

TERAPIJSKA PRIMENA EMBRIONALNIH I ADULTNIH STEM ĆELIJA

Vladislav Volarević

UVOD

Stem-ćelije imaju tri važne karakteristike: mogućnost samoobnavljanja, sposobnost diferencijacije i funkcionalnost, odnosno, sposobnost da posle transplantacije u potpunosti funkcionišu kao ireverzibilno oštećene ćelije koju menjaju. Ćelije koje ispunjavaju ova tri kriterijuma smatraju se stem-ćelijama, uključujući tu posebno važne embrionalne (ES) i adultne stem ćelije

ES-ćelije imaju neograničen potencijal za deljenje, samoobnavljanje i diferenciranje. One su pluripotentne stem ćelije, što znači da imaju mogućnost diferencijacije u ektoderm, mezoderm i endoderm (1). ES-ćelije se dobijaju iz intraćelijske mase preimplantacione blastociste. U eksperimentalnim uslovima, da bi se postigli uslovi da se spreči diferencijacija ES ćelija miševa, one u kulturi rastu pod odgovarajućim uslovima (najčešće na hranljivoj ćelijskoj podlozi mišijih embrionalnih fibroblasta - MEF uz dodatak leukemija inhibitornog faktora - LIF) (2). Menjanjem uslova pod kojim ES-ćelije rastu u kulturi moguće je kontrolisati i usmeravati ES-ćelije da se diferenciraju u ćelije brojnih tkiva. Teoretski, pluripotentne ES-ćelije imaju ogroman terapijski potencijal i mogu služiti kao neiscrпно terapijsko sredstvo u lečenju bolesti svih tkiva i organa (3).

Adultne stem ćelije potiču iz adultnih tkiva. One ispunjavaju sva tri važna kriterijuma za stem ćelije. Ipak, stepen diferencijacije i samoobnavljanja im je ograničen. Iako se mogu diferencirati u nekoliko ćelijskih linija, adultne stem ćelije nisu pluripotentne. Najviše proučavane adultne stem ćelije su hematopoetske stem ćelije (HSC) iz kojih nastaju ćelijski elementi krvi, neuralne stem ćelije (NSC) odgovorne za nastanak neurona, astrocita i oligodendrocita, mezenhimalne stem ćelije (MSC) koje se diferenciraju u fibroblaste, osteoblaste, hondroblaste, adipocite i skeletno-mišićne ćelije. Ranije se smatralo da adultne stem ćelije mogu da se diferenciraju u ćelije samo određene ćelijske linije. Istraživanja su pokazala da postnatalne adultne stem ćelije imaju mnogo veći potencijal diferencijacije. Dokazana je sposobnost diferencijacije HSC u hepatocite, NSC u hematopoetske ćelije i MSC u neurone i hepatocite (1).

Infarkt miokarda, *Diabetes mellitus tip I* (DM-I), Parkinsonova bolest su samo neke od bolesti kod kojih je zbog ireverzibilnih oštećenja ćelija došlo do trajnog gubitka funkcije oštećenih organa. Zbog ogromnog terapijskog potencijala veliki broj istraživanja usmeren

je ka ispitivanju mogućnosti primene ES i adultnih stem ćelija u lečenju genetskih, malignih i degenerativnih bolesti različitih tkiva i organa (2).

TERAPIJSKA PRIMENA STEM ĆELIJA U LEČENJU OBOLJENJA MOŽDANOG TKIVA

Odavno je napuštena teorija da se neurogeneza završava pre rođenja. Brojne studije bavile su se proučavanjem endogenih neuralnih stem ćelija (NSĆ) i ukazale su da je neurogeneza moguća u odraslih osoba u pojedinim regionima mozga.

Da bi se dokazala mogućnost transplantacije adultnih ćelija iz koštane srži u moždano tkivo čoveka i njihova proliferacija i diferencijacija u nervne ćelije, izvršen je eksperiment u kome su kao donori stem ćelija poslužili zdravi muškarci, a primaoci su bile četiri žene obbolele od različitih formi leukemije sa pratećom imunodeficijencijom (3). U periodu od jedan do devet meseci od transplantacije pacijentkinje su egzistirale. Posle urađene autopsije ispitivano je moždano tkivo ovih pacijentkinja korišćenjem imunohistohemijske metode (upotrebom neuron-specifičnih antitela) i primenjena je fluorescentna *in situ* hibridizacijska histohemijska metoda radi detekcije Y hromozom-pozitivnih ćelija. Kontrolnu grupu činile su zdrave žene koje su po svim karakteristikama odgovarale obolelim ženama (one nisu bile podvrgnute transplantaciji stem-ćelija iz koštane srži muškaraca). Kod sve četiri žene iz eksperimentalne grupe dokazano je prisustvo ćelija sa Y hromozomom u nekoliko regiona mozga: Y hromozom je dominantno bio prisutan u nervnim ćelijama korteksa i hipokampusu, distribucija Y pozitivnih nervnih ćelija nije bila homogena - postojali su "klasteri" - grupacije ovih ćelija na pojedinim mestima u moždanom tkivu. "Klasteri" ćelija nastali su kao posledica klonalne ekspanzije i diferencijacije pojedinih progenitornih ćelija. Utvrđeno je i da je devojčica - najmlađi dvogodišnji pacijent, koja je živela najduže posle transplantacije, imala najveći broj nervnih ćelija sa Y hromozomom u poređenju sa ostalim pacijentkinjama. Istraživanje je dokazalo da adultne stem-ćelije iz koštane srži čoveka mogu da se implantiraju u moždano tkivo i mogu da doprinesu stvaranju neurona, što može biti od ogromnog značaja u budućem lečenju trauma, infarkta mozga i degenerativnih oboljenja nervnog sistema (4).

ES-ćelije dobijene *in vitro*, mogu da se diferenciraju u visokospecijalizovane nervne ćelije i da zamene one koje su oštećene degenerativnim oboljenjem što predstavlja osnovu terapijske primene ES ćelija u lečenju neurodegenerativnih bolesti (2).

Grupa naučnika iz SAD je demonstrirala napredak kod glodara sa razvijenom Parkinsonovom bolešću pošto su ovim eksperimentalnim životinjama transplantirali nediferentovane ES-ćelije u striatum. Lokalna sredina uticala je na diferencijaciju ćelija u odgovarajuće dopaminergične neurone. ES-ćelije miša, transplantirane u organizam zdravog miša ili u organizam 6-hidroksidopamin (OHDA) oštećenih Sprague-Dawley pacova, mogu se spontano diferencirati u *tyrosine hydroxylase* (TH) pozitivne i serotonin (5HT) pozitivne neurone. U eksperimentu su korišćene ES-ćelije D3 linije (divlji tip) dobijene iz blastociste miša. Nediferentovane ES ćelije su čuvane u želatinom obloženim sudovima (DMEM) sa dodatkom 2mM glutamina, 0,001% β -mercaptoethanola, 1x neesencijalnih aminokiselina (GIBCO/BRL), 10% konjskog seruma (HyClone), i ljudskog rekombinantnog leukemija inhibitornog faktora - LIF (2,000 jedinica/ml). Rane ćelijske kulture su smrznute u 90% konjskom serumu 10% DMSO, a ostatak ćelija je u epruvetama smešten u tečni azot. Posle otapanja ES ćelije su dve nedelje uzgajane u prisustvu LIF-a. Pošto su ćelije tripsinizirane (korišćenjem 0,05% trypsin-EDTA), resuspendovane, one su zasejane (5×10^6 ćelija) u 15 ml DMEM u 100 mm gradiranoj bakteriološkoj Petrijevoj šolji u odsustvu LIF-a. Eksperimentalnim pacovima ES-ćelije su ubrizgane (1000-2000 ES ćel/ μ l) na dva mesta u desnom striatumu korišćenjem 10- μ l Hamilton-ovog šprica. Špric nije pomeran 2 minuta da bi se omogućilo ES-ćelijama da se nastane u odgovarajućem broju na ciljanoj lokaciji. Kontrolnu grupu činili su pacovi kojima nisu ubrizgavane ES-ćelije. Da bi se sprečilo odbacivanje ES-ćelija izvršena je imunosupresija svakodnevnim injekcijom *cyclosporine A* (15 mg/kg) rastvorenog u potpuno čistom ulju. Dupla doza injektirana je jedan dan pre ubrizgavanja ES-ćelija. Deset nedelja posle ES-ćelijskog tretmana doza *cyclosporine A* je smanjena na 10 mg/kg. Radi patohistološke analize moždanog tkiva, 14-16 nedelja nakon ubrizgavanja ES ćelija, pacovi su žrtvovani prekomernom dozom pentobarbital-a (150 mg/kg) i.p. Urađena je intrakardijalna perfuzija sa 100 ml rastvora (0,1% heparin i 0,9% NaCl) uz 200 ml 4% paraformaldehida. Mozak, izvađen iz ekperimentalnih životinja, je tokom 8 časova fiksiran u istom rastvoru i posle toga ekvilibriran u 20% saharozi. Urađeni su 40 μ m tanki preseći moždanog tkiva i poslani na patohistološku i imunohistohemijsku analizu. Ovo istraživanje je pokazalo da dopaminergični neuroni mogu da se razviju od *in situ* aplikovanih ES-ćelija. Kod pacova sa eksperimentalno indukovanom Parkinsonovom bolešću novostvoreni dopaminergični neuroni redukovali su motornu asimetriju i poboljšali funkcionisanje dopaminergičnog sistema (5).

