji astrocitov, izoliranih iz tkiva po poškodbi in pri operaciji anevrizme. Tudi izražanje celičnih označevalcev med imunocitokemičnimi barvanji je bilo v vseh vzorcih enako. To pomeni, da predstavljajo tudi pacienti po poškodbi možganov dober vir tkiva za izolacijo, če je to pred laboratorijskimi postopki dobro pripravljeno.

Pomembno omejitev takšne raziskave lahko predstavlja dostopnost ustreznih vzorcev možganskega tkiva (Tatter 1999, 780; Teo 2010, 583; Sharif in Prevot 2012). Do njih včasih

ni lahko priti, ker je potrebno počakati na primerne operacije, upoštevati pravilen način kirurškega odvzema tkiva in nato vzorce hitro prenesti v laboratorij, da preprečimo propadanje tkiva v tranzicijskem času. Omejitev predstavlja tudi težavna rast izolirane kulture astrocitov, saj je iz literature znano, da astrociti odraslih darovalcev v celični kulturi težko rastejo in imajo omejeno število delitev (Tatter 1999, 780; Sharif in Prevot 2012). Prav tako moramo pridobiti zadostno število celic in čisto kulturo astrocitov, brez primesi drugih celic glije. Le čista astrocitna kultura je primerna za nadaljnje poskuse na funkcionalnih celičnih modelih, kar smo že opisali v zgornjih odstavkih. Vzpostavitev primarne kulture astrocitov je tudi časovno dolgotrajna (Gradišnik idr. 2020; Sharif in Prevot 2012). Ostali negativni vidiki celičnih kultur predstavljajo visoke stroške potrošnega in laboratorijskega materiala ter celičnih medijev in ostalih reagentov, občutljivost celičnih kultur na rastne pogoje in možnost okužbe, občutljivost celičnih kultur na rastne pogoje, kamor ne sodi le tveganje za primarno kontaminacijo, ko so mikroorganizmi prisotni že v samem tkivnem vzorcu, ampak tudi možnost navzkrižnih prenosov okužbe v laboratoriju. Celična kultura se lahko med gojenjem in precepljanjem dediferencira, celice pa tako izgubijo fenotipske značilnosti, ki so jih imele v tkivu, od koder smo jih izolirali (Freshney 2000, Freshney 2006, 256-277; Gradišnik 2014, 40-42).

Med poskusom smo se nekaterim omejitvam izognili s skrbno pripravo tkivnega vzorca, s prilagajanjem poskusnih pogojev in z natančnim spremljanjem celične kulture med rastjo. Tako večjih težav ob upoštevanju dosedanjih poročil iz literature in skrbnem laboratorijskem delu nismo opazali. Celce so dobro rastle tudi po tem, ko smo jih ponovno odtalili iz vial v tekočem dušiku, kjer so bile shranjene. S tem smo potrdili, da je celična kultura uporabna na dolgi rok in da celice ohranijo svoj potencial rasti tudi po zamrzovanju, kar je važno za nadaljnjo propagacijo celic pri poskusih. Shranjene celice so pomembne tudi zato, ker so na razpolago v zadostnih količinah za kasnejše poskuse in zato nove izolacije iz tkivnih vzorcev, ki so zapletene in dolgotrajne, potemtakem niso več potrebne (Oberheim idr. 2009; Sofroniew in Vinters 2010; Sharif in Prevot 2012; Gradišnik idr. 2020). Glavne prednosti celične kulture odraslih človeških astrocitov vidimo pri različnih raziskavah, ki vključujejo možnost izvajanja biokemičnih analiz posameznih opredeljenih vrst celic, manjšo kompleksnost celic (v primerjavi s celotnimi možgani), možnost popolnega nadzora celičnega okolja, slikanje posameznih celic in elektrofiziologijo ter celično kokulturo in manipulacijo izražanja genov (John 2012). Odrasli astrociti vsebujejo dobro vzpostavljene

povezave in so bolj organizirani kot v neonatalnih možganih, ki so plastični in labilni na dražljaje. Zato se lahko kulture astrocitov, pridobljene od odraslih ljudi, odzivajo bolj zanesljivo in lahko pomagajo pojasniti vlogo astrocitov v razmerah *in vivo* (Nedergaard idr. 2003; Parkhurst in Gan 2010; Condic idr. 2014). Tako je primerneje te celice preučevati ločeno, in sicer v pogojih *in vitro*, kjer lahko odstranimo ostale, moteče dejavnike, ki bi sicer vplivali na celično delovanje (Denis-Donini 1984; Morga idr. 1999; Zhang in Barres 2010; John 2012). V raziskavi smo potrdili, da je predstavljen protokol za izolacijo astrocitov hiter in uporaben in da omogoča vzpostavitev uporabne celične kulture, kljub poročilom nekaterih avtorjev, da je to težavno (Sofroniew in Vinters 2010; Sharif in Prevot 2012). Tako menimo, da so bili cilji raziskave doseženi. Smiselne bi bile še nadaljnje raziskave z drugimi vrstami možganskih celic, kot so mikroglia in celice oligodendroglije, mikrovaskularne celice in mogoče izolacije nevronov, kar pa je tehnično zelo zahtevno. Vse te celice bi lahko v raziskovanih modelih vključili v kokulture, različne funkcionalne celične modele in poskuse za izdelavo sferoidov za raziskave v medicini, biokemiji, farmaciji, in na določeni točki predvsem kot verodostojno zamenjavo za poskusne živali. To so le majhni koraki, ki bodo v prihodnosti omogočili boljše poznavanje delovanja možganskih celic in njihovih interakcij ter s tem tudi njihove vloge pri nevrodegenerativnih obolenjih (Wassmer idr. 2020; Kitamura idr. 2021; Ko idr. 2021; Kumarasamy idr. 2021; Li idr. 2021; Parker Struckhoff in Del Valle 2021; Qian idr. 2021).

### 3.5.5 Izhodišča za nadaljnje raziskave

Nadgradnja uporabe astrocitne celične kulture je njihovo vključevanje v interakcije z ostalimi celicami v tako imenovane celične ko-kulture in kombinacija celičnih kultur z biomateriali. Tkivno inženirstvo je obetavna alternativa poskusom na živalih in je idealna priložnost za razvoj in testiranje različnih biomaterialov za proučevanje vraščanja celic in obnove tkiv (Nedergaard idr. 2003; Parker Struckhoff in Del Valle 2021; Qian idr. 2021). Regeneracija osrednjega živčnega sistema je tukaj še posebej aktivno področje raziskovanja. Nekateri raziskave *in vitro* so pokazale obetavne rezultate pri procesih regeneracije živčevja (Oberheim idr. 2009; Sofroniew in Vinters 2010; Sharif in Prevot 2012). Biomateriali imajo številne funkcije, ne le terapevtske, kot so indukcija regeneracije aksonov, nevroprotekcija, modulacija vnetnega odziva in lokalno sproščanje terapevtskih agensov na mestu poškodbe (Tatter 1999, 780; Oberheim idr. 2009; Sharif in Prevot 2012). Poleg tega je mogoče

poskusne podlage iz biomaterialov, ki jih uporabljamo v eksperimentalnih celičnih modelih, izdelati tako, da olajšajo in usmerjajo širjenje obnavljajočih se aksonov v področje bele substance in modulirajo aktivnosti podpornih celic živčevja, torej astrocitov in oligodendroglije. Zato novo razvite biomateriale testiramo v eksperimentalnih celičnih modelih, kjer kot celično kulturo pogosto uporabljamo prav astrocite, samostojno ali pa v ko-kulturi z ostalimi celicami centralnega živčevja (Sofroniew in Vinters 2010; Sharif in Prevot 2012).

### 3.5.6 Izgledi za prihodnost: astrociti in tkivni inženiring

Poškodbe hrbtenjače in možganov predstavljajo pomemben klinični problem za zdravljenje, saj funkcionalno uspešne regeneracije nevronov v klinični praksi do sedaj še ni bilo mogoče doseči. Poškodbe možganov in hrbtenjače, možganska kap in nevrodegenerativne bolezni so eden izmed najpogostejših vzrokov obolevnosti in umrljivosti po vsem svetu in predstavljajo velik izziv za uspešno zdravljenje. Travmatska poškodba možganov vodi v funkcionalne primanjkljaje zaradi uničenja aksonov, nastanka cističnih votlin, brazgotinskega tkiva in fizičnih vrzeli v možganskem tkivu. Reaktivni kisikovi radikali, ki nastanejo takoj po primarni poškodbi, povzročajo množično smrt nevronov in seveda tudi drugih, podpornih celic živčevja, kar poslabša potek sekundarne poškodbe in vodi k poslabšanju nevroloških okvar (Tatter 1999, 780; Sharif in Prevot 2012). Pri poškodbi hrbtenjače so mehanizmi poškodbe nevronov podobni. Pri možganski kapi primarnim ishemičnim spremembam sledita oteklina možganskega tkiva (edem) zaradi motenj v preskrbi celic z energijo in spremembe v prepustnosti žil (citotoksični in vazogeni edem), kar povzroči sekundarno poškodbo možganov, ki negativno vpliva na klinično stanje in kasneje na prognozo. Pri takšnih poškodbah niso prizadeti le nevroni, ampak tudi številne druge celice v možganih in hrbtenjači, kot so astrociti, mikroglia, oligodendrociti, endotelijske celice in periciti, ki vstopajo v patološke mehanizme teh stanj (Oberheim idr. 2009; Sofroniew in Vinters 2010; Sharif in Prevot 2012). Ker ima centralni živčni sistem omejeno sposobnost, da se zoperstavi poškodbam in motnjam v delovanju aksonskih poti ter nadomesti izgubljene nevrone, te bolezni pogosto povzročijo trajne nevrološke okvare (Tatter 1999; Sharif in Prevot 2012; Sudhakar in Richardson 2019). Da bi omejili obseg poškodb nevronov in spodbudili okrevanje poškodovanih področij možganov in hrbtenjače, so bili izvedeni številni poskusi, vključno z omejevanjem penumbre in spodbujanjem regeneracije celic centralnega živčnega

sistema. V raziskavah *in vitro* so bili z uporabo biomaterialov pri poskusih preprečevanja nastanka nevroglialne brazgotine in obnavljanja izgubljenih celic, predvsem nevronov, pogosto uporabljeni celični pristopi z uporabo tako imenovanih bioinženirskih premostitvenih materialov. Ti delujejo kot nekakšni nosilci za podporno integracijo z gostiteljskimi celicami in za implantacijo glialnih celic, ki bi spodbujale rast in obnovo aksonov. Seveda so vse te raziskave še na začetku in tudi uporabljeni biomateriali v poskusni fazi proučevanja (Allen in Barres 2009; Allen 2014).

Astroцити imajo eno od ključnih vlog v razvojnih in regenerativnih procesih centralnega živčnega sistema. Med razvojem živčevja poteka migracija nevronov in širjenje aksonov vzdolž koridorjev, ki jih oblikujejo druge celice, zlasti astroцити (Allen in Barres 2009; Sharif in Prevot 2012). Te poti ali koridorji se imenujejo živi odri. V regenerativni medicini centralnega živčevja je cilj simulirati takšne nosilce ali odre z umetnimi vsadki iz biomaterialov, poseljenih z eno vrsto celic ali več specifičnimi vrstami celic, da bi te spodbudile regeneracijo nevronov, omogočile ciljno rekonstrukcijo, nadomestile poškodovana živčna vezja in omejile nastajanje glialnih brazgotin. Takšni živi nosilci so izdelani *in vitro* in jih kot vsadke lahko apliciramo *in vivo*, kjer sproščajo celične adhezijske molekule ter nevrotropne in kemotaktične agense, ki aktivno uravnavajo migracijo nevronov in rast aksonov med regenerativnimi procesi (Oberheim idr. 2009; Sofroniew in Vinters 2010; Sharif in Prevot 2012).

Bistveno vlogo pri delovanju in strukturi astroцитов ima tudi možgansko mikrookolje. Glede na morfološki videz in razporeditev se astroцити razlikujejo po teritorialni organizaciji in fizioloških lastnostih, vključno z glutamatnim transporterjem in izražanjem proteinov (Oberheim idr. 2009; Sofroniew in Vinters 2010; Sharif in Prevot 2012; Parker Struckhoff in Del Valle 2021; Qian idr. 2021). Pomembne niso le celice, nevroni in oligodendroglia, temveč tudi sestava zunajceličnega mikrookolja z zunajceličnim matriksom, ki je njegova glavna komponenta. Sestava zunajceličnega matriksa vključuje predvsem proteoglikane, nekaj laminina, tenascinov in hialuronske kisline. Pri gojenju astroцитов za raziskave biomaterialov so te interakcije bistvene za pridobitev optimalnega celičnega fenotipa, tako da se lahko čim bolj približamo pogojem *in vivo*. Zato se pri obravnavi astroцитов kot ene od živih sestavin biomaterialov za raziskave regeneracije možganov in hrbtenjače srečujemo z dvema velikima izzivoma:

I) ohranjanje neaktiviranega stanja astrocitov z nizkim izražanjem GFAP in

II) doseganje fiziološke morfologije celic v celični kulturi.

