

Regenerativni učinak matičnih stanica oralne sluznice na hipoksijski oštećene neurone in vitro

Stančin, Paula

Doctoral thesis / Disertacija

2025

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:577333>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-03**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Paula Stančin

**Regenerativni učinak
matičnih stanica oralne sluznice
na hipoksijski oštećene neurone
in vitro**

DISERTACIJA



Zagreb, 2025.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Paula Stančin

**Regenerativni učinak
matičnih stanica oralne sluznice
na hipoksijski oštećene neurone
in vitro**

DISERTACIJA

Zagreb, 2025.

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za matične stanice Hrvatskog instituta za istraživanje mozga na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Dinko Mitrečić

Doktorska disertacija je izrađena u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost: „Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“, pod mentorstvom prof. dr. sc. Dinka Mitrečića.

Zahvaljujem mentoru, prof.dr.sc. Dinku Mitrečiću, čija stručnost, strpljenje i podrška su bili ključni za izradu ovog rada i mog akademskog razvoja.

Hvala profesorima i kolegama sa Zavoda za Histologiju i Embriologiju te Hrvatskog Instituta za Istraživanje Mozga koji su tijekom mog obrazovanja dijelili svoje znanje, ideje i trenutke podrške. Veliko hvala ekipi iz kuhinje za jutarnje kave i lijepe zajedničke trenutke.

Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima na ljubavi, podršci i vjeri u mene.

Na kraju, najveća zahvala mom zaručniku Mihaelu na beskrajnom strpljenju, ljubavi i ohrabrenju. Tvoj osmijeh, riječi podrške i razumijevanje bili su svjetlo u trenucima sumnje i umora. Ovo postignuće dijelim s tobom jer si bio uz mene na svakom koraku ovog putovanja.

Ovaj doktorat posvećujem svima vama koji ste vjerovali u mene čak i kada ja nisam.

Hvala vam !

SADRŽAJ

1. UVOD I SVRHA RADA	1
1.1. Matične stanice	2
1.1.1. Embrionalne matične stanice.....	4
1.1.2. Adultne matične stanice	5
1.1.3. Inducirane pluripotentne matične stanice.....	6
1.2. ORALNA ŠUPLJINA	8
1.2.1. Funkcija oralne sluznice	9
1.2.2. Matične stanice oralne sluznice	10
1.2.3. Podrijetlo matičnih stanica oralne sluznice.....	13
1.3. MATIČNE STANICE U LIJEČENJU I ISTRAŽIVANJU	16
1.3.1. Napredne terapije matičnim stanicama	18
1.3.2. Matične stanice i neurodegenerativne bolesti.....	21
1.4. HIPOKSIJSKA OZLJEDA	22
2. HIPOTEZA	24
3. CILJEVI RADA	25
3.1. Opći cilj.....	25
3.2. Specifični ciljevi.....	25
4. MATERIJALI I METODE.....	26
4.1. Postupci sa stanicama	26
4.1.1. Biopsija tkiva oralne sluznice čovjeka	26
4.1.2. Izolacija stanica iz tkiva oralne sluznice čovjeka	26
4.1.3. Disocijacija matičnih stanica oralne sluznice.....	27
4.1.4. Zamrzavanje matičnih stanica oralne sluznice	28
4.1.5. Odmrzavanje matičnih stanica oralne sluznice.....	29
4.1.6. Kultura neurona	30
4.1.8. Nasađivanje za diferencijaciju.....	30
4.2. Fiksacija stanica za imunocitokemiju.....	32
4.3. Imunocitokemija (ICC).....	33
4.4. Izolacija proteina iz stanica i mjerenje koncentracije proteina Bradfordovom metodom	35
4.5. Izolacija ukupne RNA.....	36
4.6. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu	37
(RT-PCR)	37
4.7. Model izlaganja hOMSC i iPSC stanica uvjetima anoksije.....	39
4.8. Model deprivacije kisika i glukoze (OGD) i reoksigenacija oštećenih neurona pomoću hOMSC i kondicioniranog medija	40
4.9. Statistička obrada rezultata	42
5. REZULTATI.....	43

5.1.	Uspostava učinkovitog protokola izolacije homogene populacije ljudskih matičnih stanica oralne sluznice	43
5.1.1.	Morfologija matičnih stanica oralne sluznice	46
5.2.	Izražaj biljega matičnosti <i>NESTIN</i> i <i>SOX2</i> u matičnim stanicama oralne sluznice	48
5.3.	Diferencijacija matičnih stanica oralne sluznice	54
5.4.	Otpornost matičnih stanica oralne sluznice u uvjetima anoksije.....	58
5.5.	Utjecaj trajanja ko-kulture hOMSC i zrelih neurona na genski izražaj hOMSC-a 61	
5.6.	Utjecaj matičnih stanica oralne sluznice i njihovog kondicioniranog medija na hipoksijski oštećene neurone in vitro	67
6.	<i>RASPRAVA</i>	73
6.1.	Važnost standardizacije protokola izolacije stanica	73
6.2.	Karakterizacija matičnih stanica	75
6.3.	Diferencijacija matičnih stanica oralne sluznice (hOMSC) u sferne nakupine s neuralnim obilježjima	78
6.4.	Usporedba preživljavanja hOMSC i iPSC u anoksičnim uvjetima	82
6.5.	Učinci matičnih stanica oralne sluznice (hOMSC) i njihovog kondicioniranog medija na preživljenje hipoksijski oštećenih neurona in vitro	85
7.	<i>ZAKLJUČAK</i>	88
8.	<i>SAŽETAK</i>	89
9.	<i>SUMMARY</i>	90
10.	<i>LITERATURA</i>	91
11.	<i>ŽIVOTOPIS</i>	106

Popis oznaka i kratica

ALS – amiotrofična lateralna skleroza (engl. *amyotrophic lateral sclerosis*)

AMS – adultne matične stanice

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol

DFSC – matične stanice zubnog folikula (engl. *dental follicle stem cells*)

DMSO- dimetil-sulfoksid (engl. *dimethyl-sulphoxide*)

DPSC – matične stanice pulpe zuba (engl. *dental pulp stem cells*)

EMA – Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*)

EMS – embrionalne matične stanice

ER – endoplazmatski retikulum

FBS – fetusni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum*)

FDA – Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*)

FGF – fibroblastni čimbenik rasta (engl. *fibroblast growth factor*)

GVSD – (engl. *graft versus host disease*)

HIE – hipoksijsko-ishemijska encefalopatija (engl. *hypoxic-ischemic encephalopathy*)

hOMSC – ljudske matične stanice oralne sluznice (engl. *human oral mucosa stem cells*)