Patotropizam (kretanje ka obolelim organima) predstavlja jednu od najvažnijih karakteristika neuralnih stem-ćelija (NSĆ), zahvaljujući kojoj mogu poslužiti kao vektor - prenosilac lekova do obolelih tkiva, što je naročito važno u terapiji malignih bolesti (primarnih i metastatskih tumora) nervnog tkiva. Do 2000. godine nekoliko studija je dokazalo da su NSĆ, vođene hemotaktičnim signalima tumorskih ćelija, naseljavali tumorska tkiva kod životinja obolelih od primarnih i metastatskih tumora mozga. NSĆ čak pokazuju tropizam i za ekstrakranijalne tumore neuralnog i neneuralnog porekla.

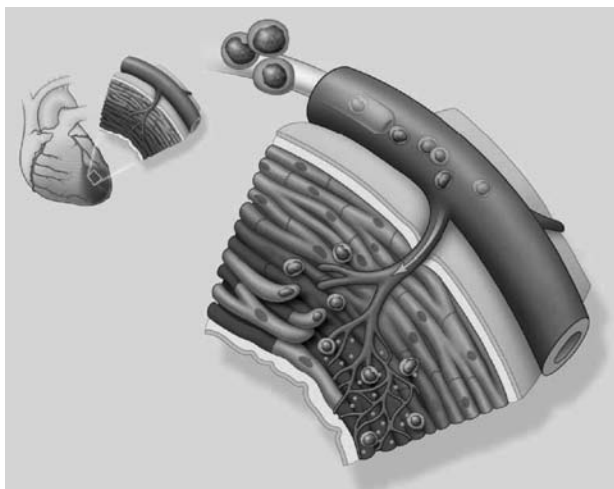
Grupa naučnika (6) je pokazala uspešnu eradikaciju metastatskih ćelija, raširenih u celom organizmu miša primarno obolelog od neuroblastoma, korišćenjem NSĆ HB1.F3.C1. Ove NSĆ ispoljavaju tropizam ka tumorima nervnog tkiva i služile su kao *in vivo* vektor za prenošenje zečje *carboxylesterase* (rCE), enzima sposobnog da aktivira antitumorski lek CPT 11. Miševima, obolelim od neuroblastoma i sa prisutnim diseminovanim metastazama, intravenskim putem ubrizgane su NSĆ. Miševi su prethodno sistemski tretirani lekom CPT-11. Specijalno modifikovane NSĆ za sekreciju rCE enzima migrirale su do tumorskih ćelija i aktivirale su CPT-11, čime je antitumorska aktivnost ovog leka bila značajno povećana, što je rezultiralo šestomesečnim preživljavanjem svih miševa, uključenih u ovaj ekperiment, čime je dokazana efikasnost primenjene metode u uništavanju metastatskih ćelija (6).

TERAPIJSKA PRIMENA STEM-ĆELIJA U LEČENJU INFARKTA MIOKARDA

Istraživanja vezana za terapijsku primenu stem ćelija u kardiologiji usmerena su na zamenu ireverzibilno oštećenih kardiomiocita transplantiranim stem ćelijama (7). Za transplantaciju korišćeni su skeletni mioblasti, stem ćelije koje su poticale iz koštane srži i periferne krvi i stem ćelije koje potiču iz pupčane vrpce.

Skeletni mioblasti dobijeni su mišićnom biopsijom. Eksperiment sa skeletnim mioblastima rađen je u *in vivo* uslovima i pokazano je da se ove ćelije ne mogu diferencirati u autentične kardiomiocite. Dokazano je da posle njihove transplantacije u oštećeni mikard dolazi do pojave ozbiljnih aritmija, što im značajno umanjuje terapijski potencijal (8).

Posle transplantacije ćelija poreklom iz koštne srži došlo je do poboljšanja srčane funkcije, što se manifestovalo kroz porast ukupne ejeckione frakcije leve komore (LVEF) 6 meseci nakon izvršene transplantacije (9).



Slika 3. Stem ćelije transportovane do srca kroz intakoronarni kateter

Nedostatak ove metode je invazivnost, odnosno, neugodna procedura uzimanja ćelija iz koštane srži. Zato alternativu predstavlja mobilizacija stem ćelija iz periferne krvi posredstvom granulocitnog kolonostimulirajućeg faktora (G-CSF).

Istraživanja su pokazala da je transplantacija PBSC bezbedan metod lečenja akutnog infarkta miokarda, ali u poređenju sa PCI ne pokazuje značajniji uspeh u popravljanju kontraktilne funkcije oštećenog miokarda (10).

Terapijski potencijal stem ćelija poreklom iz pupčane vrpce (UCDS) ispitivan je na eksperimentalnom modelu pacova kome je indukovana infarkt miokarda. Dve nedelje posle infarkta miokarda kod pacova je zabeležena LVEF manja od 60%. Pacovi su zatim podeljeni u dve grupe. Prvu (kontrolnu grupu) činili su pacovi kojima je dat fosfatni pufer, dok je pacovima iz druge (eksperimentalne) grupe izvršena transplantacija UCDS ćelija. Srčana funkcija ispitivana je korišćenjem ehokardiografa dve i četiri nedelje posle UCDS transplantacije. Histološka analiza i imunofluorescenca su korišćeni za ispitivanje diferencijacije transplantiranih ćelija, sekreciju citokina, stepen novonastale angiogeneze i za ispitivanje apoptoze kardiomiocita. Kod pacova iz eksperimentalne grupe zabeležen je značajno poboljšanje srčane funkcije u poređenju sa pacovima iz kontrolne grupe. Četiri nedelje posle transplantacije, histološkom analizom, utvrđeno je prisustvo UCDS ćelija u miokardu. UCDS bile su difuzno raspoređene u kapilarnoj mreži, oko arteriola. Neke od transplantiranih ćelija ispoljavale su troponin-T, von Willebrandov faktor, glatkomišićni aktin što dokazuje diferencijaciju UCDS ćelija ka kardiomiocitima, endotelnim ćelijama i glatkomišićnim ćelijama posle transplantacije. U ispitivanom miokardu došlo je do povećanja broja i gustine arteriola i kapilara što

ukazuje da citokini oslobođeni od UCDS dovode do angiogeneze. U eksperimentalnoj grupi zabeležen je drastično manji broj apoptotičnih kardiomiocita u odnosu na kontrolnu grupu. Ovo istraživanje je pokazalo da UCDS značajno doprinosi lečenju infarkta miokarda pacova i predstavlja važan putokaz za buduća istraživanja usmerena ka lečenju infarkta miokarda (11).

Za transplantaciju stem-ćelija u infarkt oštećeni miokard veoma je važno izabrati odgovarajuću tehniku transplantacije. Transtorakalna direktna intramio-kardna transplantacija stem ćelija se pokazala kao uspešna, ali i jako invazivna metoda, koju sve više zamenjuje transplantacija stem ćelija posredstvom katetera, koja je manje invazivna, a pokazuje dobre rezultate.

Pored zamene ireverzibilno oštećenih kardiomiocita, značaj transplantiranih stem ćelija ogleda se i u sekreciji citokina: endotelnog faktora rasta i insulinu sličnog faktora rasta, koji stimulišu angiogenezu, čime se popravljaju perfuzija ishemičnog miokarda i dolazi do posledičnog porasta ejsione frakcije (7).

Glavna neželjena dejstva terapijske primene stem-ćelija u lečenju infarkta miokarda kod ljudi je stenoza koronarnih arterija, dok je kod eksperimentalnih životinja zabeležena pojava mikroinfarkta posle intrakoronarne infuzije stem-ćelija (13) i nekontrolisana diferencijacija stem-ćelija što je rezultiralo pojavi kalcifikata u tkivu miokarda (14).