GFAP ni le prototipni označevalec za imunocitokemično identifikacijo astrocitov (Nedergaard idr. 2003; Parkhurst in Gan 2010; Condic idr. 2014). Je tudi ključnega pomena pri raziskavah biomaterialov. Za razvoj naprednih in inovativnih biomaterialov mora vrednotenje astrocitov glede na biomateriale vključevati analizo številnih citoskeletnih proteinov. GFAP je eden najpomembnejših, saj je znano, da lahko biomateriali vplivajo na njegovo sintezo in izražanje. Zato je kvantifikacija tega proteina v celični kulturi eden najpogosteje preučevanih parametrov. Biomateriali, ki zmanjšujejo izražanje GFAP, naj bi pomagali pri regeneraciji nevronov. Če biomaterial poveča izražanje GFAP, pa to nasprotno kaže na bolj reaktiven fenotip astrocitov, ki morda ne bo ugodno vplival na regeneracijo, saj se bo usmeril v izdelovanje glialne brazgotine, ki pa končno ni funkcionalno tkivo. Za razvoj biomaterialov je torej pomembno, da novi biomateriali usmerjajo astroците k takemu fenotipu, ki spodbuja regeneracijo aksonov in preživetje nevronov (Nedergaard idr. 2003; Allen in Barres 2009; Oberheim idr. 2009; Parkhurst in Gan 2010; Sofroniew in Vinters 2010; Sharif in Prevot 2012; Condic idr. 2014).

Za preučevanje odziva astrocitov na fiziološke in patofiziološke razmere ter za oblikovanje biomaterialov, ki ugodno vplivajo na astrocite, izvajamo poskuse *in vitro* na različnih celičnih modelih in v kombinaciji z različnimi biomateriali. Ti lahko spremenijo fenotip celic v smeri nizkega izražanja GFAP, na kar pa vpliva tudi podlaga oziroma sestava biomateriala (Nedergaard idr. 2003; Oberheim idr. 2009, 3276). Najpogosteje uporabljeni biomateriali za regeneracijske astrocitne modele vključujejo kolagenske gele, hidrogelne, ki so izdelani na osnovi hialuronske kisline, kombinacije gelov iz kolagena in hialuronske kisline, gele, sestavljene iz različnih razmerij hialuronske kisline, kolagena in matrigela, polimerne skelete in vzorčene podlage (Nedergaard idr. 2003; Parkhurst in Gan 2010; Sofroniew in Vinters 2010; Sharif in Prevot 2012).

Celice glije, ki jih vsebujejo inženirsko izdelane žive podlage, lahko modulirajo številne razvojne mehanizme v možganih, ki so pomembni pri regeneraciji. Takšne podlage pogosto vsebujejo astrocite kot najštevilčnejše celice v centralnem živčevju. Podlage iz hidrogela so lahko prevlečene z zunajceličnim kolagenskim matriksom in naseljene z astrociti. Te podlage spodbudijo astrocite, da rastejo in se usmerjajo v goste tridimenzionalne snope.

Take formacije astrocitov zagotavljajo ugoden substrat za pritrditev nevronov in rast nevitov. Poleg tega te biološko izdelane podlage ohranijo svojo celovitost in usmerjenost tudi, ko se ločijo od hidrogela, zaradi česar so primerne za vsaditev v centralni živčni sistem (Nedergaard idr. 2003; Giffard in Ouyang 2009; Parkhurst in Gan 2010; Chew idr. 2014; Condic idr. 2014). Tako lahko sodelujejo pri usmerjanju in spodbujanju rasti in širjenja nezrelih nevronov med migracijo ter pomagajo pri iskanju aksonskih poti skozi sicer nepermisivna okolja med regeneracijo. To lahko potencialno ublaži učinke degeneracije nevronov, ki so tako pogosti pri poškodbah in nevrodegenerativnih boleznih živčnega sistema. Do sedaj so take žive podlage še vedno eksperimentalne in omejene na uporabo v raziskavah na živalih. Tako je bil, na primer, biomimetični samosestavljeni peptidni hidrogel kot stabilizacijska podlaga in nosilec za možganske celice po poškodbi možganov in hrbtenjače preizkušen na podganah. Izkazal se je kot primeren sistem za dostavo celic in tudi zdravil v poškodovana področja centralnega živčevja (Lange idr. 2012; Oberheim idr. 2012; Herculano-Houzel 2014).

Znano je tudi, da so astrociti pomembna sestavina krvno-možganske pregrade. Imajo vodilno vlogo pri njenem vzdrževanju in popravljanju, uravnavajo homeostazo aminokislin, ionov in vode ter proizvajajo beljakovine za njeno krepitev (Nedergaard idr. 2003; Parkhurst in Gan 2010; Herculano-Houzel 2014). Številni modeli človeške krvno-možganske pregrade v pogojih *in vitro* vključujejo astrocite in jih kombinirajo z drugimi celicami, najpogosteje z endotelijskimi celicami, saj so v krvno-možganski pregradi bistvenega pomena prav tesni stiki med endotelijskimi celicami in njihove interakcije z astrociti. Modeli krvno-možganske pregrade *in vitro* vključujejo hidrokele, ki služijo kot platforme za preučevanje delovanja in celičnih interakcij v krvno-možganski pregradi ter novih metod za zdravljenje tumorjev. Znano je, da v takih patoloških stanjih krvno-možganska pregrada velikokrat popusti. Omejevanje poškodb možganov pri tej vrsti patologije je zato ključno. Zadnje raziskave so usmerjene tudi na eksperimentalno zdravljenje možganske kapi ter na spodbujanje vnosa terapevtskih sredstev v centralni živčni sistem pri zdravljenju nevrodegenerativnih obolenj (Grupp idr. 2010; Sofroniew in Vinters 2010; Sharif in Prevot 2012).

Naslednja razvojna raven funkcionalnih celičnih modelov, ki vključujejo celične kulture, so človeški mini organi ali tako imenovani organoidi (Parkhurst in Gan 2010; Herculano-Houzel 2014). Njihov razvoj je eden največjih znanstvenih napredkov v regenerativni medicini, zlasti pri vključevanju možganskih celic vanje. Tehnologija, ki je omogočila



njihov razvoj, temelji na klasičnih tridimenzionalnih tehnikah gojenja celic, ki spodbujajo avtonomne odzive matičnih celic v kulturi. Te se med rastjo organizirajo tako, da se oblikujejo v obliki, enakovredni človeškemu organom, velikosti od mikrometra do milimetra. Tehnologija organoidov je še v začetnih fazah razvoja in daleč od klinične uporabe, vendar pa pričakujemo, da bo s tem mogoče spremeniti in izboljšati način izvajanja raziskav na področju presaditev organov in zdravljenja nekaterih bolezni, tudi nevrodegenerativnih (Nedergaard idr. 2003; Giffard in Ouyang 2009). Tukaj vidimo primarni cilj na področju gojenja celic v razvoju novih tehnik njihove izolacije in eksperimentalnih celičnih modelov.

Astroцитi, pridobljeni iz induciranih pluripotentnih matičnih celic in njihov potencial v raziskavah

Astroцитi imajo pomembne funkcije v normalnih in patoloških stanjih, zato ne preseneča, da so aktivirani astroцитi prisotni pri skoraj vseh boleznih, ki prizadenejo centralno živčevje. Prav zaradi lažjega dostopa do živalskega tkiva, vzdrževanja živalskih možjanskih celic v kulturi, tehničnih in etičnih dilem in težav pri odvzemu tkiva za izolacijo primarnih človeških astroцитov in zapletenih protokolov izolacije, je bila večina dosedanjih študij opravljena na živalskih eksperimentalnih modelih. Seveda pa zaradi pomembnih razlik med astroцитi človeka in živalskih vrst v poskusih raje uporabljamo človeške astroцитe. Poleg izolacije teh celic iz različnih virov, kot je opisano v prejšnjih odstavkih, so v zadnjih letih v središču raziskav inducirane pluripotentne matične celice (iPSC). Iz njih je namreč mogoče ob upoštevanju razvojnih načel pridobiti skoraj vse vrste celic centralnega živčevja, ne le astroцитe, ampak tudi nevrone, oligodendrocite, nevronske matične celice, pericite in mikroglijo (Nedergaard idr. 2003; Giffard in Ouyang 2009; Sharif in Prevot 2012). Astroцитi, pridobljeni iz iPSC, so dragoceno orodje za raziskave, kot so razvoj novih terapevtskih strategij za degenerativna nevrološka obolenja, pojasnjevanje mehanizmov nevroloških bolezni ter preučevanje fiziologije živčnega sistema v normalnih in bolezenskih okoliščinah (Nedergaard idr. 2003; Parkhurst in Gan 2010; Sharif in Prevot 2012; Herculano-Houzel 2014).

Vir iPSC so somatske celice, ki jih je mogoče reprogramirati s transkripcijskimi dejavniki, kot so SOX2, OCT4, KLF4 in MYC. Ta tehnika transformacije je omogočila preučevanje različnih bolezni in ustvarila nov koncept raziskav, ki vključujejo tako imenovano proučevanje bolezni v posodi (angl. *disease in a dish*). To pomeni, da je mogoče oblikovanje

bolezenskih fenotipov različnih obolenj v pogojih *in vitro*, ki vključuje eksperimentalni celični model z ustrezno celično kulturo (Nedergaard idr. 2003; Sharif in Prevot 2012). Celice iPSC so pluripotentne, tako kot embrionalne matične celice. Pod ustreznimi pogoji gojenja pa jih je mogoče učinkovito razmnožiti in inducirati v vse tipe celic, ki se nahajajo v človeškem telesu. Zato predstavljajo neomejen vir za nadaljnjo diferenciacijo v druge celične tipe. Ker so reprogramirane iz človeških somatskih celic, lahko zanemarimo medvrstne razlike, ki predstavljajo raziskovalno težavo, kadar uporabljamo živalske celične modele. Celice iPSC ohranijo tudi svoje prvotne genomske značilnosti, kot so kromosomske nepravilnosti in genske mutacije, kar je velikokrat premet proučevanja. Po diferenciaciji ostanejo nedotaknjene in jih je mogoče uporabiti za razumevanje učinkov genomskih okvar na celične funkcije, kar je še posebej dragoceno pri raziskavah razvoja terapevtskih dejavnikov (Giffard in Ouyang 2009; Grupp idr. 2010; Parkhurst in Gan 2010; Chew idr. 2014; Condic idr. 2014). Glede na izsledke naše raziskave so astrociti, ki smo jih izolirali, ohranili osnovne značilnosti tudi v celični kulturi. Za eksperimente *in vitro* so torej enakovredni astroцитom, izoliranim z drugimi tehnikami, opisanimi zgoraj, s tem, da imajo nekatere prednosti. Enostaven in hiter protokol, visok odstotek pridobljenih celic ter njihova stabilnost v kulturi so ene od glavnih prednosti.

Uporaba človeških astrocitov, pridobljenih iz iPSC, pri modeliranju nevrodegenerativnih bolezni sega v leto 2012. Taki astrociti imajo tipične značilnosti normalnih, fizioloških astrocitov, ki se odzivajo na različne dražljaje. Zato so primeren eksperimentalni model za preučevanje funkcij astrocitov in njihove reaktivacije v zdravih in patoloških pogojih človeškega živčnega sistema. Tehnike diferenciacije astrocitov z uporabo človeških iPSC še zdaleč niso preproste. So dolgotrajne, zapletene in celice zahtevajo uporabo seruma, ki vsebuje dejavnike, za katere je znano, da spodbujajo diferenciacijo glije iz nevronske prekursorske celice (Kettenmann in Verkhratsky 2011; Rustenhoven idr. 2016). Zato je izolacija astrocitov iz človeških možganov še vedno zapletena, vendar privlačna raziskovalna tema in jo številni laboratoriji uporabljajo raje kot pa tehniko iz iPSC. V primerjavi z nevroni se astrociti oblikujejo v veliko poznejši fazi embrionalnega razvoja. To pomeni, da postopek diferenciacije astrocitov iz iPSC traja dlje kot diferenciacija nevronov. Poročila iz literature o času diferenciacije astrocitov iz človeških iPSC se razlikujejo in trajajo od 80 do 180 dni (Giffard in Ouyang 2009; Grupp idr. 2010; Chew idr. 2014; Condic idr. 2014).