ICC – imunocitokemija (engl. *immunocytochemistry*)

iPSC – inducirane pluripotentne matične stanice (engl. *induced pluripotent stem cells*)

ISCT – Internacionalno društvo za staničnu terapiju (engl. *The International Society for Cellular Therapy*)

KFDA – Korejska agencija za hranu i lijekove (engl. *Korea Food & Drug Administration*)

KMS – krvotvorne matične stanice

LDH – laktat dehidrogenaza

MSS – mezenhimalne stromalne stanice (engl. *mesenchymal stromal cells*)

NCC – stanice neuralnog grebena (engl. *neural crest cells*)

NCSC – matične stanice neuralnog grebena (engl. *neural crest stem cells*)

OGD – deprivacija kisika i glukoze (engl. *oxygen-glucose deprivation*)

OMLPC – stanice lamine proprije oralne sluznice (engl. *oral mucosa lamina propria cells*)

PBS – fiziološka otopina puferirana fosfatom (engl. *phosphate-buffered saline*)

PDL - poli-D-lizin (engl. *Poly-D-Lysine*)

PDLSC – matične stanice peridontalnog ligamenta (engl. *peridontal ligament stem cells*)

PFA- paraformaldehid (engl. *Paraformaldehyde*)

PMDAJ – Japanska agencija za farmaceutske i medicinske potrepštine (engl. *Pharmaceuticals and Medical Devices Agency in Japan*)

PSC – pluripotentne matične stanice (engl. *pluripotent stem cells*)

RT-PCR- lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *Real-time polymerase chain reaction*)

SCAP – matične stanice apikalne papile (engl. *stem cells from apical papila*)

SHED – matične stanice mliječnih zuba (engl. *stem cells from exfoliated deciduous teeth*)

SOX2 – biljeg matičnih stanica (engl. *SOX-Box Transcription Factor 2*)

ŽMS – živčane matične stanice

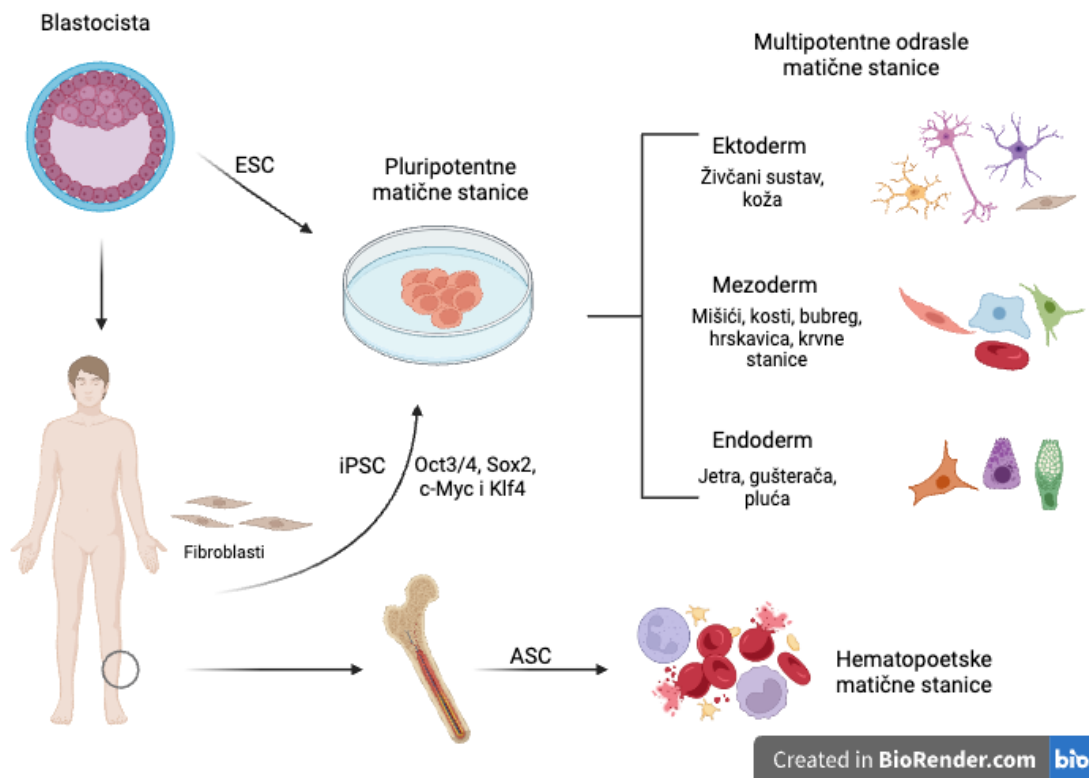
1. UVOD I SVRHA RADA

Matične stanice u posljednjih dvadesetak godina pobuđuju veliko zanimanje ne samo znanstvenika nego i opće populacije. Ono što je uveliko utjecalo na razvoj ovog istraživačkog polja je izolacija i generacija matičnih stanica (1). U proteklih nekoliko godina, provedena su brojna klinička istraživanja s ciljem pronalaženja načina primjene matičnih stanica u liječenju poremećaja i oštećenja živčanog sustava. Živčane matične stanice (ŽMS) su najbolji izbor za regeneraciju živčanog sustava, a jedan od razloga je što se mogu diferencirati u zrele funkcionalne neurone. Ipak njihova primjena je ograničena raznim čimbenicima kao što su otežano mjesto izolacije, ograničen broj stanica, dugo uzgajanje u kulturi *in vitro* i etičke nesuglasice oko izvora dobivanja ovih stanica. Stoga su se znanstvenici okrenuli traženju novih izvora matičnih stanica koje imaju potencijal za primjenu u liječenju bolesti (2). Mezenhimske stromalne stanice (MSS) su se u tom pogledu pokazale kao jako dobar izbor. Mogu se diferencirati u stanice slične neuronima i glija stanicama u uvjetima *in vitro* te izlučuju brojne čimbenike koji doprinose obnovi tkiva (3). Ovo istraživanje usmjereno je na novije otkrivene mezenhimske stanice oralne sluznice koje su ektodermalnog podrijetla i potječu iz neuralnog grebena. Oralna sluznica potencijalno je bogat izvor matičnih stanica koje se mogu prikupiti relativno jednostavnim postupkom. Budući da se radi o stanicama s visokim diferencijacijskim potencijalom, a razmjerno ih je lako dobiti, predstavljaju vrlo dostupan izvor za potencijalnu terapijsku primjenu. Ipak, unatoč velikom potencijalu, ne postoji standardizirani protokol za izolaciju stanica niti je jasno definirano koje su točno populacije i subpopulacije stanica korištene. Tako u znanstvenoj literaturi možemo naići na različite protokole za izolaciju matičnih stanica oralne sluznice (4). Upravo zbog svega navedenog cilj ove disertacije je okarakterizirati populaciju stanica dobivenu biopsijom oralne sluznice za koju se pretpostavlja da nudi velike mogućnosti u liječenju bolesti živčanog sustava.