TERAPIJSKA PRIMENA STEM-ĆELIJA U LEČENJU NEPLODNOSTI MUŠKARACA

Muški gameti potiču od spermatogonálnih stem ćelija (SSCs). Grupa naučnika pokazala je da SSCs mogu, u *in vitro* uslovima, da nastanu iz ES ćelija (15). Naučnici su prvo formirali: Stra8-EGFP i Prm1-DsRed, gde su nosioci promotornih regiona gena specifičnih za germinativne ćelije: Stra8 i Prm1, a EGFP i DsRed su: Enhanced Green Fluorescent Protein i Red fluorescent protein. Pošto je Stra8-EGFP inkorporiran u ES-ćelije, one su rasle u kulturi dva meseca. Od faktora rasta značajna je retinoična kiselina (RA) koja omogućava održavanje mišjih germinativnih ćelija u kulturi i progresivni razvoj spermocita u ranoj fazi mejoze. Posle indukcije retinoičnom kiselinom, ćelije koje su pokazale ekspresiju Stra8-EGFP, detektovane posredstvom FACS-a (fluorescence-activated cell sorting), gajene su u kulturi naredna dva meseca pod nekontrolisanim uslovima. Ćelijama je zatim inkorporiran Prm1-DsRed. Korišćenjem PCR tehnike izolovane su dve ćelijske linije sa prisutnim DsRed regionom: SSC7 i SSC12. Ove ćelijske linije pokazuju ekspresiju markera

premejotočkih, mejotičkih i postmejotičkih muških germinativnih ćelija što je dokazano RT-PCR analizom. Kao markeri rane faze razvoja germinativnih ćelija ispoljili su se: Oct4, fragilis, stella, Mvh i Rnf17, dok je zabeleženo i prisustvo markera Ddx4 karakteristično za kasnu fazu germinativnog razvoja. Flow citometrijskom analizom dokazano je da se ove ćelijske linije dele mejozom stvarajući haploidne ćelijske populacije. Radi analize postmejotičke diferencijacije, korišćenjem RT-PCR metode, praćena je ekspresija Prm 1 i Tp2 (transition protein 2-čija iRnk se prva otkriva kod spermatida). Kod obe ćelijske linije, 72 časa posle indukcije retinoičnom kiselinom, zabeležena je ekspresija Prm 1 i Tp2 markera. Specifične strukturne i biohemijske promene hromatina - njegova kondenzacija dokazana je bojenjem Anilin plavim. Pojava repu-sličnih struktura i akrozoma u ćelijskim linijama uočena je imunocitohemijskom analizom. Za ispitivanje daljeg razvoja SSC7 i SSC12 ćelijskih linija u *in vivo* uslovima korišćen je eksperimentalni model miša kome su prethodno opustošene germinativne ćelije. U jedan testis transplantirane su SSC7 i SSC12 ćelijske linije, dok je drugi testis služio kao kontrola. Histološkom analizom, četiri meseca posle transplantacije, potvrđeno je prisustvo spermatozoida kod 2 od 10 miševa. Kod 5 miševa došlo je do pojave teratoma. Spermatozoidi su pokazivali smanjenu pokretljivost. U kontrolnom testisu nije došlo do spermatogeneze. Drugi pravac ovog istraživanja odnosio se na ispitivanje da li *in vitro*, iz ES-ćelija dobijeni spermatozoidi mogu da oplode jajnu ćeliju i da li može doći do živih mladunaca. Urađena je intracitoplazmična injekcija *in vitro* dobijenih muških gameta u neoplođenu jajnu ćeliju i zabeležen je razvoj preimplantacionog embriona. Dvoćelijski embrioni su smešteni u jajovode ženki miševa, posle čega je došlo do rađanja živih mladunaca. Ova studija je pokazala da je iz ES-ćelija moguće dobiti SSCs. Ipak, rizik od pojave teratoma je bio veliki, a pokretljivost novonastalih spermatozoida je bila mala, što je ukazalo na neophodnost daljeg ispitivanja u svrhu lečenja poremećaja spermatogeneze ljudi (15).

Istraživanje je nastavljeno korišćenjem Stra8-EGFP kompleksa i stem-ćelija koštane srži za dobijanje muških germinativnih ćelija. Germinativne ćelije nastale iz stem-ćelija koštane srži ispoljavale su markere karakteristične za primordijalne germinativne ćelija (fragilis, stella, Rnf17, Mvh and Oct4), kao i markere specifične za SSCs i spermatogonije (Rbm, c-Kit, Tex18, Stra8, Piwil2, Dazl, Hsp90alpha, beta1- and alpha6-integrins). Ovo istraživanje dokazalo je da je moguće dobiti spermatozoide iz stem ćelija koštane srži, čime znatno doprinosi razvoju novih metoda lečenja steriliteta muškaraca (16).

TERAPIJSKA PRIMENA STEM-ĆELIJA U LEČENJU PLUĆNIH BOLESTI

Ispitivanje uspešnosti transplantacija ćelija koštne srži, stromalne ćelije koštne srži (MSC) i hematopoetskih stem ćelija (HSC) u cilju lečenja oštećenog plućnog tkiva rađena su na mišu kao eksperimentalnom modelu. Eksperimentalnim miševima je celo telo zračeno u cilju izazivanja oštećenja plućnog tkiva i opustošenja koštne srži primaca transplantiranih ćelija. Istraživanje je pokazalo da i MSC i HSC rekonstituišu oštećeni plućni parenhim. Pneumociti tip I i tip II nastaju iz MSC ćelija, dok je porast pneumocita i bronhijalnih epitelijalnih ćelija zabeležen posle transplantacije HSC. Kod eksperimentalnih životinja kojima je indukovano oštećenje plućnog parenhima zračenjem, ali kojima nisu transplantirane ćelije koštne srži, nije došlo do reparacije plućnog parenhima.

Mobilizacija endotelnih ili epitelijalnih stem/progenitor ćelija ili adultnih somatskih stem ćelija, ES ćelija ili embrionalnih germinativnih ćelija, može popraviti funkcionisanje respiratorne barijere, čime se leči respiratorni distress-sindrom. Sličan terapijski pristup je primenjen i u lečenju *bronchiolitis obliterans*-a, gde je oštećenje bronhijalnog epitela toksične, virusne ili autoimune etiologije. U svrhu lečenja emfizema pluća koriste se transplantirane stem ćelije: one koloniziraju područje oštećenja alveolarnih septi i proliferišu, ponovo se formiraju među-alveolarne pregrade, alveo-kapilarna barijera i normalizuje razmena gasova.

Terapijska primena stem-ćelija prisutna je i u lečenju cistične fibroze: osnovni poremećaj je u transportu hloridnih jona kroz ćelijsku membranu usled disfunkcije CFTR (engl. Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) proteina koji je produkt gena lociranog na 7q31.2 hromozomu. U cilju lečenja koriste se heterologne ili genetski korigovane autologne stem-ćelije koje koloniziraju, proliferišu i diferenciraju se u vazдушnim putevima, posle čega se koriguje elektrolitni disbalans, a samim tim i žilavost sekreta na respiratornoj sluznici.

Kod plućne fibroze, nastale kao posledica ožiljavanja i bujanja fibroznog tkiva, terapijski pristup orijentisan je ka suzbijanju prekomerne proliferacije stem-ćelija. Ovaj terapijski pristup osnova je lečenja i kod glatko-mišićne hiperplazije i kod karcinoma pluća (3).

TERAPIJSKA PRIMENA STEM ĆELIJA U LEČENJU DIABETES MELLITUS-A TIP I

Dosadašnja terapija insulin-zavisnog *Diabetes mellitus*-a tip I zasnivala se na supstitutivnoj terapiji

insulinom, dok je etiološka terapija bila bazirana na transplantaciji Langerhansonovih ostrvca pankreasa. Histokompatibilnost, koja je neophodna za transplantaciju, razlog je malom broju mogućih davalaca Langerhansonovih ostrvaca. Zato je veliki broj istraživanja usmereno ka stem ćelijama koje kao nediferentirane ćelije imaju sposobnost da formiraju endokrino tkivo pankreasa. I embrionalne i adultne stem-ćelije koriste se za dobijanje beta ćelija pankreasa i uspostavljanje insulinske sekrecije. Istraživanja su pokazala da je moguće dobiti funkcionalne beta ćelije pankreasa u *in vitro* uslovima, dok je njihov kapacitet insulinske sekrecije pokazao uspeh na miševima i pacovima kao eksperimentalnim modelima *Diabetes mellitusa* (17).

Grupa naučnika iz Kine (18) je opisala metod diferencijacije ljudskih ES u insulin-produkujuće ćelije. Activin A je korišćen za endodermnu diferencijaciju ES-ćelija što je potvrđeno ekspresijom markera karakterističnih za formiran enoderm: Sox17 i Brachyury. Za dalju diferencijaciju ovih ćelija korišćena je RA. Posle sazrevanja na DMEM/F12 *serum-free medium*-u sa bFGF i nikotinamidom, ćelije su ispoljavale ekspresiju markera karakterističnih za endokrino ostrvca pankreasa: C-peptide, insulin, glucagon i glut2. Broj C-peptide pozitivnih ćelija bio je veći od 15 %. Sekrecija insulina bila je u direktnoj korelaciji sa nivoom prisutne glukoze. Ove ćelije su zatim transplantirane u bubrežnu kapsulu Streptozotocin (STZ) - tretiranim miševima. Ćelije su uspešno transplantirane i pokazivale su ekspresiju markera karakterističnih za beta ćelije pankreasa kao što su C-peptide, pdx1, glucokinase, nkx6.1, IAPP, pax6 i Tcf1. Kod 30% miševa došlo je do normalizacije glikemije i euglikemija se održala više od 6 nedelja, što je dokazalo da ćelije koje su nastale iz ljudskih ES-ćelija mogu da zamene insulin-produkujuće ćelije pankreasa (18).