Začetne raziskave o nevrodegenerativnih boleznih so temeljile na dvodimenzionalnih celičnih kulturah. Čeprav so omogočile pomemben vpogled v delovanje možganov na celični ravni, je bila njihova glavna omejitev ta, da niso omogočale ustrezne prostorske organizacije, rasti, razmnoževanja in povezovanja celic, ki je prisotna v možganih. Tako na primer nevroni, pridobljeni iz človeških iPSC, lahko rastejo v možganskih organoidih. To so samoorganizirani, tridimenzionalni agregati s celično raznolikostjo in citološko arhitekturo, ki so bolj podobni človeškim možganom, zato zagotavljajo bolj izpopolnjeno arhitekturo tkiva in mikrookoljske signale, kakor pa tradicionalni dvodimenzionalni celični sistemi. To pomeni, da so bolj prikladni in verodostojni za proučevanje (Giffard in Ouyang 2009; Lange idr. 2012; Chew idr. 2014; Condic idr. 2014). Patološke spremembe pri različnih nevrodegenerativnih boleznih se odražajo tudi v astrocitih, pridobljenih iz človeških iPSC. Tako astrociti, ki so pridobljeni iz iPSC, pri Alzheimerjevi bolezni v primerjavi z normalnimi, zdravimi astrociti kažejo drugačno morfologijo z manjšo kompleksnostjo in aberantno lokalizacijo celičnih označevalcev (Grupp idr. 2010; Lange idr. 2012; Herculano-Houzel 2014). Astrociti, pridobljeni iz iPSC, ki so jih izolirali od bolnikov s frontotemporalno demenco, zaradi povečanega oksidativnega stresa in sprememb v transkripcijskem profilu drugače vplivajo na delovanje nevronov (Lange idr. 2012). Tudi za proučevanje Rettovega sindroma uporabljajo nevrone in astrocite, pridobljene iz iPSC, ki jih proučujejo v trodimenzionalnih kulturnih sistemih (Grupp idr. 2010; Lange idr. 2012; Herculano-Houzel 2014).

### 3.5.7 Za konec

Primarne in sekundarne celične kulture in celične linije imajo v eksperimentalni praksi vsaka svoje dobre in slabe lastnosti, in so zato tudi namenjene različnim konceptom poskusov. Celične kulture in linije so vsekakor kljub nekaterim pomanjkljivostim veliko bolj uporabne, lažje dostopne in tudi cenejše v primerjavi poskusnimi živalmi. Potrebno pa se je zvedeti, da vseh poskusov samo na celičnih kulturah ni mogoče izvajati in se vseh rezultatov tudi ne da neposredno prenesti na poskusno žival ali človeka (Allen in Barres 2009; Grupp idr. 2010; Lange idr. 2012; Oberheim idr. 2012; Allen 2014; de Majo idr. 2020).

Primarne celične kulture astrocitov lahko izoliramo iz različnih virov, običajno so najpogostejši vir možgani glodavcev. Kljub bogati eksperimentalni paleti pa obstajajo precejšnje razlike med človeškimi in živalskimi astrociti (Allen in Barres 2009; Lange idr. 2012). Človeški astrociti so večji in strukturno bolj zapleteni, kažejo pomembne razlike v kalcijevi signalizaciji in so v stiku z veliko več sinapsami kot astrociti pri glodavcih. Poleg tega imajo ljudje in tudi nekateri primati posebne vrste astrocitov, ki jih pri glodavcih ne najdemo (Grupp idr. 2010; Lange idr. 2012; Oberheim idr. 2012; Herculano-Houzel 2014). Te razlike so glavni razlog za nadaljnji razvoj in izboljšanje metod izolacije ter spodbujanje raziskav na odraslih človeških astrocitih.

Glavna prednost človeških celic je, da bolj natančno prikazujejo okolje centralnega živčnega sistema in jih lahko zato bolj verodostojno uporabljamo za raziskave fizioloških in patofizioloških procesov človeškega centralnega živčevja in presnovnih dogajanj, ki sicer ne bi bile mogoče v pogojih *in vivo* (Kettenmann in Verkhratsky 2011; Allen 2014; Rustenhoven idr. 2016). Zato vidimo v izboljšavi izolacijskih postopkov ter v razvoju novih celičnih kultur, pridobljenih iz možganskega tkiva, poseben pomen. Kombinacije izoliranih celičnih kultur z različnimi biomateriali s ciljem regeneracije živčevja, ki so pravkar v teku razvoja, pa predstavljajo raziskovalne aktivnosti za prihodnost (Allen in Barres 2009; Lange idr. 2012; Rustenhoven idr. 2016).

## 4 ZAKLJUČEK

Glavni poudarki in novosti naše raziskave so bili:

- Vzpostavili smo nov in izboljššan protokol za obogateno kulturo primarnih astrocitov, izoliranih iz odraslih človeških možganov.
- Opisana tehnika izolacije je hitra, relativno enostavna v primerjavi z do sedaj opisanimi protokoli, in stroškovno ugodna. Omogoča izoalcijo zadostnih količin izoliranih celic, ki kažejo biokemične in fiziološke lastnosti astrocitov.
- Izolirani astroцитi so izražali ustrezne glavne celične površinske označevalce. Takšna celična kultura predstavlja pomembno novo orodje za študije v pogojih *in vitro*.

Naša opazovanja so potrdila, da je celična kultura astrocitov stabilna in hitro rastoča celična kultura, ki jo lahko uporabimo za poskuse s funkcionalnimi celičnimi modeli, kot osnovno celično kulturo s ciljem razumevanja vloge astrocitov pri različnih nevrodegenerativnih obolenjih. Predstavljen postopek izolacije odraslih astrocitov je preprost, hiter in ekonomičen. Omogoča njihovo uspešno in dolgoročno vzdrževanje v celični kulturi, nudi zadostne količine izoliranih celic, ki imajo biokemične in fiziološke lastnosti astrocitov in izražajo ustrezne glavne celične označevalce.

Menimo, da so lahko te celice primerna podlaga za eksperimentalni celični model nevrodegeneracije in tako lahko predstavljajo pomembno novo orodje za raziskave v pogojih *in vitro*. Razpoložljivost takšnega sistema bo lahko omogočila preučevanje lastnosti teh celic, njihovih biokemičnih vidikov in potenciala terapevtskih agensov za travmatska in nevrodegenerativna obolenja v dobro nadzorovanem laboratorijskem okolju.

## 5 SEZNAM LITERATURE IN VIROV

1. Abbott, Rick. 2004. History of neuroendoscopy. *Neurosurg Clin N Am* 15(1): 1-7.
2. Abbott, N. J., D. E. Dolman, S. Drndarski in S. M. Fredriksson. 2012. An improved in vitro blood-brain barrier model: rat brain endothelial cells co-cultured with astrocytes. *Methods Mol Biol* 814: 415-430.
3. Acioglu, Cigdem, Lun Li in Stella Elkabes. 2021. Contribution of astrocytes to neuropathology of neurodegenerative diseases. *Brain Res* 1758: 147291. Dostopno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33516810/> (8. april 2021).
4. Agalave, N. M., B. T. Lane in P. H. Mody. 2020. Isolation, culture, and downstream characterization of primary microglia and astrocytes from adult rodent brain and spinal cord. *J Neurosci Methods* 340: 108742. Dostopno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32315669/> (8. april 2021).
5. Alberts, Bruce, Dennis Bray, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts in Peter Walter. 1997. *Essential cell biology*. New York: Garland.
6. Allen, Nicola J. 2014. Astrocyte regulation of synaptic behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30: 439-463.
7. Allen, Nicola J. in Ben A. Barres. 2009. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature* 457(7230): 675-677.
8. Alpass, Fiona, Andy Towers, Christine Stephens, Eljon Fitzgerald, Brendan Stevenson in Judith Davey. 2007. Independence, well-being, and social participation in an aging population. *Ann N Y Acad Sci* 1114: 241-250.
9. Alunni, A. in L. Bally-Cuif. 2016. A comparative view of regenerative neurogenesis in vertebrates. *Development* 143(5): 741-753.
10. Arai, Hidenori, Yasuyoshi Ouchi, Masayuki Yokode, Hideki Ito, Hiroshi Uematsu, Fumio Eto, Shinichi Oshima, Kikuko Ota, Yasushi Saito, Hidetada Sasaki, Kazuo Tsubota, Hidenao Fukuyama, Yoshihito Honda, Akihisa Iguchi, Kenji Toba, Takayuki Hosoi in Toru

Kita. 2012. Toward the realization of a better aged society: messages from gerontology and geriatrics. *Geriatr Gerontol Int* 12(1): 16-22.

11. Araque, A., R. P. Sanzgiri, V. Parpura in P. G. Haydon. 1999. Astrocyte-induced modulation of synaptic transmission. *Can J Physiol Pharmacol* 77(9): 699-706.

12. Aronoff-Spencer, Eliah, Padideh Asgari, Tracy L. Finlayson, Joseph Gavin, Melinda Forstey, Gregory J. Norman, Ian Pierce, Carlos Ochoa, Paul Downey, Karen Becerra in Zia Agha. 2020. A comprehensive assessment for community-based, person-centered care for older adults. *BMC Geriatr* 20(1): 193. Dostopno na: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7275322/pdf/12877\\_2020\\_Article\\_1502.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7275322/pdf/12877_2020_Article_1502.pdf) (12. maj 2021).

13. Asthagiri, Ashok R., Nader Pouratian, Jonathan Sherman, Galal Ahmed in Mark E. Shaffrey. 2007. Advances in brain tumor surgery. *Neurol Clin* 25(4): 975-1003.

14. Auerbach, Ron, Nevis Akhtar, Lynn R. Lewis in Brian L. Shinnars. 2000. Angiogenesis assays: problems and pitfalls. *Cancer Metastasis Rev* 19: 167-172.

15. Azzarelli, Roberta. 2020. Organoid models of glioblastoma to study brain tumor stem cells. *Front Cell Dev Biol* 8: 1-10.

16. Barres, Ben A. 2008. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60(3): 430-440.

17. Barres, Ben A. 2014. Designing and troubleshooting immunopanning protocols for purifying neural cells. *Cold Spring Harb Protoc* 2014(12): 1342-1347.

18. Beaulieu, Jean Francois in Daniel Menard. 2012. Isolation, characterization, and culture of normal human intestinal crypt and villus cells. *Methods Mol Biol* 806: 157-173.

19. Bedner, Peter, Ronald Jabs in Christian Steinhäuser. 2019. Properties of human astrocytes and NG2 glia. *Glia* 68(4): 756-767.

20. Bellaver, B., D. G. Souza in D. O. Souza. 2017. Hippocampal astrocyte cultures from adult and aged rats reproduce changes in functionality observed in the aging brain. *Mol Neurobiol* 54: 2969-2985.

21. Bermudez-Brito, Miriam, Julio Plaza-Díaz, Luis Fontana, Sergio Muñoz-Quezada in Angel Gil. 2013. In vitro cell and tissue models for studying host-microbe interactions: a review. *Br J Nutr* 109(2): 27-34.
22. Bermudez-Brito, Miriam, Sergio Muñoz-Quezada, Carolina Gómez-Llorente, Esther Matencio, Fernando Romero in Angel Gil. 2015. Lactobacillus paracasei CNCM I-4034 and its culture supernatant modulate Salmonella-induced inflammation in a novel transwell co-culture of human intestinal-like dendritic and Caco-2 cells. *BMC Microbiol* 15(1):79.
23. Bignami, A., L. F. Eng in D. Dahl. 1972. Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res* 43: 429-435.
24. Bobilya, D. J. 2012. Isolation and cultivation of porcine astrocytes. *Methods Mol Biol* 814:127-135.
25. Borders, Candace in Seyed Ahmad Sajjadi. 2021. Diagnosis and management of cognitive concerns in the oldest-old. *Curr Treat Options Neurol* 23(3):10. Dostopno na: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7994350/pdf/11940\\_2021\\_Article\\_665.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7994350/pdf/11940_2021_Article_665.pdf) (15. maj 2021).
26. Borella, Erika, Elena Carretti, Rosana Sciore in Erica Capotosto. 2017. Training working memory in older adults: Is there an advantage of using strategies? *Psychol Aging* 32(2): 178-191.
27. Borelli, Wyllians Vendramini, Karoline Carvalho Carmona, Adalberto Studart-Neto, Ricardo Nitri, Paulo Caramelli in Jaderson Costa da Costa. 2018. Operationalized definition of older adults with high cognitive performance. *Dement Neuropsychol* 12(3): 221-227.
28. Borg, Christel, Ingalill R. Hallberg in Kerstin Blomqvist. 2006. Life satisfaction among older people (65+) with reduced self-care capacity: the relationship to social, health and financial aspects. *J Clin Nurs* 15(5): 607-618.
29. Brunnell, Bruce A., Mette Flaatt, Christine Gagliardi, Bindiya Patel in Cynthia Ripoll. 2008. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* 45(2): 115-120.