1.1. Matične stanice

Matične stanice predstavljaju heterogenu skupinu nediferenciranih stanica koje se pojavljuju tijekom embrionalnog i fetalnog razvoja koje postoje i u odraslih jedinki. Odlikuju se trima ključnim obilježjima: sposobnošću samoobnove, klonalnošću i potentnošću. Samoobnova omogućuje njihovo dijeljenje i stvaranje novih matičnih stanica, klonalnost osigurava genetsku identičnost dok im potentnost omogućuje diferencijaciju u razne vrste stanica i tkiva. (5). Njihova izuzetna svojstva čine ih glavnim izvorom za obnovu stanica raznih tkiva u ljudskom organizmu. Važno je napomenuti da se obilježja matičnih stanica razlikuju ovisno o njihovom podrijetlu i stupnju potentnosti. Kroz ove varijacije, matične stanice pružaju važan doprinos procesima regeneracije, održavajući ravnotežu i funkcionalnost organizma (6,7).

Postoji niz različitih vrsta matičnih stanica koje se mogu klasificirati prema njihovom podrijetlu i stupnju potentnosti (Slika 1.). Kada razmatramo podrijetlo matičnih stanica, možemo ih razvrstati u **embrionalne matične stanice** (EMS) i **adultne matične stanice** (AMS). Uzimajući u obzir i tehnike genetske manipulacije na taj popis dodajemo **inducirane pluripotentne matične stanice** (iPSC, eng. *induced pluripotent stem cells*) (8,9). S obzirom na stupanj potentnosti, odnosno njihov kapacitet za diferencijaciju, matične stanice se dalje mogu podijeliti na **totipotentne**, **pluripotentne**, **multipotentne**, **oligopotentne** i **unipotentne** matične stanice (10). Kroz ovu raznolikost kategorija, povećava se naše razumijevanje kompleksnosti i raznolikosti matičnih stanica što je ključno za njihovu primjenu u različitim biomedicinskim kontekstima.



Slika 1. Različita podrijetla i stupnjevi potentnosti matičnih stanica. Embrionalne matične stanice (ESC) se izoliraju iz blastociste koja predstavlja rani stadij razvoja embrija. One imaju sposobnost diferencijacije u sva tri zametna listića; ektoderm, mezoderm i endoderm i zbog toga imaju pluripotentnu sposobnost. Inducirane pluripotentne matične stanice (iPSC) dobivamo pomoću 4 “Yamanakina” faktora reprogramiranjem fibroblasta. Odrasle matične stanice (ASC) su multipotentne i njih možemo danas naći u većini tkiva i organa. Slika izrađena u programu BioRender.

1.1.1. Embrionalne matične stanice

Embrionalne matične stanice (EMS) su posebna kategorija pluripotentnih matičnih stanica koje su izolirane iz tkiva epiblasta, središnje unutrašnje mase stanica blastociste. Blastocista predstavlja rani razvojni stadij embrija, starosti oko 4 do 5 dana. Prvi put su embrionalne matične stanice izolirane, identificirane i uzgojene 1981. godine iz blastociste miša za što je znanstvenik Martin Evans dobio Nobelovu nagradu (11). Njihovo otkriće otvorilo je vrata za razvoj genetski modificiranih miševa. Interes za proučavanjem svojstava matičnih stanica povećao se kada je znanstvenik James Thomson uspješno izolirao ljudske embrionalne matične stanice iz središnje mase blastociste (12,13). Ovo je uveliko otvorilo vrata istraživanjima i proučavanjima modela bolesti kod čovjeka i razvoju novih terapija.

EMS su pluripotentne matične stanice. Njih obilježava sposobnost neograničenog rasta i diferencijacije u sva tri zametna listića: ektoderm, mezoderm i endoderm. Genski elementi održavanja njihove pluripotentnosti su transkripcijski faktori *OCT4*, *NANOG* i *SOX2* koji inhibiraju gene koji dovode do diferencijacije te na taj način čuvaju pluripotentnost stanica (14,15). Dodatno, površinski proteini poput SSEA3 i SSEA4 (glikolipidi) igraju važnu ulogu u identifikaciji i karakterizaciji ovih stanica (16).

Tijekom embrionalnog razvoja, EMS imaju važnu ulogu u izgradnji raznovrsnih tkiva i organa te u konačnici izgradnji cijelog organizma (17). Njihovo obilježje pluripotentnosti čini ih ključnima u razumijevanju i manipulaciji procesima razvoja ljudskog tijela u biomedicinskom istraživanju.

1.1.2. Adultne matične stanice

Adultne matične stanice (AMS) ili tkivno specifične matične stanice, specifična su vrsta matičnih stanica prisutna u tijelu odraslih ljudi. Za razliku od EMS-a koje se nalaze u embrionalnom tkivu, adultne matične stanice prisutne su u tkivima odrasle osobe tijekom cijelog života (18). One su jedina vrsta matičnih stanica koje su uspješno korištene u liječenju pacijenata. Posljednjih godina u svijetu je milijun ljudi oboljelih od raznih oblika hematoloških bolesti liječeno terapijama koje se zasnivaju na primjeni adultnih matičnih stanica (19,20). AMS mogu biti multipotentne što znači da u odnosu na pluripotentne stanice, imaju ograničeni potencijal za diferencijaciju. Ove stanice imaju važnu ulogu u procesima obnove i popravka oštećenih ili izgubljenih stanica u tijelu, održavanju ravnoteže i obnove tkiva tijekom života (21). U usporedbi s EMS, one su dostupne tijekom života, nema etičkih dvojbi vezano uz njihovo korištenje i izolaciju što je dovelo do razvoja mnogih kliničkih istraživanja (22).

Aktivnost AMS pokazana je u mnogim tkivima i organima, ali točna lokacija, odnosno niša AMS-a nije uvijek jasna zbog trenutnog nedostatka jasno definiranih tkivno specifičnih biljega koji bi ih identificirali (23). Tako su primjerice neka od tkiva gdje ih možemo pronaći u koštanoj srži, koži, jetri, srcu, mozgu i oralnoj sluznici. Kao što se i očekivalo, otkriće odraslih matičnih stanica potaknulo je istraživače da ispituju potencijal tih stanica u regenerativnoj medicini (24).