OBOLJENJA ROŽNJAČE LEČENA STEM-ĆELIJAMA

Totalna kornealna stem ćelijska deficijencija (LSCD) je stanje koje doprinosi razvoju nekoliko ozbiljnih oboljenja rožnjače, koje dovode do znatnog smanjenja oštine vida. LSCD je u osnovi Steven-Johnson-ovog sindroma, sindroma suvog oka, pojave ožiljnog pemfigoida u oku. LCSO dovodi do potrebe za čestim operacijama oka i stalnom upotrebom kontaktnih sočiva. Za etiološko lečenje LCSO koristi se transplantacija kornealnih epitelnih stem ćelija, koje se dobijaju iz kulture kornealnog tkiva. Kornealne epitelne stem-ćelije uspešno su izolovane iz tkiva rožnjače upotrebom trypsin/ethyldiaminetetraacetic acid (EDTA) i FACS tehnike (19). Transplantacija

kornealnih epitelnih stem-ćelija dovela je do znatnih poboljšanja oštine vida pacijenata sa ireverzibilno oštećenom rožnjačom. Uspešna terapijska primena adultnih stem ćelija u lečenju poremećaja vida usled oštećenja na rožnjači predstavlja primer uspešnosti i svrsishodnosti istraživanja usmerenih ka transplantaciji stem-ćelija u ireverzibilno oštećena tkiva (20).

ZAKLJUČAK

Dosadašnja istraživanja usmerena na supstituciju ireverzibilno izmenjenih ćelija stem-ćelijama pokazala su da stem ćelije mogu uspešno i morfološki i funkcionalno da zamene oštećene ćelije. Ogroman napredak u lečenju neurodegenerativnih oboljenja, malignih bolesti, *diabetes mellitusa*-a tip I i sl., zabeležen je kod ekperimentalnih životinja, prevashodno glodara, terapijskom primenom stem-ćelija. Mora se obratiti posebna pažnja prilikom primene stem-ćelija u kliničkim ispitivanjima na ljudima, jer je došlo do pojave teratoma kod jednog broja ekperimentalnih životinja nakon transplantacije stem-ćelija. Ipak, terapijska primena stem-ćelija u svrhu lečenja genetski determinisanih i malignih oboljenja ljudi predstavlja budućnost savremene medicine.

LITERATURA

1. Montoya F, Verfaillie C, Hu W. Culture systems for pluripotent stem cells. *Journal of bioscience and bioengineering* 2005;12-27.
2. Daley GQ, Goodell MA, Snyder EY. Realistic prospects for stem cell therapeutics. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003;398-418.
3. Neuringer I, Randell S. Stem cells and repair of lung injuries. *Respir Res* 2004; 5(1):6.
4. Mezey E, Key S, Vogelsang G, et al. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(3):1364-9.
5. Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, et al. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:2344-9.
6. Fodde R. Stem cells and metastatic cancer: fatal attraction. *Plos Medicine* 2006; 3:2182-3.
7. Kang H, Kim H, Park Y. Stem cell therapy for myocardial infarction. *CMAJ* 2004; 171 (5):442-3.
8. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1078-83.

9. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004;364(9429):121-2.
10. Choi JH, Choi J, Lee WS, et al. Lack of additional benefit of intracoronary transplantation of autologous peripheral blood stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Circ J* 2007;71(4):486-94.
11. Wu KH, Zhou B, Yu CT, et al. Therapeutic potential of human umbilical cord derived stem cells in a rat myocardial infarction model. *Ann Thorac Surg* 2007;83(4):1491-8.
12. Galinanes M, Loubani M, Davies J, et al. Autotrans-plantation of unmanipulated bone marrow into scarred myocardium is safe and enhances cardiac function in humans. *Cell Transplant* 2004;13:7-13.
13. Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, et al. Intracoronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet* 2004;363:783-4.
14. Yoon YS, Park JS, Tkebuchava T, et al. Unexpected severe calcification after trans-plantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;109:3154-7.
15. Nayernia K, Nolte J, Michelmann H, et al. In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Developmental Cell* 2006;11:125-32.
16. Nayernia K, Lee J, Drusenheimer N, et al. Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. *Lab invest* 2006; 86(7):654-63.
17. Urban SV, Kiss J, Vas V, et al. Stem cell therapy for diabetes mellitus: progress, prospects and challenges. *Orv Hetil* 2006;147(17):791-7.
18. Jiang W, Shi Y, Zhao D, et al. In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Cell Res* 2007; 4:333-44.
19. Kim MK, Lee JL, Shin KS, et al. Isolation of putative corneal epithelial stem cells from cultured limbal tissue. *Korean J Ophthalmol* 2006;20(1):55-61.
20. Daniels JT, Notara M, Shortt AJ, et al. Limbal epithelial stem cell therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2007;7(1):1-3.

S ciljem da se poveća procenat spermatozoida koji prežive proces odmrzavanja u većini protokola ejakulatu se dodaju različiti puferisani rastvarači koji sadrže supstancu bogatu energijom - glukozu ili fruktozu, krioprotektori (najčešće glicerol, holesterol se može koristiti za stabilizaciju membrana spermatozoida) kao i različita dinamika temperaturnih promena.

Posle rastvaranja krioprotektora intracelularna voda izlazi iz ćelije, a glicerol ulazi u ćeliju. Brzina hlađenja je otprilike 20°C u minutu. Pri tom nastaje brzo formiranje ekstracelularnih kristala i brzo se povećava koncentracija supstanci koje okružuju spermatozoide. Krioprotektori imaju za cilj da smanje osmotski šok kojem je izložena ćelija prilikom zamrzavanja i odmrzavanja. Glicerol smanjuje tačku zamrzavanja intracelularne vode, tako da ćelija ostaje nezaleđena i ostaje ohlađena na temperaturi značajno ispod prave tačke smrzavanja. Kao odgovor na povećanu osmotsku koncentraciju ekstracelularno, intracelularna voda teži da napusti ćeliju. Smrzavanjem ekstracelularne vode nastaje egzotermna reakcija koja može oštetiti ćeliju što se smanjuje brzim hlađenjem okoline potapanjem u tečni azot. U zamrznutom stanju postoji minimalno molekularno kretanje. Prilikom odmrzavanja spermatozoidi su izloženi sličnim brzim promenama volumena i propustljivosti ćelijske membrane. Otapanjem ekstracelularna voda postaje tečna, ulazi u ćeliju, ćelija povećava svoj volumen; povećanjem temperature glicerol napušta ćeliju, dolazi do redistribucije membranskih proteina i lipida ćelije u cilju ponovnog vraćanja ćelijskih funkcija.

Osetljivost spermatozoida na smrzavanje i odmrzavanje zavisi od vrste, kvaliteta spermatozoida, kao i od postupka krioprezervacije.

U *in vitro* uslovima spermatozoidi, koji su bili zaleđeni, brže se vezuju za epitelne ćelije jajovoda, ali se i brže od njih odvajaju u odnosu na sveže spermatozoide kod kojih su oba procesa postepena. Ovo se može delimično prevazići dodavanjem semene plazme posle odmrzavanja (5).

Postoje različiti protokoli i metode krioprezervacije (suvi led, *dry shipper one-step*, *dry shipper two-step*, tečni azot, para azota). Protokoli odmrzavanja se takođe razlikuju. Neki podrazumevaju da se epruvete posle vađenja iz tečnog azota drže na sobnoj temperaturi (25°C) 30-45 minuta (3), a neki brzo zagrevanje na 37°C (6).

Kvalitet odmrznutih spermatozoida zavisi od protokola ali i od prvobitnog kvaliteta spermatozoida. Posle zamrzavanja azotnom parom stopa obnove pokretljivosti spermatozoida je veća kako za spermatozoide normospermičnih, tako i za

spermatozoide oligospermičnih muškaraca. Bolji stepen oporavka pokazuju spermatozoidi normospermičnih.

U cilju zaštite spermatozoida prilikom procesa zamrzavanja i odmrzavanja, konvencionalno se koriste različiti krioprotektori: HSPM, TEST-*yolk* ili glicerol, Glycerol-*egg yolk* citrate. Prilikom zamrzavanja i odmrzavanja humanih spermatozoida smanjuje se procenat spermatozoida sa normalnom morfologijom i intaktnom hromatinskom strukturom, u poređenju sa nativnom spermom, bez obzira da li se kao krioprotektor koristi HSPM ili TYB, mada TYB značajno bolje štiti hromatin i morfologiju spermatozoida (7), dok spermatozoidi zamrznuti sa HSPMa pokazuju bolji motilitet, brzinu i oporavak od spermatozoida zamrznutih sa TEST-*yolk* ili glicerolom (8).