30. Budel, Leithe in Karima Djabali. 2017. Rapid isolation and expansion of skin-derived precursor cells from human primary fibroblast cultures. *Biol Open* 6(11): 1745-1755.
31. Bullard, D. E. and B. S. Nashold Jr. 1995. Evolution of principles of stereotactic neurosurgery. *Neurosurg Clin N Am* 6(1): 27-41.
32. Burns, Eileen in Shereena Nair. 2014. New horizons in care home medicine. *Age Ageing* 43(1): 2-7.
33. Calle, Alexandra, Clara Barrajon-Masa, Ernesto Gómez-Fidalgo, Mercedes Martín-Lluch, Paloma Cruz-Vigo, Raúl Sánchez-Sánchez in Miguel Ángel Ramírez. 2018. Iberian pig mesenchymal stem/stromal cells from dermal skin, abdominal and subcutaneous adipose tissues, and peripheral blood: in vitro characterization and migratory properties in inflammation. *Stem Cell Res Ther* 9(1): 178.
34. Canter, Rebecca G., Jay Penney in Li-Huei Tsai. 2016. The road to restoring neural circuits for the treatment of Alzheimer's disease. *Nature* 539(7628): 187-196.
35. Carell, Alexis. 1912. On the permanent life of tissues outside of the organisms. *J Exp Med* 15(4): 516-528.
36. Castellanos-Montiel, M. J., I. Velasco in I. Escobedo-Avila. 2021. Modeling the neuromuscular junction in vitro: an approach to study neuromuscular junction disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1488(1): 3-15.
37. Cencič, Avrelija in Tomaž Langerholc. 2010. Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology - a review. *Int J Food Microbiol* 141(1): 4-14.
38. Cervera-Crespo, Teresa in Julio González-Alvarez. 2017. Age and Semantic Inhibition Measured by the Hayling Task: A Meta-Analysis. *Arch Clin Neuropsychol* 32(2): 198-214.
39. Cesari, Matteo, Martin Prince, Jotheeswaran Amuthavalli Thiyagarajan, Islene Araujo De Carvalho, Roberto Bernabei, Piu Chan, Luis Miguel Gutierrez-Robledo, Jean-Pierre Michel, John E. Morley, Paul Ong, Leocadio Rodriguez Manas, Alan Sinclair, Chang Won Won, John Beard in Bruno Vellas. 2016. Frailty: An Emerging Public Health Priority. *J Am Med Dir Assoc* 17(3): 188-192.

40. Chaboub, Lesley S. in Benjamin Deneen. 2012. Developmental origins of astrocyte heterogeneity: the final frontier of CNS development. *Dev Neurosci* 34(5): 379-388.
41. Chan, J. S. Y., J. Wu, K. Deng in J. H. Yan. 2002. The effectiveness of dance interventions on cognition in patients with mild cognitive impairment: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Neurosci Biobehav Rev* 118: 80-88.
42. Cheng, Feon W., Xiang Gao in Gordon L. Jensen. 2015. Weight change and all-cause mortality in older adults: a meta-analysis. *J Nutr Gerontol Geriatr* 34: 343-368.
43. Chesnelong, Charles, Ian Restall in Samuel Weiss. 2019. Isolation and culture of glioblastoma brain tumor stem cells. *Methods Mol Biol* 1869: 11-21.
44. Chew, Li-Jin, Cynthia A. DeBoy in Vladimir V. Senatorov Jr. 2014. Finding degrees of separation: experimental approaches for astroglial and oligodendroglial cell isolation and genetic targeting. *J Neurosci Methods* 236: 125-147.
45. Chougule, Phil, Gentz Herlenius in Mike Hernandez. 2012. Isolation and characterization of human primary enterocytes from small intestine using a novel method. *Scand J Gastroenterol* 47(11): 1334-1343.
46. Chung, Heesung, Hyejung Jung, Eek-hoon Jho, Hinke A. B. Multhaupt, John R. Couchman in Eok-Soo Oh. 2018. Keratinocytes negatively regulate the N-cadherin levels of melanoma cells via contact-mediated calcium regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 503(2): 615-620.
47. Cieri, Filippo, Roberto Esposito, Nicoletta Cera, Valentina Pieramico, Armando Tartaro in Massimo di Giannantoni. 2017. Late-Life Depression. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 30(3): 140-150.
48. Ciric, I., N. A. Vick, M. A. Mikhael, J. Cozzens, T. Eller and A. Walsh. 1990. Aggressive surgery for malignant supratentorial gliomas. *Clin Neurosurg* 36: 375-383.
49. Commisso, Elna, Katherine S. McGilton, Ana Patricia Ayala, Melissa K. Andrew, Howard Bergman, Line Beaudet, Veronique Dubé, Mikaela Gray, Lori Hale, Margaret Keatings, Emily Gard Marshall, Janet McElhaney, Debra Morgan, Edna Parrott, Jenny Ploeg, Tara Sampalli, Douglas Stephens, Isabelle Vedel, Jennifer Walker, Walter P.

Wodchis in Martine T. E. Puts. 2017. Identifying and understanding the health and social care needs of older adults with multiple chronic conditions and their caregivers: a protocol for a scoping review. *BMJ Open* 7(12): 18247.

50. Condic, Mateja, Timo Jan Oberstein, Martin Herrmann, Mareike Carola Reimann, Johannes Kornhuber, Juan Manuel Maler in Philipp Spitzer. 2014. N-truncation and pyroglutamylation enhances the opsonizing capacity of A $\beta$ -peptides and facilitates phagocytosis by macrophages and microglia. *Brain Behav Immun* 41: 116-125.

51. Dammers, R., I. K. Haitsma, J. W. Schouten, J. M. Kros, C. J. Avezaat in A. J. Vincent. 2008. Safety and efficacy of frameless and frame-based intracranial biopsy techniques. *Acta Neurochir (Wien)* 150: 23-29.

52. Danaila, L. in M. Radoi. 2013. Surgery of tumors of the third ventricle region. *Chirurgia (Bucur)* 108(4): 456-462.

53. D'Angelo, Luca, Daniele Armocida, Luigi Sampirisi, Francesco Paglia, Luigi Valentino Berra in Antonio Santoro. 2020. Role of endoscopic surgical biopsy in diagnoses of intraventricular/periventricular tumors: review of literature including a monocentric case series. *Acta Neurol Belg* 120(3): 517-530.

54. Decq, Philippe, Henry W. S. Schroeder, Michael Fritsch in Paolo Cappabianca. 2013. A history of ventricular neuroendoscopy. *World Neurosurg* 79(2): 1-6.

55. de Majo, Martina, Mark Koontz, David Rowitch in Erik M. Ullian. 2020. An update on human astrocytes and their role in development and disease. *Glia* 68(4): 685-704.

56. Denda, Mitsuhiro in Tsustumi Moe. 2011. Roles of transient receptor potential proteins (TRPs) in epidermal keratinocytes. *Adv Exp Med Biol* 704: 847-860.

57. Denis-Donini, S., J. Glowinski in A. Prochiantz. 1984. Glial heterogeneity may define the three-dimensional shape of mouse mesencephalic dopaminergic neurones. *Nature* 307(5952): 641-643.

58. De Vreese, Michael in Jan Schrezenmeir. 2008. Probiotics, prebiotics and synbiotics. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 111: 1-66.

59. Ding, Zhi-Bin, Li-Juan Song, Qing Wang, Gajendra Kumar, Yu-Qing Yan in Cun-Gen Ma. 2021. Astrocytes: a double-edged sword in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res* 16(9): 1702-1710.
60. Dittmar, Thomas, Christa Nagler, Sarah Schwitalla, Georg Reith, Bernd Niggemann in Kurt S. Zänker. 2009. Recurrence cancer stem cells-made by cell fusion? *Med Hypotheses* 73(4): 542-547.
61. Dong, Y. in E. N. Benveniste. 2001. Immune function of astrocytes. *Glia* 36(2): 180-190.
62. Doucet, Yanne S. in David M. Owens. 2015. Isolation and functional assessment of cutaneous stem cells. *Methods Mol Biol* 1235: 147-164.
63. Douglas, Heather, Andrew Georgiou in Johanna Westbrook. 2016. Social participation as an indicator of successful aging: an overview of concepts and their associations with health. *Aust Health Rev* 41(4): 455-462.
64. Draper, S. Jonathan, Harry D. Moore, Ludmila N. Ruban, Paul J. Gokhale in Peter W. Andrews. 2004. Culture and characterization of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 13(4): 325-336.
65. Duong, Michael Tran, Ilya M. Nasrallah, David A. Wolk, Catherine C. Y. Chang in Ta-Yuan Chang. 2021. Cholesterol, atherosclerosis, and APOE in vascular contributions to cognitive impairment and dementia (VCID): Potential mechanisms and therapy. *Front Aging Neurosci* 13:647990. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8026881/pdf/fnagi-13-647990.pdf> (8. april 2021).
66. Dziechciaż, Malgorzata in Rafal Filip. 2014. Biological psychological and social determinants of old age: bio-psycho-social aspects of human aging. *Ann Agric Environ Med* 21(4): 835-838.
67. EFSA GMO Panel Working Group on Animal Feeding Trials. 2008. Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: the role of animal feeding trials. *Food Chem Toxicol* 46(1): 2-70.

68. Eng, L. F., R. S. Ghirnikar in Y. L. Lee. 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). *Neurochem Res* 25: 1439-1451.
69. Engh, Johnathan A., L. Dade Lunsford, Devin V. Amin, Pawel G. Ochalski, Juan Fernandez-Miranda, Daniel M. Prevedello in Amin B. Kassam. 2010. Stereotactically guided endoscopic port surgery for intraventricular tumor and colloid cyst resection. *Neurosurgery* 67(3): 198-205.
70. Espay, Alberto J., Francesca Morgante, Aristide Merola, Alfonso Fasano, Luca Marsili, Susan H. Fox, Erwan Bezdard, Barbara Picconi, Paolo Calabresi in Anthony E. Lang. 2018. Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson disease: current and evolving concepts. *Ann Neurol* 84(6): 797-811.
71. Fadul, C., J. Wood, H. Thaler, J. Galicich, R. H. Patterson Jr in J. B. Posner. 1988. Morbidity and mortality of craniotomy for excision of supratentorial gliomas. *Neurology* 38(9): 1374-1379.
72. Falsarella, Gláucia Regina, Livia Pimenta Renó Gasparotto, Caroline Coutinho Barcelos, Ibsen Bellini Coimbra, Maria Clara Moretto, Mauro Alexandre Pascoa, Talita C. B. Rezende Ferreira in Arlete Maria Valente Coimbra. 2015. Body composition as a frailty marker for the elderly community. *Clin Interv Aging* 10: 1661-1666.
73. Ferreira, Sofia, Ana F. Raimundo, Regina Menezes in Ivo C. Martins. 2021. Islet amyloid polypeptide & amyloid beta peptide roles in Alzheimer's disease: two triggers, one disease. *Neural Regen Res* 16(6): 1127-1130.
74. Ferrer, Isido. 2017. Diversity of astroglial responses across human neurodegenerative disorders and brain aging. *Brain Pathol* 27(5): 645-674.
75. Fong, Z. H., S. H. Tan, R. Mahendran, E. H. Kua in T. T. Chee. 2021. Arts-based interventions to improve cognition in older persons with mild cognitive impairment: A systematic review of randomized controlled trials. *Aging Ment Health* 25(9): 1605-1617.
76. Foo, Lynette C., Nicola J. Allen, Eric A. Bushong, P. Britten Ventura, Won-Suk Chung, Lu Zhou, John D. Cahoy, Richard Daneman, Hui Zong, Mark H. Ellisman in Ben A.

Barres. 2011. Development of a method for the purification and culture of rodent astrocytes. *Neuron* 71(5): 799-811.