Najbolje opisana i proučena vrsta AMS-a su matične stanice koštane srži koje se nazivaju **krvotvorne matične stanice (KMS)**. Iz njih nastaju sve stanice krvne loze procesom hematopoeze, poput crvenih krvnih stanica (eritrociti), bijelih krvnih stanica (leukociti) i pločastih krvnih stanica (trombociti) periferne krvi (25,26). One su ujedno i prototip multipotentnih matičnih stanica odraslog tkiva. Ovu vrstu stanica nalazimo u koštanoj srži, perifernoj krvi te krvi iz pupkovine. Mezodermalnog su podrijetla te tijekom embrionalnog razvoja prvo se smještaju u žumanjčanoj vreći, zatim u fetalnoj jetri i potom u koštanoj srži (27).

Mezenhimske stromalne stanice (MSS) su još jedan primjer AMS mezenhinskog podrijetla. Mezenhim je embrionalno vezivno tkivo iz kojeg se razvijaju sve ostale vrste vezivnog i potpornog tkiva poput hrskavice, kostiju, krvnih žila (28). Osim u stromi koštane srži, MSS možemo pronaći i u masnom tkivu, koži i oralnoj sluznici (29). Zbog svoje sposobnosti samobnavljanja, diferencijacijskog potencijala i imunomodulatornih značajki koje ispoljavaju u uvjetima *in vitro*, MSS su postale fokus mnogih kliničkih istraživanja (30).

1.1.3. Inducirane pluripotentne matične stanice

Sve donedavno, embrionalne matične stanice (EMS) bile su jedini temeljito proučeni izvor pluripotentnih stanica. Ipak, mnogi su se suprotstavljali njihovoj upotrebi zbog etičkih dilema koje proizlaze iz činjenice da se ljudski embriji moraju žrtvovati kako bi se ove stanice izolirale (31). Godine 2006. japanski znanstvenik Yamanaka i njegovi suradnici objavili su rad u kojem su pokazali kako je moguće reprogramirati mišje stanice fibroblasta (stanice vezivnog tkiva) u pluripotentne stanice pomoću četiri specifična transkripcijska faktora. Riječ je o Oct3/4, Sox2, c-Myc i Klf4 koji su danas poznati kao "Yamanakini faktori". Tako dobivene stanice mogle su diferencirati u sva 3 zametna listića (endoderm, mezoderm, ektoderm) što je ujedno i obilježje pluripotentnosti (32). Godinu dana kasnije, na isti način uspješno su reprogramirali i ljudske fibroblaste (33). Yamanakino otkriće je tako predstavilo novu vrstu pluripotentnih matičnih stanica bez potrebe za korištenjem ljudskih embrija. Nazavane su **inducirane pluripotentne matične stanice (iPSC, eng. *induced pluripotent stem cells*)**. Zbog ovog otkrića, Yamanaka je dobio Nobelovu nagradu iz područja fiziologije i medicine 2012. godine (34). Ovo značajno otkriće u svijetu biomedicine, ne samo da je otvorilo nova vrata u biomedicinskim istraživanjima i mogućnostima liječenja mnogih bolesti, već je i umanjilo etičke probleme u medicini vezane uz primjenu EMS-a (35,36).

Pomoću iPSC-a, uspješno su uzgojeni *in vitro* trodimenzionalni modeli (organoidi) koji odražavaju staničnu heterogenost, strukturu i funkciju primarnih tkiva. Samim time, omogućeno je da se rekonstruiraju ljudski organi (37). Organoidi omogućuju bolji uvid u proučavanje ljudskih bolesti s primjenom u regenerativnoj medicini, ispitivanju lijekova i personaliziranom liječenju pacijenata (38). Do sada su uspješno uzgojeni cerebralni organoidi (39), organoidi jetre (40) i organoidi srca (41).

1.2. ORALNA ŠUPLJINA

Oralna (usna) šupljina predstavlja početni dio probavnog, a dijelom i dišnog sustava. Ima vitalnu ulogu u nizu fizioloških procesa, uključujući prehrambene funkcije, žvakanje, gutanje i govor (42). Oralna šupljina sastoji se od dva dijela; vanjskog vestibula, ograničenog usnama i obrazima te unutarne šupljine koja je odvojena od vestibula alveolama koje nose zube i desni. Gornji dio unutrašnje oralne šupljine oblikuje tvrdo nepce i meko nepce, donji dio čine baza jezika i dno usta, a sa stražnje strane je omeđena tonzilama i grlom (43). Oralnu šupljinu u potpunosti oblaže oralna sluznica. Sastavljena od višeslojnog neoroženog pločastog epitela, oralna sluznica je direktno povezan s rahlim vezivnim tkivom, *lamina propria* (44).

Epitel oralne sluznice potječe od ektoderma, dok se epitel jezika razvija iz endoderma i ektoderma (45). Stanice koje izgrađuju epitel nazivamo keratinociti. Njih možemo po građi, obliku i funkciji podijeliti u gradivne slojeve epitela. Epitel oralne šupljine ima četiri jasna sloja, a to su: *stratum germinativum* (bazalni sloj), *stratum spinosum* (trnasti sloj), *stratum granulosum* (zrnati sloj) i *stratum corneum* (rožnati sloj). Navedeni se slojevi razlikuju u svojoj građi što se očituje u obliku stanica, broju redova stanica i funkciji koju pojedini sloj ima (46).

Lamina propria je vezivno tkivo koje se nalazi neposredno ispod epitela. Sastoji se od fibroznog tkiva, bogatog elastičnim vlaknima. Rastezanje tijekom žvakanja, govora i gutanja, omogućavaju i olakšavaju upravo elastična vlakna. *Lamina propria* dijeli se na površinski papilarni sloj i dublji retikularni sloj. Korium i submukoza čine vezivno tkivo oralne sluznice. Korium je svojom bazalnom membranom povezan s višeslojnim pločastim epitelom te tako daje čvrstoću oralnoj sluznici (47,48). Većina vezivnog tkiva nastaje iz neuralnog grebena pa tako i vezivno tkivo oralne sluznice, *lamina propria* (49). Kod odraslih se derivati stanica neuralnog grebena (NCDC, engl. *neural crest derived cells*) zadržavaju s netaknutom funkcijom i promoviraju regeneraciju tkiva prilikom ozljede ili stresa. Njihova niša je raznovrsna. Na području glave ona uključuje oralnu šupljinu, nosnu šupljinu i dlačne folikule kose (50).