Uspešna krioprezervacija humanih spermatozoida je moguća i bez upotrebe krioprotektanata - procesom vitrifikacije (6). Proces vitrifikacije, takođe, sprečava formiranje intracelularnog leda i visoke koncentracije soli tokom procesa zamrzavanja i odmrzavanja. Ceo proces traje nekoliko sekundi. Veoma brzo rashlađivanje pre stavljanja u tečni azot (i do 7.2 x 10⁵ °C/min) i veoma brzo zagrevanje posle vađenja iz tečnog azota (na 37°C) ne dozvoljavaju da se formiraju intracelularni kristali leda. Posle otapanja, pokretljivost spermatozoida, fertilizaciona sposobnost, DNK integritet spermatozoida je uporediv sa tehnikom u kojoj se primenjuje rashlađivanje pre spuštanja u tečni azot i postepeno hlađenje (150-250°C/min). Prihvatljivi su različiti rasponi stepena rashlađenja.

Oštećenje humanih spermatozoida dešava se, uglavnom, za vreme odmrzavanja i pripisuje se smanjenoj antioksidativnoj zaštiti za vreme hlađenja i/ili strukturnim oštećenjima citoskeleta i/ili antioksidativnim enzimima. Pri sporom zamrzavanju formira se led, te je neophodno koristiti visoke koncentracije krioprotektora koji mogu imati toksični efekat. To se izbegava prethodnim rashlađenjem, korišćenjem manje koncentracije krioprotektora uz istovremeno povećanje brzine zamrzavanja i odmrzavanja. Za uspešan proces vitrifikacije važan je procenat intracelularne vode. Vitrifikacija velikih ćelija sa velikim sadržajem slobodne intracelularne vode (oocite, embrionalne ćelije) bez upotrebe krioprotektora, tako da ćelije ostanu u životu, za sada nije moguća. Zagrevanje male količine uzorka, velika viskoznost medijuma za zamrzavanje, velika brzina zagrevanja, male ćelije sa niskim sadržajem vode i veliki stepen kompartmanizacije, su skup uslova koji bi trebalo da omoguće ćelijama da u velikoj meri odole devitifikaciji (6).

Spermatozoide miša moguće je sačuvati istovremenim zamrzavanjem (na -80°C) i desikacijom. Ako sušenje traje 5 min uz dodatak trehaloze moguće je čuvati mišije spermatozoide do tri meseca na 4°C , i dobiti živo potomstvo ICSI tehnikom (procenat implantacije bio je 48% a živih fetusa 5%) (9).

Tečna prezervacija

"Do 1992 istraživači su pokušavali da očuvaju spermatozoide na sobnoj temperaturi ili na $0-5^{\circ}\text{C}$ ili $10-15^{\circ}\text{C}$ pomoću rastvora različitog sastava (sintetski pufri kombinovani sa šećerima ili žumancem jajeta ili njegovim frakcijama, mlekom različitih vrsta, glicinom i drugim supstancama). Nezavisno od rastvarača, njegove koncentracije i temperature čuvanja, spermatozoidi su propadali veoma brzo. Fertilizacionu sposobnost spermatozoida bilo je moguće očuvati najviše 10 dana i to posle intrauterine inseminacije" (10).

Na 5°C , u hipoosmotskom rastvoru Tris trehaloze moguće je održati veliki procenat spermatozoida pokretnim (oko 94%) do 15 dana (11). Tečna prezervacija spermatozoida svinje pomoću Modena rastvora (15% (v/v), u kojem cistein poboljšava vijabilitet i oplodnu sposobnost spermatozoida moguća je na 10°C do 22 dana (12).

Spermatozoidi miša se mogu čuvati nedelju dana na sobnoj temperaturi u KSOM-BSA hiperosmolarnom medijumu (800 mOsmol), a na -20°C do tri meseca i zadržati sposobnost oplodnje ICSI tehnikom (13).

Desikacija

Eksperimenti Meyers-a ukazuju da je moguće sačuvati spermatozoide i spermatogonije rezus majmuna desikacijom. Preživljavanje životinjskih ćelija u uslovima dehidracije zavisi od njihove sposobnosti da tokom procesa dehidracije akumuliraju disaharde unutar citoplazme, pre svega trehalozu (14).

U suvom stanju ćelije mogu da podnesu i znatno više i niže temperature. Pri procesu desikacije molekule vode zamenjuju molekuli trehaloze. Trehaloza menja temperaturu faznog prelaza membranskog dipalmitoilfosfatidil holina. Molekuli vode se pri procesu dehidracije zamenjuju molekulima trehaloze do koncentracije koja omogućava vitifikaciju - nastanak staklastog stanja koje, zbog svoje viskoznosti, blokira sve hemijske reakcije u kojima je neophodna difuzija (15). U procesu postepenog smrzavanja i isušivanja intracelularna voda se različito ponaša. Prilikom postepenog smrzavanja osmotskim mehanizmima voda se povlači iz citoplazme, ali ipak ostaje mala količina vezane vode

koja se ne zaleđuje, tako da deo proteina i lipida ostaje u hidratisanom stanju. Prilikom procesa isušivanja dolazi do uklanjanja i ove vezane vode, što za posledicu ima velike biofizičke promene proteina i lipida. Preliminarni rezultati ukazuju na to da je spermatogonije moguće desikovati na manje od 3g po gramu vode, a da one posle rehidracije zadrže vijabilnost. Ova metoda je zamišljena da bude alternativa krioprezervaciji, ali za sada ne daje dobre rezultate u prezervaciji spermatozoida (14). Upotrebom zrelih smrznutih - desikovanih spermatozoida miša, zeca i pacova (nepokretnih i nevijabilnih, ali ultrastrukturno intaktnih) primenom ICSI tehnike razvija se živo potomstvo (Kusakabe et al, 2001 po 14).

Inkapsulacija

Mikroinkapsulacija spermatozoida različitim polimerima omogućava njihovu kratkotrajnu prezervaciju.

U cilju zaštite spermatozoida od nepovoljnih uslova u uterusu (pH, leukociti koji fagocituju spermatozoide) i njihovog produženog oslobađanja u dovoljnoj koncentraciji u reproduktivnom traktu ženske jedinke, pribeglo se njihovoj inkapsulaciji. Da bi inkapsulisani spermatozoidi ostali vijabilni, neophodno je da budu ispunjeni određeni uslovi od strane polimera koji se koristi za inkapsulaciju: polimer mora da bude netoksičan, inertan, hidrofilan, permeabilan za gasove i male molekule (do 5000 D) i relativno nepropustljiv za makromolekule, kao i da obezbedi stalan i jednak pH. Na temperaturi tela (37°C), polimer mora da pređe u tečno stanje, a da na nižim temperaturama postoji u polučvrstom ili čvrstom stanju; zatim mora biti krioprezervabilan i aplikabilan. Poroznost polimera i njegova koncentracija utiču na vijabilnost spermatozoida (3). Prema Unitet States Patent 4840891 objavljenom 1989-te, u ove svrhe korišćen je u vodi nerastvorljivi, temperaturno reverzibilni hidrofilni polimer - poliuretan (RL39-41, RL39-110, RL39-111, RL39-114, RL39-117, RL39-118). Mešavina polimera, spermatozoida i medijuma se pripremi na $37-39^{\circ}\text{C}$, a zatim postepeno ohladi na sobnu temperaturu (22°C) ili dalje na $4-5^{\circ}\text{C}$ ($0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Brzina hlađenja zavisi od porekla spermatozoida (spermatozoide govečeta potrebno je sporije hladiti). Prma ovom patentu, sporije hlađenje i sporije zagrevanje obezbeđuju veći procenat pokretnih spermatozoida. Inkapsulisani spermatozoidi su potpuno imobilisani u polimeru i mogu se transportovati ili čuvati na niskim temperaturama (4°C) do trenutka upotrebe. Prilikom hlađenja polimer očvrstne i spermatozoidi ostaju nepokretni sa

minimalnim metaboličkim zahtevima, da bi prilikom prelaska polimera u tečno stanje (na 37°C) vratili svoju pokretljivost. Vidljivu pokretljivost (golim okom pod mikroskopom) spermatozoidi gube na temperaturi od 7°C (tada je polimer potpuno u gel stanju), a njihova pokretljivost se ponovo može primetiti zagrevanjem polimera na 20°C (polimer je u semigel stanju). Pokretljivost se najpre vraća spermatozoidima bliže periferiji kapsule. Vreme faznog prelaza iz čvrstog u tečno stanje (sa 4°C na 37°C) za korišćene polimere koncentracije 4% i 8% je 120 minuta. Vreme faznog prelaza iz tečnog u čvrsto stanje je 15 min (3).

Pokazalo se da 60% ovako inkapsuliranih spermatozoida miša, govečeta i čoveka zadržava vijabilnost 10 dana na temperaturi od 10°C, a 80% vraća pokretljivost posle prelaska polimera u tečno stanje. Posle 14 dana, procenat pokretljivih spermatozoida bio je 48% (3).