77. Fowler, Timothy J. in John W. Scadding. 2003. *Clinical neurology*. London: Arnold.

78. Freshney, Ian R. 1972. Tumour cells disaggregated in collagenase. *Lancet* 2(7775): 488-489.

79. Freshney, R. Ian. 1978. Use of tissue culture in predictive testing of drug sensitivity. *Cancer Topics* 1: 5-7.

80. Freshney, R. Ian. 2000. *Culture of animal cells*. Toronto: Wiley-Liss.

81. Freshney, R. Ian. 2006. Culture of cells for tissue engineering. V *Basic principles of cell culture*, ur. Gordana Vunjak-Novakovic, Ian R. Freshney, 256-277. New York: John Wiley&Sons.

82. Fried, L. P., C. M. Tangen, J. Walston, A. B. Newman, C. Hirsch, J. Gottdiener, T. Seeman, R. Tracy, W. J. Kop, G. Burke, M. A. McBurnie in Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. 2001. Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56: 146-156.

83. Fries, G. in A. Pernecky. 1999. Intracranial endoscopy. *Adv Tech Stand Neurosurg* 25: 21-60.

84. Fukuda, Yoshiharu, Midori Ishikawa, Tetsuji Yokoyama, Tatsumi Hayashi, Tomoki Nakaya, Yukari Takemi, Kaoru Kusama, Nobuo Yoshiike, Miho Nozue, Kaori Yoshida in Nobuko Murayama. 2017. Physical and social determinants of dietary variety among older adults living alone in Japan. *Geriatr Gerontol Int* 17(11): 2232-2238.

85. Garcia-Abreu, J., V. Moura Neto, S. L. Carvalho in L. A. Cavalcante. 1995. Regionally specific properties of midbrain glia: I. Interactions with midbrain neurons. *J Neurosci Res* 40(4): 471-477.

86. Gerbe, Francios, Catherine Legraverend in Philippe Jay. 2012. The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cell Mol Life Sci* 69(17): 2907-2917.

87. Geser, F., L. Fellner, J. Haybaeck in G. K. Wenning. 2020. Development of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis: from up or down? *J Neural Transm (Vienna)* 127(8): 1097-1105.
88. Giffard, G. Rona in Yi-Bing Ouyang. 2009. Cell culture: primary neural cells. V *Encyclopedia of neuroscience*, ur. Larry R. Squire, 633-637. Cambridge: Academic Press.
89. Gildenberg, Philip L. in Jeffrey Labuz. 2006. Use of a volumetric target for image-guided surgery. *Neurosurgery* 59(3): 651-659.
90. Gildenberg, Philip L. 2013. The birth of human stereotactic surgery. *Acta Neurochir Suppl* 117: 1-4.
91. Gitler, Aaron D., Paraminder Dhillon in James Shorter. 2017. Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope. *Dis Model Mech* 10(5): 499-502.
92. Gleib, Dana A., France Meslé in Jacques Vallin. 2010. Diverging trends in life expectancy at age 50: a look at causes of death. V *International differences in mortality at older ages: dimensions and sources*, ur. Eileen M. Crimmins, Samuel H. Preston in Barney Cohen, 17-48. Washington: National Academies.
93. Goldman, Steven A. in Nicholas J. Kuypers. 2015. How to make an oligodendrocyte. *Development* 142(23): 3983-3995.
94. Goriup, Jana in Danijela Lahe. 2018. *Poglavja iz socialne gerontologije*. Maribor: AMEU – ECM, Alma Mater Press.
95. Gouras, K. Gunnar. 2005. Molecular pathology of dementia. V *Principles of molecular neurosurgery*, ur. Dade L. Lunsford, 258-269. Basel: Karger.
96. Gradišnik, Lidija. 2014. *Izolacija človeške črevesne epiteljske celične linije HUIEC*. Maribor: Izobraževalni center Piramida.
97. Gradišnik, Lidija. 2017. *Dejavniki tveganja v povezavi s pomanjkanjem vitamina D pri starejših*. Maribor: Alma Mater Europaea.

98. Gradišnik, Lidija in Tomaž Velnar. 2017. *Kako se pogovoriti s starejšim pacientom? Priročnik o komunikaciji za zdravstveno osebje*. Maribor: Alma Mater Europaea.
99. Gradišnik, Lidija. 2019. *Učinki termalne vode na zdravje kože in počutje starejših*. Maribor: Alma Mater Europaea.
100. Gradišnik, Lidija, Uroš Maver, Roman Bošnjak in Tomaž Velnar. 2020. Optimised isolation and characterisation of adult human astrocytes from neurotrauma patients. *J Neurosci Methods* 341: 108796. Dostopno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32450111/> (12. maj 2021).
101. Gradišnik, Lidija. 2021. Celična sestava živčevja. V *Izbrana poglavja iz nevrokirurgije*, ur. Tomaž Velnar in Nataša Kos, 19-22. Maribor: Alma Mater Europaea.
102. Granier, Audrey, Oliver Goulet in Cyrille Hoarau. 2013. Fermentation products: immunological effects on human and animal models. *Pediatr Res* 74(2): 238-244.
103. Greenfield, Jeffrey P., William S. Cobb, A. John Tsouris in Theodore H. Schwartz. 2008. Stereotactic minimally invasive tubular retractor system for deep brain lesions. *Neurosurgery* 63(4): 334-340.
104. Grupp, L., H. Wolburg in A. F. Mack. 2010. Astroglial structures in the zebrafish brain. *J Comp Neurol* 518: 4277-4287.
105. Guyton, Arthur Clifton in John E. Hall. 2006a. Textbook of medical physiology. *The nervous system: A. General principles and sensory physiology*. Philadelpiha: Elsevier.
106. Guyton, Arthur Clifton in John E. Hall. 2006b. Textbook of medical physiology. *The nervous system: C. Motor and integrative neurophysiology*. Philadelpiha: Elsevier.
107. Hall, W. A. 1998. The safety and efficacy of stereotactic biopsy for intracranial lesions. *Cancer* 82(9): 1749-1755.
108. Hanson, A. Mike, Cecil Cooper, Anne Aihie Sayer in Jon R. Eendebak. 2016. Developmental aspects of a life course approach to healthy ageing. *J Physiol* 594(8): 2147-2160.



109. Hansson, E. 1988. Astroglia from defined brain regions as studied with primary cultures. *Prog Neurobio* 130: 369-397.
110. Harris, Anthony E., Costas G. Hadjipanayis, L. Dade Lunsford, Andrew K. Lunsford in Amin B. Kassam. 2005. Microsurgical removal of intraventricular lesions using endoscopic visualization and stereotactic guidance. *Neurosurgery* 56(1): 125-132.
111. Harrison, Ross G. 1907. Observations on the living developing nerve fiber. *Proc Soc Exp Biol Med* 4: 140-143.
112. Hata, Yokuri in Kana Nakajima. 2000. Life-style and serum lipids and lipoproteins. *J Atheroscler Thromb* 7(4): 177-197.
113. Heilbrun, M. P., P. McDonald, C. Wiker, S. Koehler in W. Peters. 1992. Stereotactic localization and guidance using a machine vision technique. *Stereotact Funct Neurosurg* 58(1-4): 94-98.
114. Herculano-Houzel, S. 2014. The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia* 62: 1377-1391.
115. Hojat, Amin, Bowen Wei, Madeline G. Olson, Qinwen Mao in William H. Yong. 2019. Procurement and storage of surgical biospecimens. *Methods Mol Biol* 1897: 65-76.
116. Holick, F. Michael. 2007. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 357(3): 266-281.
117. Hurd, Michael D., Paco Martorell, Adeline Delavande, Kathleen J. Mullen in Kenneth M. Langa. 2013. Monetary costs of dementia in the United States. *N Engl J Med* 368: 1326-1334.
118. Huse, Paul A., Ganesh Rao in William Couldwell. 2005. Contemporary applications of functional and stereotactic technique for molecular neurosurgery. *V Principles of molecular neurosurgery*, ur. Dade L. Lunsford, 124-145. Basel: Karger.
119. Iacoangeli, Maurizio, Niccolò Nocchi, Davide Nasi, Alessandro D. I. Rienzo, Mauro Dobran, Maurizio Gladi, Roberto Colasanti, Lorenzo Alvaro, Gabriele Polonara

in Massimo Scerrati. 2016. Minimally invasive supraorbital key-hole approach for the treatment of anterior cranial fossa meningiomas. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 56(4): 180-185.

120. Izrael, Michal, Shalom Guy Slutsky in Michel Revel. 2020. Rising Stars: Astrocytes as a therapeutic target for ALS disease. *Front Neurosci* 14: 824. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7399224/pdf/fnins-14-00824.pdf> (10. april 2021).

121. Jack, Clifford R. Jr., Heather J. Wiste, Stephen D. Weigand, David S. Knopman, Prashanthi Vemuri, Michelle M. Mielke, Val Lowe, Matthew L. Senjem, Jeffrey L. Gunter, Mary M. Machulda, Brian E. Gregg, V. Shane Pankratz, Walter A. Rocca in Ronald C. Petersen. 2015. Age, sex, and APOE $\epsilon$ 4 effects on memory, brain structure, and beta-amyloid across the adult life span. *JAMA Neurol* 72: 511-519.

122. Jakovcevski, Igor, Radmila Filipovic, Zhicheng Mo, Sonja Rakic in Nada Zecevic. 2009. Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain. *Front Neuroanat* 3: 1-15.

123. Jo, Sungyang, Seon-Ok Kim, Kye Won Park, Seung Hyun Lee, Yun Su Hwang in Sun Ju Chung. 2021. The role of APOE in cognitive trajectories and motor decline in Parkinson's disease. *Sci Rep* 11(1): 7819. Dostopno na: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8035327/pdf/41598\\_2021\\_Article\\_86483.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8035327/pdf/41598_2021_Article_86483.pdf) (8. april 2021).

124. Johansen, Claus. 2017. Generation and Culturing of Primary Human Keratinocytes from Adult Skin. *J Vis Exp* 130. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Johansen%2C+Claus.+2017.+Generation+and+Culturing+of+Primary+Human+Keratinocytes+from+Adult+Skin.+J+Vis+Exp> (12. september 2021).

125. John, Gareth R. 2012. Investigation of astrocyte - oligodendrocyte interactions in human cultures. *Methods Mol Biol* 814: 401-414.

126. Jungblut, M. M. C. Tiveron in S. Barral. 2012. Isolation and characterization of living primary astroglial cells using the new GLAST-specific monoclonal antibody ACSA-1. *Glia* 60: 894-907.

127. Karasek, A. Marvin. 1983. Culture of human keratinocytes in liquid medium. *J Invest Dermatol* 81(1 Suppl): 24-28.
128. Karp, Freddie. 2008. *A clinician's handbook: Talking with your older patient*. Bethesda: NIA, NIH.
129. Kassam, Amin B., Johnathan A. Engh, Arlan H. Mintz in Daniel M. Prevedello. 2009. Completely endoscopic resection of intraparenchymal brain tumors. *J Neurosurg* 110(1): 116-123.
130. Keller, Jason M. in Monica Frega. 2019. Past, Present, and Future of Neuronal Models In Vitro. *Adv Neurobiol* 22: 3-17.
131. Kepes, J. J. 1994. Pitfalls and problems in the histopathologic evaluation of stereotactic needle biopsy specimens. *Neurosurg Clin N Am* 5(1): 19-33.
132. Kettenmann, H. in A. Verkhratsky. 2011. Neuroglia-living nerve glue. *Fortschr Neurol Psychiatr* 79(10): 588-597.
133. Khakh, Baljit S. in Michael V. Sofroniew. 2015. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nat Neurosci* 18(7): 942-952.
134. Kilic, Ayşe, Hakan Kalender, Hatice Eroksuz, Adile Muz in Bülent Tasdemir. 2013. Identification by culture, PCR, and immunohistochemistry of mycoplasmas and their molecular typing in sheep and lamb lungs with pneumonia in Eastern Turkey. *Trop Anim Health Prod* 45(7): 1525-1531.
135. Kim, H. J. in J. Magrané J. 2011. Isolation and culture of neurons and astrocytes from the mouse brain cortex. *Methods Mol Biol* 793: 63-75.
136. Kimelberg, Harold K., Gary P. Schools, Zhaohui Cai in Min Zhou. 2000. Freshly isolated astrocyte (FIA) preparations: a useful single cell system for studying astrocyte properties. *J Neurosci Res* 61: 577-587.
137. Kimelberg, Harold K. 2004. The problem of astrocyte identity. *Neurochem Int* 45(2-3): 191-202.