1.2.1. Funkcija oralne sluznice

Oralna sluznica ima raznolike funkcije. One uključuju zaštitu tkiva submukoze od različitih mehaničkih, kemijskih i bioloških podražaja. Odgovorna je za izlučivanje tvari potrebnih za oralno zdravlje, te ima važnu senzornu funkciju koja omogućuje osjet temperature, dodira, boli i okusa. Predstavlja mjesto prvog susreta tvari iz vanjskog svijeta, poput alergena i mikroba koje kroz hranu, vodu, zrak unosimo u organizam (51,52). Oralna barijera, zajedno sa slinom i oralnom mikroflorom, pruža zaštitu od patogenih mikroorganizama i brz imunološki odgovor. Kroz ove funkcije, oralna sluznica igra ključnu ulogu u održavanju cjelokupnog zdravlja oralne šupljine. Lako je dostupna pregledu, a na njoj se mogu očitovati bolesti različitih organa i sustava ili se primarno javljati bolesti oralne sluznice (53,54). Ipak, mehanizmi pomoću kojih tkiva oralne sluznice tumače i reagiraju na okolišne znakove još uvijek su u velikoj mjeri neodređeni. Stoga proučavanje ovog izuzetno izloženog i otpornog tkiva čini ga interesantnim i važnim u daljnjim medicinskim istraživanjima.

Prema funkciji oralnu sluznicu možemo podijeliti na oblažuću, žvačnu ili mastikatornu i visoku specijaliziranu sluznicu (dorzum jezika).

Oblažuća sluznica je najrasprostranjenija. Čini oko 60% ukupne površine oralne šupljine. Oblaže usne, predvorje, obraze, donju stranu jezika, meko nepce i dno usta. Važna je jer pruža fleksibilnost tokom žvakanja, gutanja i govora. Ova vrsta sluznice ima vrlo tanak ili nepostojeći keratinski sloj, a *lamina propria* je elastična što omogućuje veću apsorpcijsku površinu (55).

Žvačna ili mastikatorna sluznica, prekriva dijelove sluznice gingive i tvrdog nepca. Zauzima 25% ukupne površine oralne šupljine. Dizajnirana je da podnosi veća mehanička oštećenja i pritiske. Za razliku od oblažuće sluznice, žvačna sluznica ima deblji keratinizirani sloj i čvrstu *laminu propriju*. Sastavljena je od tankih pločastih stanica bez jezgre (56).

Visoko specijalizirana sluznica nalazi se na dorzumu jezika i pokriva 15% ukupne površine oralne šupljine. Njezina glavna funkcija je osjetilna. Sadrži osjetilne papile koje prenose informacije o okusu, dodiru, boli, temperaturi i kvaliteti tvari. Tim informacijama omogućuju pravovremenu zaštitu organizam. Histološki, ova

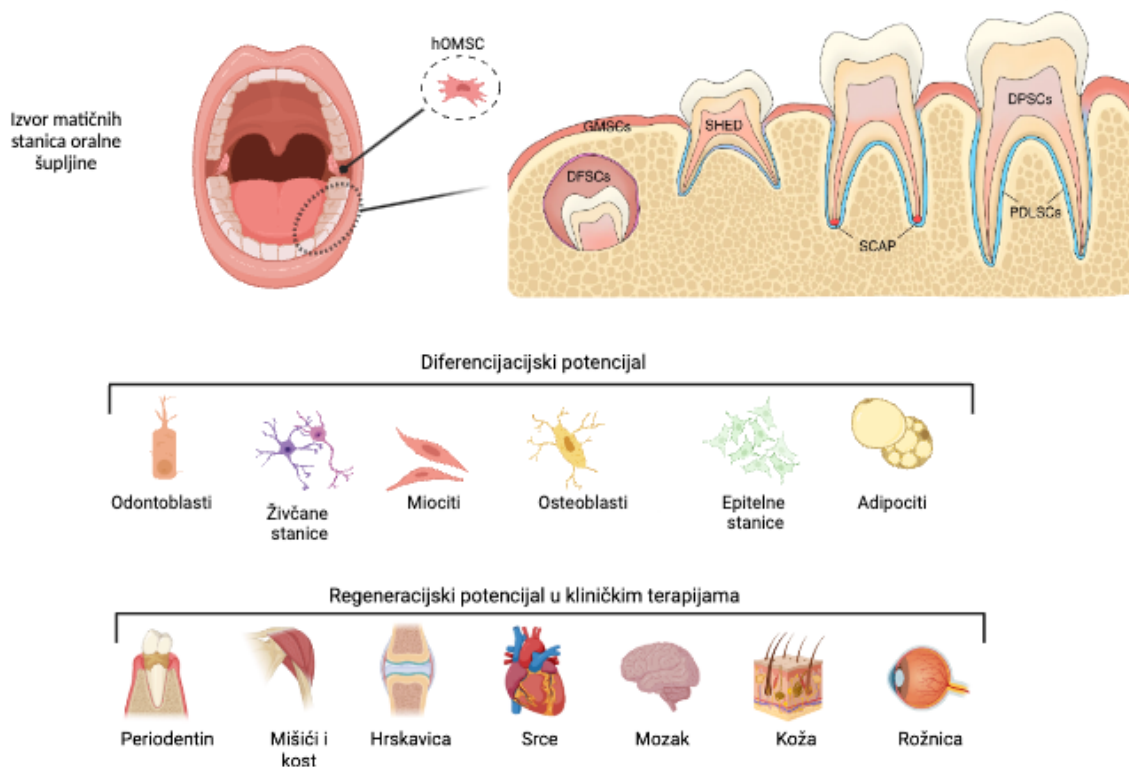
sluznica podsjeća na mozaik keratiniziranog i nekeratiniziranog epitela koji sadrži jezične papile s okusnim pupoljcima (57).