Tehnika elektrostatičke ekstruzije se široko primenjuje za inkapsulaciju ćelija alginatom. Alginat je biljni polimer, lako topljiv na telesnoj temperaturi (37°C). Korišćenjem ove tehnike i barijum alginata mogu se kratkotrajno čuvati spermatozoidi svinje (Conte et al, 1999. po 16). Za razliku od kalcijuma koji podstiče, barijum inhibira prevremenu kapacitaciju. Spermatozoidi svinje mogu se inkapsulisati i kalcijum alginatom umreženim polikatjonima. Podešavanjem debljine kapsule može se kontrolisati vreme oslobađanja spermatozoida, a mešavinom kapsula različite debljine kontroliše se vreme i tempo oslobađanja. Mikroinkapsulacija spermatozoida svinje alginatom, poboljšava im trajnost i fertilitet in vivo. Posle 3 dana čuvanja mikroinkapsuliranih spermatozoida svinje na 5°C, i osmočasovne inkubacije na 37°C, motilitet inkapsuliranih spermatozoida je bio značajno veći u odnosu na neinkapsulisane. Posle četiri dana čuvanja mikroinkapsuliranih i neinkapsuliranih sperma je upotrebljena za veštačku oplodnju. Nije bilo značajne razlike u stepenu koncepcije, oprasivanja i veličine okota (17). Posle krioprezervacije kalcijum alginatom inkapsulirani humani spermatozoidi imaju manju pokretljivost, ali veći vijabilitet (mereno *Spermatozoa viability kitom*) u odnosu na standardne protokole (18).

U cilju kontrolisanog oslobađanja sperme pri veštačkoj inseminaciji govečeta razvijene su dve strategije mikroinkapsulacije kalcijum alginat- ili CS-pDADMAC. CS-pDADMAC- kapsule se razlaže posle 72 sata dodavanjem prečišćene celulaze ili kapsula kalcijum alginata ispunjenih celulazom. Mikroinkapsulirani spermatozoidi mogu da se zamrzavaju (19).

Dodavanjem suspenzije nastale mešanjem hidroksipropilmetilceluloze i kalcijum hlorida svežem ejakulatu svinja u vodeni rastvor natrijum alginata, nastaju inkapsulirani spermatozoidi. Podešavanje debljine kapsule se može postići različitim koncentracijama kalcijum hlorida. Različita debljina kapsule ima uticaj na mehaničke karakteristike kapsule i dinamiku otpuštanja spermatozoida iz kapsule. Pokretljivost i srednja brzina inkapsuliranih spermatozoida manja je od istih parametara svežih (20).

ZAKLJUČAK

Savremeni koncepti očuvanja vrste i reprodukcije stvorili su potrebu za prezervacijom sperme kao strateškim resursom za veštačku oplodnju. U humanoj populaciji procenat uspenosti veštačke oplodnje je oko 30%. Trajno čuvanje (decenijama) za sada je moguće krioprezervacijom tečnim azotom. I pored brojnih prednosti, tehnika krioprezervacije ima i svoje nedostatke, a glavni nedostatak je neizbežno oštećenje spermatozoida koje nastaje pri odmrzavanju. Spermatozoidi različitih vrsta su različito osetljivi na proces zamrzavanja i odmrzavanja, te se protokoli razlikuju, u zavisnosti od vrste. Kvalitet odmrznute sperme zavisi i od kvaliteta sperme pre zamrzavanja i varira i u okviru iste jedinice. Kada je u pitanju humani materijal pokazalo se da postepeno hlađenje i odmrzavanje više nije imperativ, da spermatozoidi čoveka mogu da podnesu širi temperaturni raspon, a da zadrže oplodni potencijal. Krioprotektori deluju, uglavnom, tako što snižavaju tačku zamrzavanja intracelularne vode ili stabilizuju membrane. Jedna od mogućnosti krioprezervacije je i istovremena desikacija.

Kratkotrajna prezervacija podrazumeva tečnu prezervaciju i mikroinkapsulaciju različitim polimerima (poliuretani, kalcijum i barijum alginat). Postoje i sistemi mikroinkapsuliranih spermatozoida za njihovo kontinuirano oslobađanje u reproduktivnom traktu (što povećava procenat uspešnih veštačkih oplodnji), ali se oni za sada ne primenjuju na ljudima. Dizajniranjem karakteristika membrane mikrokapsule moguće je ostvariti željenu dinamiku otpuštanja spermatozoida. Cilj primene svih ovih tehnika je povećanje procenta uspešnih koncepcija primenom veštačke oplodnje.

Možda je alternativa tehnici krioprezervacije spermatozoida dizajniranje odgovarajuće mikrokapsule koja će omogućiti njihovo čuvanje na sobnoj temperaturi ili na +4°C.

SKRAĆENICE

- CS-pDADMAC - celuloza sulfat-poli-dialildimetil amonijum hlorid
- HSPM - human sperm preservation medium
- H-TALP medijum - HEPES-TALP medijum: (HEPES- 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan-sulfonska kiselina; TALP -Tyrode's albumin lactate pyruvate)
- ICSI - intracitoplazam sperm inection
- KSOM-BSA medijum - potassium simplex optimized medium with amino acids and bovin serum albumin
- TYB - TEST yolk buff

LITERATURA:

1. Anger TJ, Gilbert RB, Goldstein M. Cryopreservation of Sperm: Indications, Methods and Results. *J Urol* 2003; 170(4): 1079-84.
2. Marcus-Braun N, Braun G, Potashnik G and Harvardi I. Effect of cryopreservation on quality and fertilization capacity of human sperm. *E. J & Gyn and Reprodu Biol* 2004; 116(1): 63-6.
3. Van BJ. US4840891 (1989).
4. Celeghini CCE, de Arruda PR, de Andrade CFA, Nascimento J, Raphael FC Rodrigues MHP. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Anim Reprod Sci*, In Press, Corrected Proof, 2007.
5. Gillan L, Evans G, Maxwell WM. The interaction of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa with oviductal epithelial cells in vitro. *Reprod Fertil Dev* 2002; 12: 237-44.
6. Isachenko V, Sachenko E, Katkov II, et al. Cryoprotectant-Free Cryopreservation of Human Spermatozoa by Vitrification and Freezing in Vapor: Effect on Motility, DNA Integrity, and Fertilization Ability. *Biol Reprod* 2004; 71: 1167-73.
7. Hammadeh ME, Greiner S, Rosenbaum P, Schmidt W. Comparison between human sperm preservation medium and TEST-yolk buffer on protecting chromatin and morphology integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men after freeze-thawing procedure. *J Androl* 2001; 22 (6): 1012-8.
8. Centola OM, Raubertas RF, Mattox JH. Cryopreservation of Human Semen Comparison of Cryopreservatives, Sources of Variability, and Prediction of Post-thaw Survival. *J Androl* 1992; 13: 283-8.
9. McGinnis KL, Zhu L, Lawitts AJ, Bhowmick S, Toner M, Biggers DJ Mouse Sperm Desiccated and Stored in Trehalose Medium Without Freezing. *Biol Reprod* 2005; 73: 627-33.
10. Maxwell WM, Salamon S. Liquid storage of ram semen: a review. *Reprod Fertil Dev* 1993; 5(6): 613-38.
11. Lopez-Saez A, Ortiz N, Gallego L, Garde JJ. Liquid storage (50c) of ram semen in different diluents *Archives of Andrology* 2000; 44 (2, 1): 155-64.
12. Funahashi H. In vitro fertility of boar spermatozoa preserved at 10 C for 22 days. *Reprod Fertil Dev* 2004; 16(2): 255-255.
13. Van Thuan N, Wakayama S, Kishigami S, Wakayama T. New preservation method for mouse spermatozoa without freezing. *Biol Rep* 2005; 72: 444-50.
14. Meyers AM. Dry storage of sperm: applications in primates and domestic animals. *Reproduction, Fertility and Development* 2006; 18(2):1-5.
15. Holt VW. Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 1997; 9: 309-19.
16. Torre LM, Faustini M, Attilio KME, Vigo D. Cell Encapsulation in Mammal Reproduction. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation* 2007; 1: 81-5.
17. Huang SY, Tu CF, Liu SH, Kuo YH. Motility and fertility of alginate encapsulated boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 2005; 87 (1-2): 111-20.
18. Herrler A, Eisner S, Bach V, Weissenborn U, Beier HM. Cryopreservation of spermatozoa in alginate acid capsules. *Fertil Steril* 2006; 85(1): 208-13.
19. Weber W, Rimann M, Schafroth T, Witschi U, Fussenegger M. Design of high-throughput-compatible protocols for microencapsulation, cryopreservation and release of bovine spermatozoa. *J Biotechnol* 2006; 123: 155-63.
20. Torre ML, Maggi L, Vigo D, et al. Controlled release of swine semen encapsulated in calcium alginate beads. *Biomaterials* 2000; 21: 1493-98.

INSTRUKCIJE AUTORIMA ZA PRIPREMU RUKOPISA

MEDICINSKI ČASOPIS objavljuje na srpskom i engleskom jeziku originalne naučne i stručne članke, prikaze slučaja, revijske radove, pisma uredniku, prikaz objavljenih knjiga i druge medicinske informacije.