138. Kitamura, K., K. Umehara, R. Ito, Y. Yamaura, T. Komori, H. Morio, H. Akita in T. Furihata. 2021. Development, Characterization and Potential Applications of a Multicellular Spheroidal Human Blood-Brain Barrier Model Integrating Three Conditionally Immortalized Cell Lines. *Biol Pharm Bull* 44(7): 984-991.
139. Knowlton, Stephanie, Shivesh Anand, Twisha Shah in Savas Tasoglu. 2018. Bioprinting for neural tissue engineering. *Trends Neurosci* 41(1): 31-46.
140. Ko, E., M. L. S. Poon, E. Park, Y. Cho in J. H. Shin. 2021. Engineering 3D Cortical Spheroids for an In Vitro Ischemic Stroke Model. *ACS Biomater Sci Eng* 7(8): 3845-3860.
141. Kobayashi, Jun, Akihiko Kikuchi, Takao Aoyagi in Teruo Okano. 2019. Cell sheet tissue engineering: Cell sheet preparation, harvesting/manipulation, and transplantation. *J Biomed Mater Res A* 107(5): 955-967.
142. Kumarasamy, M. in A. Sosnik. 2021. Heterocellular spheroids of the neurovascular blood-brain barrier as a platform for personalized nanoneuromedicine. *iScience* 24(3): 102183.
143. Kvint, Svetlana, Alexis Gutierrez, Rachel Blue in Dmitriy Petrov. 2020. Surgical management of trauma-related intracranial haemorrhage - a review. *Curr Neurol Neurosci Rep* 20(12): 63.
144. Kwon, Hyuk Sung in Seong-Ho Koh. 2020. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener* 9(1): 42. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7689983/> (27. april 2021).
145. Lacroix, M., D. Abi-Said, D. R. Fournay, Z. L. Gokaslan, W. Shi, F. DeMonte, F. F. Lang, I. E. McCutcheon, S. J. Hassenbusch, E. Holland, K. Hess, C. Michael, D. Miller in R. Sawaya. 2001. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 95(2): 190-198.
146. Landau, Marina. 2007. Exogenous factors in skin aging. *Curr Probl Dermatol* 35: 1-13.
147. Lange, Sofie C. in Lasse K. Bak. 2012. Primary cultures of astrocytes: Their value in understanding astrocytes in health and disease. *Neurochem Res* 37: 2569-2588.

148. Lawson, L. J., V. H. Perry, P. Dri in S. Gordon. 1990. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39: 151-170.
149. Lee, Munjae, Kichan Yoon in Kyu-Sung Lee. 2018. Subjective health status of multimorbidity: verifying the mediating effects of medical and assistive devices. *Int J Equity Health* 17(1): 164.
150. Lee, S. C., W. Liu in C. F. Brosnan. 1992. Characterization of primary human fetal dissociated central nervous system cultures with an emphasis on microglia. *Lab Invest* 67: 465-476.
151. Lee, Seok-Geun, Zhao-Zhong Su, Luni Emdad, Pankaj Gupta, Devanand Sarkar, Alejandra Borjabad, David J. Volsky in Paul B. Fisher. 2008. Mechanism of ceftriaxone induction of excitatory amino acid transporter-2 expression and glutamate uptake in primary human astrocytes. *J Biol Chem* 283(19): 13116-13123.
152. Lee, Y., B. M. Morrison, Y. Li, S. Lengacher, M. H. Farah, P. N. Hoffman, Y. Liu, A. Tsingalia, L. Jin, P. W. Zhang, L. Pellerin, P. J. Magistretti in J. D. Rothstein. 2012. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 487(7408): 443-448.
153. Legdeur, Nienke, Tarik Binnekade, Rene H. J. Otten, Marc Badissi, Philip Scheltens, Pietr Jelle Visser in Andrea Maier. 2017. Cognitive functioning of individuals aged 90 years and older without dementia: A systematic review. *Ageing Res Rev* 36: 42-49.
154. Levine, J. M. 1989. Neuronal influences on glial progenitor cell development. *Neuron* 3:103-113.
155. Li, Kunyu, Kiatong Li, Jialin Zheng in Song Qin. 2019. Reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Aging Dis* 10(3): 664-675.
156. Li, Y., Y. Dong, Y. Ran, Y. Zhang, B. Wu, J. Xie, Y. Cao, M. Mo, S. Li, H. Deng, W. Hao, S. Yu in Y. Wu. 2021. Three-dimensional cultured mesenchymal stem cells enhance repair of ischemic stroke through inhibition of microglia. *Stem Cell Res Ther* 12(1): 358.

157. Li, Zhong, Shiqi Xiang, Eileen N. Li, Madalyn R. Fritch, Peter G. Alexander, Hang Lin in Rocky S. Tuan. 2021. Tissue engineering for musculoskeletal regeneration and disease modeling. *Handb Exp Pharmacol* 265: 235-268.
158. Liu, Y. in W. Deng. 2016. Reverse engineering human neurodegenerative disease using pluripotent stem cell technology. *Brain Res* 1638(Pt A): 30-41.
159. Liu, Zhenan, Jie Wen, Xue Leng, Qian Zhou, Changkuo Zhou, Huaqiang Zhao in Xunwei Wu. 2018. A Simplified and Efficient Method to Isolate Primary Human Keratinocytes from Adult Skin Tissue. *J Vis Exp* 138. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Liu+Zhenan%2C+Jie+Wen%2C+Xue+Leng%2C+Qian+Zhou%2C+Changkuo+Zhou%2C+Huaqiang+Zhao+in+Xunwei+Wu.+2018.+A+Simplified+and+Efficient+Method+to+Isolate+Primary+Human+Keratinocytes+from+Adult+Skin+Tissue.+J+Vis+Exp> (12. september 2021).
160. Luo, Meng Sha in Lydia W. Li. 2020. Are Self-perceptions of aging associated with health trajectories among middle-aged and older adults? *Gerontologist* 60(5): 841-850.
161. Lynch, Marina A. 2009. The multifaceted profile of activated microglia. *Mol Neurobiol* 40:139-156.
162. Maciunas, R. J., R. L. Galloway Jr, J. Latimer, C. Cobb, E. Zaccharias, A. Moore in V. R. Mandava. 1992. An independent application accuracy evaluation of stereotactic frame systems. *Stereotact Funct Neurosurgery* 58(1-4): 103-107.
163. Maciunas, R. J., R. L. Galloway Jr in J. W. Latimer. 1994. The application accuracy of stereotactic frames. *Neurosurgery* 35(4): 682-695.
164. Margetis, Konstantinos in Mark M. Souweidane. 2013. Endoscopic treatment of intraventricular cystic tumors. *World Neurosurg* 79(2): 1-11.
165. Mata, Rui in Bettina von Helversen. 2015. Search and the Aging Mind: The Promise and Limits of the Cognitive Control Hypothesis of Age Differences in Search. *Top Cogn Sci* 7(3): 416-427.
166. Mather, Jannie Powel. 2012. In vitro models. *Stem Cells* 30(2): 95-99.

167. Mathers, Colin D., Gretchen A. Stevens, Ties Boerma, Richard A. White in Martin I. Tobias. 2015. Causes of international increases in older age life expectancy. *Lancet* 385(9967): 540-548.
168. Maurice, John. 2016. WHO puts healthy ageing on the front burner. *Lancet* 387(10014): 109-110.
169. McGilton, S. Katherine, Shirin Vellani, Lily Yeung, Jawad Chishtie, Elana Commisso, Jenny Ploeg, Melissa K. Andrew, Ana Patricia Ayala, Mikaela Gray, Debra Morgan, Amanda Froehlich Chow, Edna Parrott, Doug Stephens, Lori Hale, Margaret Keatings, Jennifer Walker, Walter P. Wodchis, Veronique Dubé, Janet McElhaney in Martine Puts. 2018. Identifying and understanding the health and social care needs of older adults with multiple chronic conditions and their caregivers: a scoping review. *BMC Geriatr* 18(1): 231.
170. McKercher, S. R., B. E. Torbett, K. L. Anderson, G. W. Henkel, D. J. Vestal, H. Baribault, M. Klemsz, A. J. Feeney, G. E. Wu in C. J. Page. 1996. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J* 15: 5647-5658.
171. Mehta, R. I. in J. A. Schneider. 2021. What is 'Alzheimer's disease'? The neuropathological heterogeneity of clinically defined Alzheimer's dementia. *Curr Opin Neurol* 34(2): 237-245.
172. Middeldorp, J. in E. M. Hol. 2011. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol* 93: 421-443.
173. Miller, J. D. 1986. Minor, moderate and severe head injury. *Neurosurg Rev* 9(1-2): 135-139.
174. Minchev, G., G. Kronreif in W. Ptacek. 2019. A novel robot-guided minimally invasive technique for brain tumor biopsies. *J Neurosurg* 18: 1-9.
175. Mizee, M. R., S. S. Miedema in M. Poel. 2017. Isolation of primary microglia from the human post-mortem brain: effects of ante- and post-mortem variables. *Acta Neuropathol Commun* 5: 16.

176. Monier, A., H. Adle-Biassette, A. L. Delezoide, P. Evrard, P. Gressens in C. Verney. 2007. Entry and distribution of microglial cells in human embryonic and fetal cerebral cortex. *J Neuropathol Exp Neurol* 66: 372-382.
177. Montgomery, D. L. 1994. Astrocytes: form, functions, and roles in disease. *Vet Pathol* 31: 145-167.
178. Morga, E., C. Faber in P. Heuschling. 1999. Regional heterogeneity of the astroglial immunoreactive phenotype: effect of lipopolysaccharide. *J Neurosci Res* 57: 941-952.
179. Nakagawa, Takao in Joan P. Schwartz. 2004. Gene expression patterns in in vivo normal adult astrocytes compared with cultured neonatal and normal adult astrocytes. *Neurochem Int* 45(2-3): 203-242.
180. Nashold, B. S. Jr. 1970. Stereotactic neurosurgery: the present and future. *Am Surg* 36(2): 91-93.
181. Nedergaard, M., B. Ransom in S. A. Goldman. 2003. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26(10): 523-530.
182. Nieuwenhuys, R., J. Voogd in C. van Huijzen. 2008. *The human central nervous system*. Heidelberg: Springer.
183. Nimmerjahn, Axel. 2009. Astrocytes going live: advances and challenges. *J Physiol* 587: 1639-1647.
184. Nimmerjahn, A. in D. E. Bergles. 2015. Large-scale recording of astrocyte activity. *Curr Opin Neurobiol* 32: 95-106.
185. Novak Kožuh, Mateja. 2006. Projekt starejši za višjo kakovost življenja doma. V *Starejši za starejše*, ur. Darja Cibic in Irena Drenik, 82-97. Ljubljana: Ministrstvo za zdravje.
186. Ntetsika, Theodora, Paraskevi-Evita Papatoma in Ioanna Markaki. 2021. Novel targeted therapies for Parkinson's disease. *Mol Med* 27(1): 17. Dostopno na: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7905684/pdf/10020\\_2021\\_Article\\_279.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7905684/pdf/10020_2021_Article_279.pdf) (8. april 2021).



187. Oberheim, Nancy Ann, Takahiro Takano, Xiaoning Han, Wei He, Jane H. C. Lin, Fushun Wang, Qiwu Xu, Jeffrey D. Wyatt, Webster Pilcher, Jeffrey G. Ojemann, Bruce R. Ransom, Steven A. Goldman in Maiken Nedergaard. 2009. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci* 29(10): 3276-3287.
188. Oberheim, N. A., S. A. Goldman in M. Nedergaard. 2012. Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol Biol* 814: 23-45.
189. Obinata, Masuo. 2007. The immortalized cell lines with differentiation potentials: their establishment and possible application. *Cancer Sci* 98(3): 275-283.
190. Ogura, K., E. Tachibana, C. Aoshima in M. Sumitomo. 2006. New microsurgical technique for intraparenchymal lesions of the brain: transcylinder approach. *Acta Neurochir (Wien)* 148(7): 779-785.
191. Okuno, H. in H. Okano. 2021. Modeling human congenital disorders with neural crest developmental defects using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Regen Ther* 18: 275-280.
192. Onyango, Isaac G., James P. Bennett in Gorazd B. Stokin. 2021. Regulation of neuronal bioenergetics as a therapeutic strategy in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res* 16(8):1467-1482.
193. Osakwe, Zainab Totah, Elaine Larson, Mansi Agrawal in Jinjing Shang. 2017. Assessment of Activity of Daily Living Among Older Adult Patients in Home Healthcare and Skilled Nursing Facilities: An Integrative Review. *Home Healthc Now* 35(5): 258-267.
194. Panza, Francesco, Davide Seripa, Vincenzo Solfrizzi, Rosanna Tortelli, Antonio Greco, Alberto Pilotto in Giancarlo Logroscino. 2015. Targeting cognitive frailty: Clinical and neurobiological roadmap for a single complex phenotype. *J Alzheimers Dis* 47(4): 793-813.
195. Panza, Francesco, Madia Lozupone, Vincenzo Solfrizzi, Rodolfo Sardone, Vittorio Dibello, Luca Di Lena, Francesca D'Urso, Roberta Stallone, Massimo Petrucci, Gianluigi Giannelli, Nicola Quaranta, Antonello Bellomo, Antonio Greco, Antonio Daniele, Davide Seripa in Giancarlo Logroscino. 2018. Different cognitive frailty models and health and

cognitive-related outcomes in older age: From epidemiology to prevention. *J Alzheimers Dis* 62(3): 993-1012.