1.2.2. Matične stanice oralne sluznice

Izuzetna sposobnost regeneracije oralne šupljine kod odraslog čovjeka ukazuje na postojanje robusne populacije stanica. Matične stanice oralne šupljine nalaze se na više različitih mjesta (Slika 2.). Tako se mogu naći u pulpi zuba, sluznici, apikalnoj papili, zubnom mesu (gingivi), mliječnim zubima i paradontnom ligamentu (58). Marynka-Kalmani i suradnici (59) su prvi identificirali postojanje mezenhimskih stromalnih stanica (MSS) u oralnoj sluznici. Opisali su ih kao stanice koje su fenotipski slične stanicama neuralnog grebena (59). Danas u matične stanice oralne sluznice (OMSC, engl. *oral mucosa stem cells*) svrstavamo matične stanice pulpe zuba (DPSC, engl. *dental pulp stem cells*), matične stanice mliječnih zuba (SHED, engl. *stem cells from exfoliated deciduous teeth*) matične stanice peridontalnog ligamenta (PDLSC, engl. *peridontal ligament stem cells*), matične stanice apikalne papile (SCAP, engl. *stem cells from apical papilla*), matične stanice zubnog folikula (DFSC, engl. *dental follicle stem cells*) i mezenhimalne matične stanice gingive (GMSC, engl. *gingival mesenchymal stem cells*) (60).

Novije pronađene MSS *lamine propriae* nazivaju se **ljudske matične stanice oralne sluznice** (hOMSC, engl. *oral mucosa stem cells*). I epitel i *lamina propria* oralne sluznice sadrže hOMSC koje su se pokazale kao značajan izvor matičnih stanica. U *in vitro* uvjetima imaju sposobnost diferencirati se u stanice tkiva za koja nisu primarno predisponirane (61). Tako se mogu diferencirati u epitel rožnice ili stanice kože gdje mogu zamijeniti tkivo oštećeno opeklinama (62,63). Također u određenim *in vitro* uvjetima, hOMSC izolirane iz *lamine propriae* mogu se diferencirati u neuro-dopaminergičke stanice. Takve diferencirane stanice korištene su u terapijske primjene za modele hemi-parkinsonovih štakora (64). Ganz i sur. diferencirali su hOMSC u *in vitro* uvjetima u stanice slične astrocitima koje su pružile neuroprotekciju nakon ozljede živca (65).

Matične stanice oralne sluznice pokazuju potencijal pluripotentnosti. Mogu se diferencirati u sva tri zametna listića: ektoderm, mezoderm i endoderm. Izražavaju biljege MSS i EMS poput *SOX2*, *OCT3/4* i *NANOG*. Pokazuju svojstva imunomodulatornih i protuupalnih funkcija i ne potiču imunološki odgovor u primatelja. Ova sposobnost posljedica je nedostatka izražaja MHC molekula klase II. (66). Usporedimo li ih s MSS, hOMSC pokazuju puno veći kapacitet samoobnove. Imaju potencijal diferencijacije u osteoblaste, hondroblaste, adipocite i neuralnu lozu (67). Zbog svog anatomskeg položaja, lako su dostupne i mogu se izolirati iz malog uzorka tkiva. Uzmemo li u obzir da je oralna šupljina lako dostupna kao mjesto izolacije, oralna sluznica je potencijalni kandidata za izolaciju matičnih stanica (68). Brzo zacjeljivanje rana i odsustvo kozmetičkih i funkcionalnih problema nakon biopsije su još jedan od razloga zašto je ovo tkivo pogodan kandidat za izolaciju. Uzevši sve u obzir, hOMSC čine vrlo zanimljivu populaciju za napredak istraživanja matičnih stanica i tkivnog inženjerstva (69).



Created in [BioRender.com](https://www.biorender.com)

Slika 2. Izvor matičnih stanica iz oralne šupljine. Postoji nekoliko vrsta oralnih mezenhimskih stromalnih stanica (OMSC); matične stanice pulpe zuba (DPSC), matične stanice mliječnih zuba (SHED), matične stanice peridontalnog ligamenta (PDLSC), matične stanice apikalne papile (SCAP), engl. *stem cells from apical papilla*, matične stanice zubnog folikula (DFSC), mezenhimalne matične stanice gingive (GMSC) i matične stanice oralne šupljine (hOMSC). Pokazuju veliki potencijal diferencijacije u različite vrste stanica i tkiva i potencijal za primjenu u kliničkim terapijama. Slika izrađena u programu BioRender.

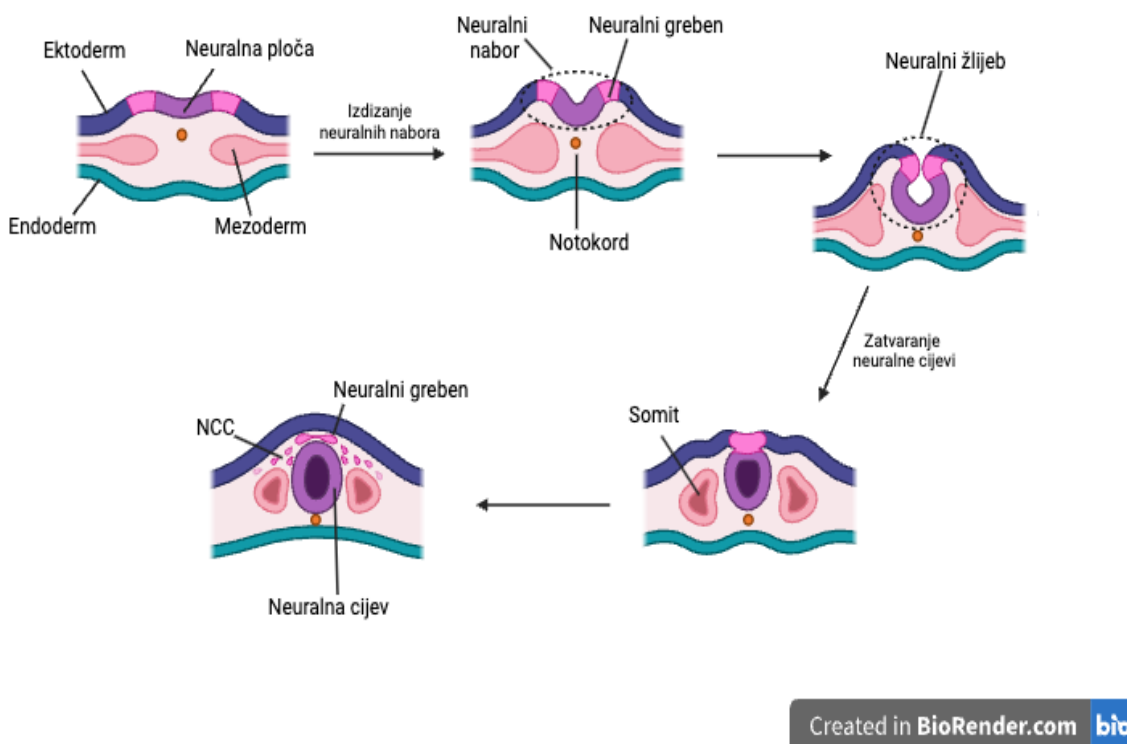
1.2.3. Podrijetlo matičnih stanica oralne sluznice

Za hOMSC se pretpostavlja da su podrijetlom od stanica neuralnog grebena pošto se iz njih razvijaju sva tkiva glave i vrata (70). Neuralni greben, prvi puta je opisan i prepoznat 1868. godine od strane švicarskog embriologa Wilheima Hisa. On je proučavajući embrije pilića uočio da dorzalna strana neuralne cijevi sadrži stanice koje se nalaze između dorzalnog ektoderma i neuralne cijevi. Zbog anatomske položaja to je područje odlučio nazvati “*Zwischenstrang*” (intermedijalna vrpca), a kasnije je preimenovan u neuralni greben (71).