Rukopise slati na adresu:

Prof. dr Snežana Živančević Simonović

SLD Podružnica Kragujevac

VI. Zmaj Jovina 30

34000 Kragujevac

Tel. 034/372 169, tel/fax: 034/337-583

Elektronska pošta: slfskbckg@ptt.rs

Rukopise treba pripremiti u skladu sa "Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. N Engl J Med 1991; 324: 424-428." koje je propisao Međunarodni komitet izdavača medicinskih časopisa.

Originalni rukopisi će biti prihvaćeni podrazumevajući da su poslani samo MEDICINSKOM ČASOPISU. Rukopisi koji su prihvaćeni za štampu postaju vlasništvo MEDICINSKOG ČASOPISA i ne mogu se publikovati bilo gde bez pismene dozvole izdavača i glavnog urednika. MEDICINSKI ČASOPIS ne objavljuje rukopise koji sadrže materijal koji je već bio objavljivan na drugom mestu, izuzev ako je u pitanju sažetak od 400 reči najviše.

Rukopis

Rukopis treba da se pošalje u tri primerka (jedan primerak bez imena autora) otkucan na belom papiru formata A4 (21cm x 29.7cm) sa dvostrukim proredom (uključujući reference, tabele, legende za slike i fusnote) i sa marginama od 2,5 cm. Takođe treba poslati rukopis na IBM PC kompatibilnoj disketi (3.5 ili 5.25 inča) otkucan u tekst procesoru Word for Windows 2.0, 6.0 ili 7.0 ili kao ASCII datoteku.

Rukopis mora biti organizovan na sledeći način: naslovna strana, sažetak na srpskom jeziku, sažetak na engleskom jeziku, uvod, bolesnici i metodi / materijal i metodi, rezultati, diskusija, literatura, tabele, legende za slike i slike.

Svaki deo rukopisa (naslovna strana, itd.) mora početi na posebnoj strani. Sve stranice moraju biti numerisane po redosledu, počev od naslavne strane. Prezime prvog autora se mora otkucati u gornjem desnom uglu svake stranice.

Sva merenja, izuzev krvnog pritiska, moraju biti izražena u internacionalnim SI jedinicama, a ako je neophodno, i u konvencionalnim jedinicama (u zagradi). Za lekove se moraju koristiti generička imena. Zaštićena imena se mogu dodati u zagradi.

Savetujemo autore da sačuvaju bar jednu kopiju rukopisa za sebe. MEDICINSKI ČASOPIS nije odgovoran ako se rukopis izgubi u pošti.

Naslovna strana

Naslovna strana sadrži naslov rada, kratak naslov rada (do 50 slovnih mesta), puna prezimena i imena svih autora, naziv i mesto institucije u kojoj je rad izvršen, zahvalnost za pomoć u izvršenju rada (ako je ima), objašnjenje skraćenica koje su korišćene u tekstu (ako ih je bilo) i u donjem desnom uglu ime i adresu autora sa kojim će se obavljati korespondencija.

Naslov rada treba da bude sažet, ali informativan.

Ako je potrebno, može se dodati i podnaslov.

Kratak naslov treba da sadrži najbitnije informacije iz punog naslova rada, ali ne sme biti duži od 50 slovnih mesta.

Ako je bilo materijalne ili neke druge pomoći u izradi rada, onda se može sažeto izreći zahvalnost osobama ili institucijama koje su tu pomoć pružile.

Treba otkucati listu svih skraćenica upotrebljenih u tekstu. Lista mora biti uređena po azbučnom redu (ili abecednom, ako se koristi latinica) pri čemu svaku skraćenicu sledi objašnjenje. Uopšte, skraćenice treba izbegavati, ako nisu neophodne.

U donjem desnom uglu naslovne strane treba otkucati ime i prezime, telefonski broj, broj faksa i tačnu adresu autora sa kojim će se obavljati korespondencija.

Stranica sa sažetkom

Sažetak mora imati manje od 180 reči. Treba koncizno da iskaže cilj, rezultate i zaključak rada koji je opisan u rukopisu. Sažetak ne može sadržati skraćenice, fusnote i reference.

Ispod sažetka treba navesti 3 do 8 ključnih reči koje su potrebne za indeksiranje rada.

Stranica sa sažetkom na engleskom jeziku

Treba da sadrži pun naslov rada na engleskom jeziku, kratak naslov rada na engleskom jeziku, naziv institucije gde je rad urađen na engleskom jeziku, tekst sažetka na engleskom jeziku i ključne reči na engleskom jeziku.

Stranica sa uvodom

Uvod treba da bude sažet i da sadrži razlog i cilj rada.

Bolesnici i metode/materijal i metode

Treba opisati izbor bolesnika ili eksperimentalnih životinja, uključujući kontrolu. Imena bolesnika i brojeve istorija ne treba koristiti.

Metode rada treba opisati sa dovoljno detalja kako bi drugi istraživači mogli proceniti i ponoviti rad.

Kada se piše o eksperimentima na ljudima, treba priložiti pismenu izjavu u kojoj se tvrdi da su eksperimenti obavljani u skladu sa moralnim standardima Komiteta za eksperimente na ljudima institucije u kojoj su autori radili, kao i prema uslovima Helsinške deklaracije. Rizične procedure ili hemikalije koje su upotrebljene se moraju opisati do detalja, uključujući sve mere predstrožnosti. Takođe, ako je radjeno na životinjama, treba priložiti izjavu da se sa njima postupalo u skladu sa prihvaćenim standardima.

Treba navesti statističke metode koje su korišćene u obradi rezultata.

Rezultati

Rezultati treba da budu jasni i sažeti, sa minimalnim brojem tabela i slika neophodnih za dobru prezentaciju.

Diskusija

Ne treba činiti obiman pregled literature. Treba diskutovati glavne rezultate u vezi sa rezultatima objavljenim u drugim radovima. Pokušti da se objasne razlike između dobijenih rezultata i rezultata drugih autora. Hipoteze i spekulativne zaključke treba jasno izdvojiti. Diskusija ne treba da bude ponovo iznošenje zaključaka.

Literatura

Reference se u tekstu označavaju arapskim brojevima u zagradama. Brojeve dobijaju prema redosledu po kome se pojavljuju u tekstu. Personalna pisma i neobjavljeni rezultati se ne citiraju, ali se mogu pomenuti u tekstu u zagradi. Skraćenice imena časopisa treba načiniti prema skraćenicama koje se koriste u Indeks Medikusu. Reference treba navoditi na sledeći način:

Članak (svi autori se navode ako ih je šest i manje; ako ih je više, navode se samo prva tri i dodaje se "etal.")

12 - Talley NJ, Zinsmeister Ar, Schleck CD, Melton LJ III. Dispepsia and dyspeptic subgroups: A population - based study. *Gastroenterology* 1992; 102: 1259-68.

Knjiga

17 - Sherlock S. *Disease of the liver and biliary system*. 8th ed. Oxford: Blackwell Sc Publ, 1989.

Glava ili članak u knjizi

24 - Trier JJ. Celiac sprue. In: Sleisenger MH, Fordtran JS, eds. *Gastrointestinal disease*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1989: 1134-52.

Autori su odgovorni za tačnost referenci.

Tabele

Tabele se kucaju na posebnim listovima, sa brojem tabele i njenim nazivom iznad. Ako ima kakvih objašnjenja, onda se kucaju ispod tabele.

Slike i legende za slike

Sve ilustracije (fotografije, grafici, crteži) se smatraju slikama i označavaju se arapskim brojevima u tekstu i na legendama, prema redosledu pojavljivanja. Treba koristiti minimalni broj slika koje su zaista neophodne za razumevanje rada. Slike nemaju nazive. Slova, brojevi i simboli moraju biti jasni, proporcionalni, i dovoljno veliki da se mogu reprodukovati. Pri izboru veličine grafika treba voditi računa da prilikom njihovog smanjivanja na širinu jednog stupca teksta neće doći do gubitka čitljivosti. Legende za slike se moraju dati na posebnim listovima, nikako na samoj slici.

Ako je uveličanje značajno (fotomikrografije) ono treba da bude naznačeno kalibracionom linijom na samoj slici. Dužina kalibracione linije se unosi u legendu slike.

Treba poslati dva kompleta slika, u dva odvojena koverta, zaštićene tvrdim kartonom. Na pozadini slika treba napisati običnom olovkom prezime prvog autora, broj slike i strelicu koja pokazuje vrh slike.

Uz fotografije na kojima se bolesnici mogu prepoznati treba poslati pismenu saglasnost bolesnika da se one objave.

Za slike koje su ranije već objavljivane treba navesti tačan izvor, treba se zahvaliti autoru, i treba priložiti pismeni pristanak nosioca izdavačkog prava da se slike ponovo objave.