196. Park, Jeong-Ran, Eunjeong Kim, Jungwon Yang, Hanbyeol Lee, Seok-Ho Hong, Heung-Myong Woo, Sung-Min Park, Sunghun Na in Se-Ran Yang. 2015. Isolation of human dermis derived mesenchymal stem cells using explants culture method: expansion and phenotypical characterization. *Cell Tissue Bank* 16(2): 209-218.

197. Parker Struckhoff, A. in L. Del Valle. 2021. Neurospheres and Glial Cell Cultures; from Plating to Cell Phenotyping. *Methods Mol Biol* 2311: 131-145.

198. Parkhurst, C. N. in W. B. Gan. 2010. Microglia dynamics and function in the CNS. *Curr Opin Neurobiol* 20(5): 595-600.

199. Partridge, Linda, Joris Deelen in P. Eline Slagboom. 2018. Facing up to the global challenges of ageing. *Nature* 561(7721): 45-56.

200. Pennlund, Anna, Asgeir S. Jakola, Thomas Skoglund in Johan Ljungqvist. 2021. A single-centre study of frame-based stereotactic brain biopsies. *Br J Neurosurg* 1-4. Dostopno na: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02688697.2020.1867704> (2. maj 2021).

201. Perneczky, A. in G. Fries. 1998. Endoscope-assisted brain surgery: part 1-evolution, basic concept, and current technique. *Neurosurgery* 42(2): 219-225.

202. Plunkett, R., R. R. Allison in W. Grand. 1999. Stereotactic neurosurgical biopsy is an underutilized modality. *Neurosurg Rev* 22(2-3): 117-120.

203. Qian, Hua, Xue Leng, Jie Wen, Qian Zhou, Xin Xu in Xunwei Wu. 2019. One-Step Simple Isolation Method to Obtain Both Epidermal and Dermal Stem Cells from Human Skin Specimen. *Methods Mol Biol* 1879: 139-148.

204. Qian, L. in J. Tcw. 2021. Human iPSC-Based Modeling of Central Nerve System Disorders for Drug Discovery. *Int J Mol Sci* 22(3): 1203.

205. Raffa, P., M. Easler in A. Urciuolo. 2022. Three-dimensional *in vitro* models of neuromuscular tissue. *Neural Regen Res* 17(4): 759-766.

206. Ransohoff, Richard M. in V. Hugh Perry. 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27: 119-145.
207. Rea, P. 2015. *Essential Clinical Anatomy of the Nervous System*. Oxford: Academic Press.
208. Recinos, Pablo F., Shaan M. Raza, George I. Jallo in Violette Renard Recinos. 2011. Use of a minimally invasive tubular retraction system for deep-seated tumors in pediatric patients. *J Neurosurg Pediatr* 7(5): 516-521.
209. Reid, J. K., in H. F. Kuipers. 2021. She Doesn't Even Go Here: The Role of Inflammatory Astrocytes in CNS Disorders. *Front Cell Neurosci* 15: 704884.
210. Reinders, Ilse, Vosser Marjolein in Laura Schaap. 2017. Body weight and body composition in old age and their relationship with frailty. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 20(1): 11-15.
211. Reisch, Robert, Axel Pernecky in Ronald Filippi. 2003. Surgical technique of the supraorbital key-hole craniotomy. *Surg Neurol* 59(3): 223-227.
212. Reisch, R., A. Stadie, R. Kockro, I. Gawish, E. Schwandt in N. Hopf. 2009. The minimally invasive supraorbital subfrontal key-hole approach for surgical treatment of temporomesial lesions of the dominant hemisphere. *Minim Invasive Neurosurg* 52(4): 163-169.
213. Renfrow, Jaclyn J., Roy E. Strowd, Adrian W. Laxton, Stephen B. Tatter, Carol P. Geer in Glenn J. Lesser. 2017. Surgical considerations in the optimal management of patients with malignant brain tumors. *Curr Treat Options Oncol* 18(8): 46.
214. Rinaldi, Federica in Maeve A. Caldwell. 2013. Modeling astrocytic contribution toward neurodegeneration with pluripotent stem cells: focus on Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neuroreport* 24(18): 1053-1057.
215. Rizzoli, Romeo, Jane Branco, Mario L. Brandi, Silvia Boonen in Oscar Bruyère. 2014. Management of osteoporosis of the oldest old. *Osteoporos Int* 25(11): 2507-2529.

216. Robbins, Timothy David, Sarah N. Lim Choi Keung in Theodoros N. Arvanitis. 2018. E-health for active ageing: A systematic review. *Maturitas* 114: 34-40.
217. Robertson, E. Elizabeth in Manson N. Browne. 1953. Review of mental illness in the older age group. *Br Med J* 2(4845): 1076-1079.
218. Rogic, Anita, Francois Auger in Mihaela Skobe. 2018. Isolation of Human Skin Lymphatic Endothelial Cells and 3D Reconstruction of the Lymphatic Vasculature In Vitro. *Methods Mol Biol* 1846: 279-290.
219. Romano, A., S. Chibbaro, O. Makiese, M. Marsella, P. Mainini in E. Benericetti. 2009. Endoscopic removal of a central neurocytoma from the posterior third ventricle. *J Clin Neurosci* 16(2): 312-316.
220. Rosenorn, J. in N. H. Diemer. 1982. Reduction of regional cerebral blood flow during brain retraction pressure in the rat. *J Neurosurg* 56(6): 826-829.
221. Rotty, J. D., C. Wu in E. M. Haynes. 2015. Profilin-1 serves as a gatekeeper for actin assembly by Arp2/3-dependent and independent pathways. *Dev Cell* 32: 54-67.
222. Rustenhoven, Justin, Thomas I. H. Park, Patrick Schweder, John Scotter, Jason Correia, Amy M. Smith, Hannah M. Gibbons, Robyn L. Oldfield, Peter S. Bergin, Edward W. Mee, Richard L. M. Faull, Maurice A. Curtis, E. Scott Graham in Mike Dragunow. 2016. Isolation of highly enriched primary human microglia for functional studies. *Sci Rep* 6: 19371. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4725991/pdf/srep19371.pdf> (2. februar 2021).
223. Sanyz, Yolanda in Giada De Palma. 2009. Gut microbiota and probiotics in modulation of epithelium and gut-associated lymphoid tissue function. *Int Rev Immunol* 28(6): 397-413.
224. Sarkar, Sukanya in Subhas C. Biswas. 2021. Astrocyte subtype-specific approach to Alzheimer's disease treatment. *Neurochem Int* 145: 104956. Dostopno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0197018621000024?via%3Dihub> (8. april 2021).
225. Sarthy, V. 2007. Focus on molecules: glial fibrillary acidic protein (GFAP). *Exp Eye Res* 84: 381-382.

226. Sauer, M. Igor. 2015. Tissue engineered grafts - 160 years after R. Virchow's Omnis Cellula e Cellula. *Transplantation* 99(3): 462-463.
227. Schaller, C., B. Meyer, D. van Roost in J. Schramm. 1997. Image guided microsurgery with a semifreehand neuronavigational device. *Comput Aided Surg* 2(3-4): 162-171.
228. Scheltens, Philip, Kaj Blennow, Monique M. B. Breteler, Bart de Strooper, Giovanni B. Frisoni, Stephen Salloway in Wiesje Maria Van der Flier. 2016. Alzheimer's disease. *Lancet* 388(10043): 505-517.
229. Scheltens, Philip, Bart De Strooper, Miia Kivipelto, Henne Holstege, Gael Chételat, Charlotte E. Teunissen, Jeffrey Cummings in Wiesje M. van der Flier. 2021. Alzheimer's disease. *Lancet* S0140-6736(20)32205-4. Dostopno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33667416/> (10. april 2021).
230. Schmidt, Laurie, Gwen Rempel, Terra C. Murray, Tara-Leigh McHugh in Jeff K. Vallance. 2016. Exploring beliefs around physical activity among older adults in rural Canada. *Int J Qual Stud Health Well-being* 9(11): 32914.
231. Searle, Samuel D. in Kenneth Rockwood. 2015. Frailty and the risk of cognitive impairment. *Alzheimers Res Ther* 7(1): 54. Dostopno na: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4523015/pdf/13195\\_2015\\_Article\\_140.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4523015/pdf/13195_2015_Article_140.pdf) (5. april 2021).
232. Shams, Shahzad, Rizwan Masood Butt in Afaq Sarwar. 1996. Stereotactic biopsy of brain tumours. *J Pak Med Assoc* 46(8): 176-178.
233. Shandra, Oleksii in Stefanie Robel. 2019. Imaging and manipulating astrocyte function in vivo in the context of CNS injury. *Methods Mol Biol* 1938: 233-246.
234. Sharif, A., V. Prévot, F. Renault-Mihara, C. Allet, J. M. Studler, B. Canton, H. Chneiweiss in M. P. Junier. 2006. Transforming growth factor alpha acts as a gliatrophin for mouse and human astrocytes. *Oncogene* 25(29): 4076-4085.
235. Sharif, Ariane in Vincent Prevot. 2012. Isolation and culture of human astrocytes. *Methods Mol Biol* 814: 137-151.

236. Sharma, Mrinalini, Khageswar Sahu, Surya Prakash Singh in Beena Jain. 2018. Wound healing activity of curcumin conjugated to hyaluronic acid: in vitro and in vivo evaluation. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 46(5): 1009-1017.
237. Sofroniew, Michael V. 2005. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist* 11(5): 400-407.
238. Sofroniew, Michael V. in Harry V. Vinters. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119: 7-35.
239. Stachura, Krzysztof, Ewelina Grzywna, Roger M. Krzyżewski, Borys M. Kwinta, Dariusz Adamek in Marek M. Moskała. 2019. Endoscopic biopsy of intra - and paraventricular brain tumors. *Wideochir Inne Tech Maloinwazyjne* 14(1): 107-113.
240. Strauss-Blasche, Greitz, Cargli Ekmekcioglu, Nitshe Klammer in Werner Marktl. 2000. The change of well-being associated with spa therapy. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd* 7(6): 269-274.
241. Strauss-Blasche, Greitz, Cargli Ekmekcioglu, Gunze Vacariu, Hal Melchart, Victor Fialka-Moser in Werner Marktl. 2002. Contribution of individual spa therapies in the treatment of chronic pain. *Clin J Pain* 18(5): 302-309.
242. Sudhakar, Vivek in R. Mark Richardson. 2019. Gene therapy for neurodegenerative diseases. *Neurotherapeutics* 16(1): 166-175.
243. Širca, Anton. 2020. *Anatomija: skripta za študente medicine. Del 2, Živčevje in čutila*. Ljubljana: Medicinska fakulteta.
244. Tatter, S. B. 1999. Neurosurgical management of brain tumors. *Neuroimaging Clin N Am* 9(4): 779-799.
245. Tatter, S. B. 2001. Neurosurgical management of low- and intermediate-grade gliomas. *Semin Radiat Oncol* 11(2): 113-123.
246. Temple, S. in A. Alvarez-Buylla. 1999. Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 9(1): 135-141.