Od 1920. godine pa nadalje provedena su mnogobrojna istraživanja neuralnog grebena gdje se najviše pratio razvoj i migracija stanica. Njegov razvoj započinje prilikom neurulacije zametka (Slika 3.). Neuralni nabori izdižu se i zatvaraju neuralnu cijev. Stanice neuralnog grebena (NCC, engl. *neural crest cells*) su migratorna populacija stanica. One se odvajaju s ruba neuralne cijevi prilikom njenog zatvaranja. Tijekom embrionalnog i odraslog razvoja, NCC stvaraju širok spektar stanica i tkiva (72). Zbog multipotentne i migratorne sposobnosti, neuralni greben se još naziva i četvrtim zametnim listićem (73). Migraciju stanica induciraju signali koji dolaze iz kontaktom posredovanih interakcija tkiva između neuralne ploče i površinskog ektoderma. NCC prijelaze iz epitelnog u mezenhimalno stanje i počinju intenzivno migrirati na nekoliko različitih lokacija u embriju. Pridonose stvaranju nizu različitih tipova tkiva, od perifernog živčanog sustava (PŽS) pa sve do kraniofacijalnog skeleta. Neuralni greben možemo podijeliti u tri glavne neuroaksijalne populacije – kranijalna, vagalna i trup. Svaka od njih migrira drugačijim putem i iz njih se razvijaju različite vrste stanica. Kranijalne NCC predstavljaju najbolji primjer multipotentnosti. Iz njih se razvija većina kostiju, hrskavice glave i lica, živčani gangliji, glatki mišići, vezivno tkivo i pigmentne stanice. Vagalne NCC sudjeluju u razvoju enteričnih ganglija. NCC trupa stvaraju neurone, glija stanice, pigmentne stanice kože i sekrecijske stanice endokrinog sustava (74).

Prvi put su matične stanice neuralnog grebena (NCSC, engl. *neural crest stem cells*) opisane kod glodavaca od strane znanstvenika Stemple i Anderson. Oni su

koristili specifične proteinske biljege na površini stanica p75^{NTR} (engl. *neurotrophin receptor* -NTR) za izolaciju NCSC-a. Dokazali su sposobnost samoobnavljanja ove vrste stanica (75).



Slika 3. Neurulacija. Proces neurulacije započinje proliferacijom i diferencijacijom stanica ektoderma koje pod utjecajem notokorda stvaraju neuralnu ploču. Lateralni rubovi neuralne ploče se izdižu i stvaraju neuralne nabore, prilikom čega nastaje neuralni greben dok središnje udubljenje čini neuralni žlijeb. Pod utjecajem notokorda, mezoderm se podjeli na pravilnu nakupinu stanica – somite. Iz njih se razvija skleroton od kojeg nastaju kosti trupa. Spajanjem rubova neuralnog žlijeba nastaje neuralna cijev. Prilikom zatvaranja neuralne cijevi, NCC se odvajaju s ruba neuralnog grebena. NCC migriraju i oblikuju osjetne i autonomne ganglije, srž nadbubrežne žlijezde, vezivno tkivo glave i vrata, Schwanove stanice, melanocite i stanice moždanih ovojnica (76). Slika izrađena u programu BioRender.

Ono što je nepoznanica jest da li su NCC multipotentne ili njihova sudbina ovisi o području migracije. Provedbom *in vitro* eksperimenta gdje su korištene prepeličje premigratorne NCC-e potvrđen je njihov razvojni potencijal. Uzgojem u staničnoj kulturi *in vitro*, uspješno su dobivene dvije stanične linije: melanociti i neuralne stanice. Kada su te stanice transplantirane u embrije pilića, one su mogle dalje migrirati putevima neuralnog grebena i doprinijeti razvoju tkiva i organa koji su endogenetski slični prepeličjim. Otkriće da se NCC-ovi mogu izolirati u embrijskim stadijima gdje pokazuju sposobnost multipotentnosti i samoobnove, otvorilo je vrata budućim istraživanjima (77).

1.3. MATIČNE STANICE U LIJEČENJU I ISTRAŽIVANJU

Posljednjih godina znanstvena istraživanja usredotočena su na identifikaciju i karakterizaciju matičnih stanica u embrionalnim i odraslim tkivima. To je dovelo do važnih otkrića o samoj prirodi matičnih stanica i njihovoj ulozi u obnovi tkiva (78). Identifikacija i karakterizacija matičnih stanica predstavlja glavni fokus ne samo razvojne biologije, već i regenerativne medicine s komponentom translacije u kliničku primjenu. Njihova primjena u medicinskom području pruža mnogobrojne mogućnosti u regeneraciji tkiva i zamjeni organa. Ipak, za uspostavu terapijskih postupaka temeljenih na matičnim stanicama, potrebno je ispuniti sljedeće uvjete: populacija matičnih stanica mora biti dostupna za izolaciju i mora biti dobro okarakterizirana. To je posebno važno kod ljudi gdje je potrebno dobiti stanice iz lako dostupnih tkiva samog pacijenata (79,80).

Preklinička istraživanja su od velike važnosti za prijelaz u kliničku fazu davanja terapije matičnim stanicama. U njima se određuje njihova učinkovitost, sigurnost i izvodljivost (81). Često se koriste životinjski modeli, najviše glodavci (miš, štakor) i primati (majmun) koji najbolje mogu predočiti patološko stanje u čovjeka (82). U prekliničkim istraživanjima, matične stanice dobivene iz raznih tkivnih izvora pokazale su značajan potencijal u poboljšanju staničnog i funkcionalnog oporavka, regeneraciji tkiva te povećanju stope preživljenja (83). Tako su primjerice živčane matične stanice (ŽMS) kod mišjih i štakorskih modela za Parkinsonovu i Alzheimerovu bolest dovele do smanjenja nakupljanja amiloidnih plakova i poboljšanja motoričkih funkcija (84,85). Kod štakorskog modela za amiotrofičnu lateralnu sklerozu (ALS), transplantirane MSS smanjile su napredak bolesti i povećale stopu preživljenja (86,87).