Pisma uredniku

Mogu se publikovati pisma uredniku koja se odnose na radove koji su objavljeni u **MEDICINSKOM ČASOPISU**, ali i druga pisma. Ona mogu sadržati i jednu tabelu ili sliku, i do pet referenci.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

MEDICAL JOURNAL publishes original papers, case reports, multi-center trials, editorials, review articles, letters to the Editor, other articles and information concerned with practice and research in medicine, written in the English or Serbian language.

Address manuscripts to:

Prof. dr Snezana Zivancevic Simonovic

Editor, Medical Journal

Clinical Hospital Centre

Zmaj Jovina street 30, 34000 Kragujevac

Serbia & Montenegro

Tel.: +381 34372-169, Fax: +381 34337-583

E-mail : slfskbckg@ptt.rs

Manuscripts are prepared in accordance with "Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals" developed by the international committee of medical journal editors (N Engl J Med 1991; 324: 424-428). Consult these instructions and a recent issue of *Medical Journal* in preparing your manuscript.

Original manuscripts will be accepted with the understanding that they are solely contributed to *Medical Journal*. Manuscripts, accepted for publication, become the property of the Journal, and may not be published elsewhere without written permission from both the editor and publisher. The Journal does not publish papers containing material that has been published elsewhere except as an abstract of 400 words or less; previous publication in abstract form must be disclosed in a footnote.

Manuscript

Three complete sets of the manuscript (one of them without names of authors) are typed *double-spaced* throughout (including references, tables, figure legends and footnotes) on A4 (21 em x 29,7 cm) paper with wide margins. Manuscript should be sent also on IBM compatible floppy disc (either 3.5" or 5.25") written in Word 2.0, 6.0 or ASCII FILE.

The manuscript should be arranged as following: title page, abstract, introduction, patients and methods / material and methods, results, discussion, references, tables, figure legends and figures.

Each *manuscript component* (title page, etc.) begins on a separate page. All pages are numbered consecutively beginning with the title page. The first author's last name is typed at the top right corner of each page.

All measurements, except blood pressure, are reported in the System International (SI) and, if

necessary, in conventional units (in parentheses). Generic names are used for drugs. Brand names may be inserted in parentheses.

Authors are advised to retain extra copies of the manuscript. *Medical Journal* is not responsible for the loss of manuscripts in the mail.

Title page

The title page contains the title, short title, full names of all the authors, names and full location of the department and institution where work was performed, acknowledgments, abbreviations used, and name of the corresponding author.

The title of the article is concise but informative, and it includes animal species if appropriate. A subtitle can be added if necessary.

A short title of less than 50 spaces, for use as a running head, is included.

A brief acknowledgment of grants and other assistance, if any, is included.

A list of abbreviations used in the paper, if any, is included. List abbreviations alphabetically followed by an explanation of what they stand for. In general, the use of abbreviations is discouraged unless they are essential for improving the readability of the text.

The name, telephone number, fax number, and exact postal address of the author to whom communications and reprints should be sent, are typed at the lower right corner of the title page.

Abstract page

An abstract of less than 180 words concisely states the objective, findings, and conclusion of the studies described in the manuscript. The abstract does not contain abbreviations, footnotes or references.

Below the abstract, 3 to 8 keywords or short phrases are provided for indexing purposes.

Introduction page

The introduction is concise, and states the reason and specific purpose or the study.

Patients and methods / Material and methods

The selection of patients or experimental animals, including controls is described. Patients' names and hospital numbers are not used.

Methods are described in sufficient detail to permit evaluation and duplication of the work by other investigators.

When reporting experiments on human subjects, it should be indicated whether the procedures followed

were in accordance with ethical standards of the Committee on human experimentation of the institution in which they were done and in accordance with the Declaration of Helsinki. Hazardous procedures or chemicals, if used, are described in detail, including the safety precautions observed. When appropriate, a statement is included verifying that the care of laboratory animals followed the accepted standards.

Statistical methods used, are outlined.

Results

Results are clear and concise, and include a minimum number of tables and figures necessary for proper presentation.

Discussion

An exhaustive review of literature is not necessary. The major findings should be discussed in relation to other published works. Attempts should be made to explain differences between results of the present study and those of the others. The hypothesis and speculative statements should be clearly identified. The discussion section should not be a restatement of results, and new results should not be introduced in the discussion.

References

References are identified in the text by Arabic numerals in parentheses. They are numbered consecutively in the order in which they appear in the text. Personal communications and unpublished observations are not cited in the reference list, but may be mentioned in the text in parentheses. Abbreviations of journals conform to those in *Index Medicus*. The style and punctuation conform to the *Medical Journal* style requirements. The following are examples:

Article (all authors are listed if there are six or fewer; otherwise only the first three are listed followed by "et al.")

12 - Talley NJ, Zinsmeister Ar, Schleck CD, Melton U II/. Dyspepsia and dyspeptic subgroups: A population-based study. *Gastroenterology* 1992; 102: 1259-6K

Book

17 - Sherlock S. Diseases of the liver and biliary system. 8th ed. Oxford: Blackwell Sc Publ. 1989.

Chapter or article in a book

24 - Trier JJ. Celiac sprue. In: Sleisenger MH, Fordtran J5, eds. *Gastro-intestinal disease*. 4 th ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1989: 1134-52.

The authors are responsible for the exactness of reference data.

Tables

Tables are typed on separate sheets with figure numbers (Arabic) and title above the table and explanatory notes, if any, below the table.

Figures and figure legends

All illustrations (photographs, graphs, diagrams) are to be considered *figures*, and are numbered consecutively in the text and figure legend in Arabic numerals. The number of figures included is the least required to convey the message of the paper, and no figure duplicates the data presented in the tables or text. Figures do not have titles. Letters, numerals and symbols must be clear, in proportion to each other, and large enough to be readable when reduced for publication. Figures are submitted as near to their printed size as possible. Figures are reproduced in one of the following width sizes: 8 cm, 12 cm or 17 cm, and with a maximal length of 20 cm. Legends for figures should be given on separate pages.

If magnification is significant (photomicrographs), it is indicated by a calibration bar on the print, not by a magnification factor in the figure legend. The length of the bar is indicated on the figure or in the figure legend.

Two complete sets of high quality unmounted glossy prints are submitted in two separate envelopes, and shielded by an appropriate cardboard. The backs of single or grouped illustrations (plates) bear the first author's last name, figure number, and an arrow indicating the top. This information is penciled in lightly or placed on a typed self-adhesive label in order to prevent marking the front surface of the illustration.

Photographs of identifiable patients are accompanied by written permission from the patient.

For figures published previously, the original source is acknowledged, and written permission from the copyright holder to reproduce it is submitted.

Color prints are available by request at the author's expense.

Letters to the Editor

Both letters concerning and those not concerning the articles that have been published in *Medical Journal* will be considered for publication. They may contain one table or figure and up to five references.

Proofs

All manuscripts will be carefully revised by the publisher's desk editor. Only in case of extensive corrections will the manuscript be returned to the authors for final approval. In order to speed up the publication no proof will be sent to the authors but will be read by the editor and the desk editor.



**XXXIII
OKTOBARSKI
ZDRAVSTVENI DANI**

Poštovane kolege,

XXXIII Oktobarski zdravstveni dani će se održati 23. i 24. oktobra 2008. godine u organizaciji Srpskog lekarskog društva, Okružne podružnice Kragujevac.

Teme ovogodišnjeg stručnog sastanka su:

- 1. Oksidativni stres*
- 2. Medicina u trećem životnom dobu*
- 3. Psihijatrija u drugim granama medicine*
- 4. Slobodne teme*

U okviru ovogodišnjeg stručnog skupa biće održan i:

Edukativni seminar

Molimo Vas da radove za XXXIII Oktobarske zdravstvene dane prijavite najkasnije do 1. septembra 2008. godine. Prihvaćeni radovi će biti prikazani u obliku usmenih saopštenja ili poster prezentacija.

Uputstvo za prijavu rada:

Neophodno je da sažetak bude otkucan na kompjuteru (preporučuje se font Times New Roman, veličina slova 11pt i jednostruki prored). Sažetak terba da se uklopi u pravougaonik promera 14x20cm. U prvom redu napisati naslov (velikim slovima), u novom redu imena autora i institucija. Preporučuje se da sažetak sadrži sledeće celine: kratak uvod, ciljeve i zadatke istraživanja, materijal i metode, rezultate (bez tabela ili grafikona) i zaključak. Na kraju ukucati 2-3 ključne reči.

CIP - Katalogizacija u publikaciji
Narodna biblioteka Srbije, Beograd

61

MEDICINSKI časopis = Medical journal /
glavni i odgovorni urednik Snežana Živančević
Simonović. - God. 1, br. 1/2 (1961)- . -
Kragujevac (Zmaj Jovina 30) : Srpsko lekarsko
društvo. Okružna podružnica Kragujevac, 1961-
(Kragujevac : Spektar 7). - 24 cm

Polugodišnje

ISSN 0350-1221 = Medicinski časopis

COBISS.SR-ID 81751559