247. Teo, Charles. 2000. Endoscopic-assisted tumor and neurovascular procedures. *Clin Neurosurg* 46: 515-525.
248. Teo, Charles. 2010. The concept of minimally invasive neurosurgery. *Neurosurg Clin N Am* 21(4): 583-584.
249. Thomsen, Louiza Bohn, Annette Burkhart in Torben Moos. 2015. Triple culture model of the blood-brain barrier using porcine brain endothelial cells, astrocytes and pericytes. *PLoS One* 10: e0134765. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4524625/> (12. april 2021).
250. Tlaskalova-Hogenova, Helena, Hanika Stepankova, Rana Stepankova in Tarko Hudcovic. 2004. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett* 93(2): 97-108.
251. Tower, D. B. 1988. Development of knowledge about astrocytes since Virchow. V *The biochemical pathology of astrocytes*, ur. M. D. Norenberg, L. Hertz in A. Schousboe, 3-18. New York: Liss.
252. Uliasz, T. F., M. E. Hamby in N. A. Jackman. 2012. Generation of primary astrocyte cultures devoid of contaminating microglia. *Methods Mol Biol* 814: 61-79.
253. Urtamo, Annele, Satu K. Jyväkorpä in Timo E. Strandberg. 2019. Definitions of successful ageing: a brief review of a multidimensional concept. *Acta Biomed* 90(2): 359-363.
254. Velnar, Tomaž, Uroš Maver, Roman Bosnjak in Lidija Gradisnik. 2020. The isolation of human glioblastoma cells: An optimised protocol. *Acta Med Acad* 49(1): 4-13.
255. Verkhratsky, A. 2010. Physiology of neuronal-glia networking. *Neurochem Int* 57(4): 332-343.
256. Verkhratsky, A., J. J. Rodríguez in V. Parpura. 2014. Neuroglia in ageing and disease. *Cell Tissue Res* 357(2): 493-503.
257. Verkhratsky, Alexei, Maiken Nedergaard in Leif Hertz. 2015. Why are astrocytes important? *Neurochem Res* 40(2): 389-401.

258. von Bernhardt, Rommy, Jaime Eugénin von Bernhardt, Betsi Flores in Jaime Eugénin León. 2016. Glial Cells and Integrity of the Nervous System. *Adv Exp Med Biol* 949: 1-24.
259. Vunjak-Novakovic, Gordana in Ian R. Freshney. 2006. *Culture of cells for tissue engineering*. New York: John Wiley&Sons.
260. Walczak, P. A., P. Perez-Esteban, D. C. Bassett in E. J. Hill. 2021. Modelling the central nervous system: tissue engineering of the cellular microenvironment. *Emerg Top Life Sci* ETL20210245. Dostopno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34524411/> (6. februar 2021)
261. Walker, Lauren, Kirsty E. McAleese, Daniel Erskine in Johannes Attems. 2019. Neurodegenerative diseases and ageing. *Subcell Biochem* 91: 75-106.
262. Wang, Doris D. in Angélique Bordey. 2008. The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol* 86(4): 342-367.
263. Wang, Joshua L. in J. Bradley Elder. 2020. Techniques for open surgical resection of brain metastases. *Neurosurg Clin N Am* 31(4): 527-536.
264. Wang, S. Audrey in Oliver Dreesen. 2018. Biomarkers of Cellular Senescence and Skin Aging. *Front Genet* 9: 247.
265. Wassmer, C. H., K. Bellofatto, L. Perez, V. Lavallard, D. Cottet-Dumoulin, S. Ljubcic, G. Parnaud, D. Bosco, E. Berishvili in F. Lebreton. 2020. Engineering of Primary Pancreatic Islet Cell Spheroids for Three-dimensional Culture or Transplantation: A Methodological Comparative Study. *Cell Transplant* 29: 963689720937292.
266. Welser, J. V. in R. Milner. 2012. Derivation of microglia-free astrocyte cultures from neural stem cells. *Methods Mol Biol* 814: 81-91.
267. Wilson, D. A., H. Duong, C. Teo and D. F. Kelly. 2014. The supraorbital endoscopic approach for tumors. *World Neurosurg* 82(1-2): 243-256.
268. WHO. 2002. Report of the World Health Organization. Active ageing: a policy framework. *Aging Male* 5(1): 1-37.



269. WHO. 2004. World Health Organization launches new initiative to address the health needs of a rapidly ageing population. *Cent Eur J Public Health* 12(4): 210-216.
270. Wu, Yihan, Samuel Rosset, Tae-Rin Lee, Mike Dragunow, Thomas Park in Vickie Bo Kyung Shim. 2021. In vitro models of traumatic brain injury - a systematic review. *J Neurotrauma* 38(17): 2336-2372.
271. Wu, Yi-Ying, Feng-Lan Chiu, Chan-Shien Yeh in Hung-Chih Kuo. 2019. Opportunities and challenges for the use of induced pluripotent stem cells in modelling neurodegenerative disease. *Open Biol* 9(1): 180177. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6367134/> (10. april 2021).
272. Wyss-Coray, Tony. 2016. Wyss-Coray Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. *Nature* 539(7628): 180-186.
273. Yokoh, Akira, Kenichiro Sugita in Shigeaki Kobayashi. 1983. Intermittent versus continuous brain retraction. An experimental study. *J Neurosurg* 58(6): 918-923.
274. Zamorano, L., A. M. Kadi in A. Dong. 1992. Computer-assisted neurosurgery: simulation and automation. *Stereotact Funct Neurosurg* 59(1-4): 115-122.
275. Zhang, Shoubing in Enkui Duan. 2018. Fighting against Skin Aging: The Way from Bench to Bedside. *Cell Transplant* 27(5): 729-738.
276. Zhang, Xinwen, Di Hu, Yutong Shang in Xin Qi. 2020. Using induced pluripotent stem cell neuronal models to study neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1866(4): 165431. Dostopno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30898538/> (10. april 2021).
277. Zhang, Y. in B. A. Barres. 2010. Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Curr Opin Neurobiol* 20: 588-594.
278. Zieger, Michael A. J., Manuel Ochoa, Rahimi Rahim, Campana Gonzalo, Tholpady Sunil, Ziaie Babak in Sood Rajiv. 2017. Skin Regeneration Using Dermal Substrates that Contain Autologous Cells and Silver Nanoparticles to Promote Antibacterial Activity: In Vitro Studies. *Mil Med* 182(S1): 376-382.

279. Zielke, Ronald H. and Deborah C. Marsh. 2018. A review of brain biorepository management and operations. *Handb Clin Neurol* 150: 83-92.
280. Zhu, Y., Q. Zhong, J. Ji, J. Ma, H. Wu, Y. Gao, N. Ali in T. Wang. 2020. Effects of aerobic dance on cognition in older adults with mild cognitive impairment: A systematic review and meta-analysis. *J Alzheimers Dis* 74(2): 679-690.
281. Zuskin, Edin, Zoran Duraković in Sonja Tomek-Roksandric. 2005. Healthy aging and productive retirement. *Lijec Vjesn* 127(9-10): 231-237.
282. Zusso, M. in P. Debetto. 2012. Isolation and culture of neural progenitor cells from rat postnatal cerebellum. *Methods Mol Biol* 846: 39-47.

# PRILOGE

## Priloga A: Dovoljenje Etične komisije Republike Slovenije



REPUBLIKA SLOVENIJA  
MINISTRSTVO ZA ZDRAVJE

Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko

Podpisnik: Božidar Stefan Voljč  
Izdajatelj: Republika Slovenija  
Serijska številka: b4 b6 58 be 00 00 00 56 7b e7 4d  
Datum podpisa: 10.03. 05.03.2021  
Referenčna številka: 0120-565/2020/5

Tomaž Velnar, dr. med.  
Oddelek za nevrokirurgijo  
UKC Ljubljana  
Zaloška 7  
1000 Ljubljana

tvelnar@hotmail.com

Številka: 0120-565/2020/5  
Datum: 2. 3. 2021

Zadeva: Ocena etičnosti predložene raziskave  
Zveza: vaša vloga z dne 27. 1. 2021

Spoštovani,

Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (v nadaljevanju KME RS) je dne 27. 1. 2021 prejela vašo vlogo za oceno etičnosti raziskave z naslovom »Izolacija astrocitov, mikroglije in oligodendrocitov iz možganskega tkiva za izdelavo celičnega modela za proučevanje nevrodegenerativnih bolezni«.

Klinična raziskava bo potekala pod vodstvom izr. prof. dr. Tomaža Velnarja, dr. med. na Kliničnem oddelku za nevrokirurgijo v UKC Ljubljana v sodelovanju z Medicinsko fakulteto v Mariboru, Inštitutom za biomedicinske vede. Raziskava bo izvedena v celičnem laboratoriju na Medicinski fakulteti v Mariboru, vzorček možganskega tkiva pa bodo odvzeli specialisti nevrokirurgije med ustreznimi možganskimi operacijami.

KME RS je na videokonferenčni seji 16. februarja 2021<sup>1</sup> obravnavala prejeto vlogo in ugotovila, da je vloga popolna ter raziskava etično sprejemljiva. S tem vam za njeno izvedbo izdaja svoje soglasje.

Pri nadaljnjih dopisih v zvezi z raziskavo se obvezno sklicujte na številko tega dopisa.

S spoštovanjem,

dr. Božidar Voljč, dr. med.,  
predsednik KME RS

Vročiti:  
– naslovniku – po e-pošti

<sup>1</sup> Seznam članov KME RS, ki so odločali o vlogi, in izjava, da KME RS deluje v skladu z zadevnimi zakoni in priporočili, sta na voljo na spletni strani MZ (zavihek "O Ministrstvu – Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko", rubrika "Seje Komisije").

# IZJAVA O AVTORSTVU



ALMA MATER  
EUROPAEA  
ECM

07

## IZJAVA O AVTORSKEM DELU IN ISTOVETNOSTI TISKANE IN ELEKTRONSKE VERZIJE ZAKLJUČNEGA DELA

Priimek in ime študenta	Gradišnik Lidija
Vpisna številka	31193027
Študijski program	Socialna gerontologija
Naslov zaključnega dela:	Izolacija človeških astrocitov za izdelavo celičnega modela za proučevanje nevrodegenerativnih bolezn starejših
Naslov v angleščini:	The isolation of human astrocytes for the neurodegeneration cell model in older adults
Mentor:	Prof. dr. Tomaž Velnar
Somentor:	
Mentor iz podjetja:	

S podpisom izjavljam da:

- Je predloženo zaključno delo z naslovom Izolacija človeških astrocitov za izdelavo celičnega modela za proučevanje nevrodegenerativnih bolezn starejših izključno rezultat mojega lastnega raziskovalnega dela,
- Sem poskrbel/a da so dela in mnenja drugih avtorjev, ki jih uporabljam v predloženem delu navedena oz. citirana v skladu s fakultetnimi navodili,
- Se zavedam, da je plagiatstvo – predstavljanje tujih del, bodisi v obliki citata, bodisi v obliki dobesednega parafraziranja, bodisi v grafični obliki, s katerim so tuje misli oziroma ideje predstavljene kot moje lastne, kaznivo po zakonu (Zakon o avtorskih in sorodnih pravicah, UrL RS št. 139/2006 s spremembami),
- V primeru kršitve zgoraj navedenega zakona prevzemam vso moralno, kazensko in odškodninsko odgovornost,

Podpisani-a Lidija Gradišnik izjavljam, da sem za potrebe arhiviranja oddal/a elektronsko verzijo zaključnega dela v Digitalno knjižnico. Zaključno delo sem izdelal-a sam-a ob pomoči mentorja. V skladu s 1. odstavkom 21. člena Zakona o avtorskih in sorodnih pravicah (Uradni list RS, št. 16/2007) dovoljujem, da se zgoraj navedeno zaključno delo objavi na portalu Digitalne knjižnice. Prav tako dovoljujem objavo osebnih podatkov vezanih na zaključek študija (ime, priimek, leto in kraj rojstva, datum diplomiranja, naslov diplomskega dela) na spletnih straneh in v publikacijah Alma Mater.

Tiskana verzija zaključnega dela je istovetna elektronski verziji, ki sem jo oddal/a za objavo v Digitalno knjižnico.

Datum in kraj:

14.2.2022, Maribor

Podpis študent/ke:

Lidija Gradišnik

IZJAVA LEKTORJA



ALMA MATER  
EUROPAEA  
ECM

06

POTRDILO O LEKTORIRANJU

Podpisani(a)

ANDREJA LEP

po izobrazbi (strokovni oz. znanstveni naslov)

PROFESORICA SLOVENŠČINE IN PRIMERJALNE KNJIŽEVNOSTI,

potrjujem, da sem lektoriral(a) zaključno delo študenta(ke)

LIDIJE GRADIŠNIK

z naslovom:

kolekcija elastičnih astrocitov za izdelavo celičnega  
modela za proučevanje neurodegenerativnih bolezni  
starejših.

Kraj: Maribor

Datum: 7.2.2022

Podpis: Andreja Lep