Nakon niza zadovoljavajućih rezultata s eksperimentalnim životinjama, došlo je do prvih kliničkih studija koje su pokazale obećavajuće rezultate. Kod pacijenata s oštećenjem kostiju glave nakon transplantacije stanica iz bukalnog masnog tkiva pokazan je napredak u obnovi oštećenog tkiva (88). Isto tako, direktna transplantacija hOMSC stanica kod pacijenata s oštećenjem limbalnih matičnih stanica rožnice, poboljšala je vid u 80% pacijenata (89,90). Kod pacijenata s

ozljedom leđne moždine, istraživanje je pokazalo kako su transplantirane MSS kod jednog dijela pacijenata dovela do poboljšanja motoričkih funkcija (91). Studije iz 2020. godine na pacijentima s moždanim udarom pokazale su kako 12 mjeseci nakon transplantacije MSS-a, dolazi do značajnog povećanja stupnja oporavka (92,93).

Nekoliko kliničkih ispitivanja je koristilo matične stanice iz oralne sluznice. Korištene su u liječenju paradontalne bolesti, regeneraciji dentina i zuba. Za epitelne stanice oralne sluznice je pokazano kako se mogu transplantirati u rožnicu bolesnika s oštećenjem matičnih stanica limbusa oka (94). Granz i suradnici su pokazali da hOMSC se mogu diferencirati u stanice koje proizvode dopamin i posjeduju neuralno-dopaminergički fenotip. Njihova transplatacija u striatum kod štakorskog modela Parkinsonove bolesti utjecala je na poboljšanje simptoma bolesti (64). Također je pokazano kako se mogu diferencirati u stanice slične astrocitima koje imaju neuroprotektivni učinak kod ozljede perifernog živca, poboljšavajući motoričku funkciju nakon transplatacije (65). Korejska skupina istraživača istraživala je učinak stanica iz oralne sluznice u ozljedi leđne moždine. Pokazano je kako njihova transplantacija smanjila apoptozu (95).

Ono što je značajni nedostatak u navedenim istraživanjima je da nije korišten isti postupka izolacije stanica. Isto tako, nije jasno navedena točna populacija i subpopulacija korištenih stanica.

Iako postoji više vrsta matičnih stanica, MSS prednjače u odnosu na ostale. To dokazuje i podatak da od ukupno 6205 prijavljenih kliničkih istraživanja s matičnim stanicama diljem svijeta, njih 1240 se odnosi na terapije pomoću MSS (96). Veliki broj prijavljenih kliničkih istraživanja upućuje na važnost daljnjih istraživanja matičnih stanica. Tako su neka od kliničkih istraživanja pokušala pomoću modificiranih MSS stanica liječiti akutni infarkt miokarda (97), traumatsku degeneraciju hrskavice (98) i akutnu bolest odbacivanja transplantiranog organa ili tkiva (GVSD, engl. *Graft versus host disease*) (99). Limbalne matične stanice najviše su korištene u kliničkim istraživanjima za liječenje rožnice nakon opeklina uzrukovane kiselinom (100). Navedena istraživanja predstavljaju napredni oblik terapije matičnim stanicama.

1.3.1. Napredne terapije matičnim stanicama

Napredne terapije matičnim stanicama (ATMPs, engl. *advance therapy medicinal products*) uključuju sofisticirane metode i genetske manipulacije matičnih stanica. Za razliku od njih, klasične terapije matičnim stanicama uključuju matične stanice iz samih tijela pacijenata (autologne matične stanice) koje nisu modificirane i kao takve se transplatairaju. Najpoznatija klasična terapija je transplatacija KMS-a (101).

ATMPs su podjeljene na tri vrste terapija. Gensku terapiju, terapiju somatskim stanicama i terapija inženjeringom tkiva. Genska terapija koristi rekombinantne gene za liječenje genetskih poremećaja, kroničnih bolesti i raka. Terapije somatskim stanicama služe za liječenje dijagnostiku i prevenciju bolesti pomoću manipuliranih stanica. Terapija inženjeringom tkiva omogućuje popravak, regeneraciju ili zamjenu oštećenog ljudskog tkiva (102). Ovi pristupi predstavljaju značajan napredak u personaliziranoj i regenerativnoj medicini. Trenutno u Europi su provedena 142 klinička istraživanja koristeći staničnu terapiju, od kojih je 27 doseglo III. fazu istraživanja (103). Postoji 21 proizvod temeljen na matičnim stanicama, gdje ih je 12 odobreno od strane FDA (Američka agencija za hranu i lijekove, engl. *Food and Drug Administration*) ili EMA (Europska agencija za lijekove, engl. *European Medicines Agency*) dok su drugi odobreni u Azijskim zemljama (96).

Tablica 1. Popis odobrenih ATMPs terapija krvotvornim matičnim stanicama.

EMA (engl. *European Medicines Agency*), FDA (engl. *Food and Drug Administration*) (104).

Naziv (proizvođač)	Primjena	Odobreno
Allocord (SSM Cardinal Glennon Children's Medical Centre)	Za poremećaje hematološkog sustava koji su nasljedni, stečeni ili rezultat liječenja mijeloablativnim tretmanom	FDA, 2011.
Clevecord (Cleveland Cord Blood Center)		FDA, 2016.
Ducord (Duke University School of Medicine)		FDA, 2012.
Hemacord (New York Blood Center)		FDA, 2011.
Regenecyte (StemCyte, Inc.)		FDA, 2024.
Lyfgenia (bluebird bio, Inc)	Bolest srpastih stanica (SCD)	FDA, 2023.
Libmeldy (Orchard Therapeutics)	Metakromatska leukodistofija (MLD)	EMA, 2020.
Casgevy (Vertex Pharmaceuticals)	Transfuzijski ovisna talasemija	EMA, 2024
Zynteglo (bluebird bio)		EMA, 2019.
Strimvelis (GlaxoSmithKline)	Imunodeficijencija uzrokovana nedostatkom enzima adenzin deaminaze (ADA-SCID)	EMA, 2016.

Tablica 2. Popis odobrenih ATMPs terapija mezenhimskim stromalnim stanicama.
 EMA (engl. *European Medicines Agency*), DCGI (engl. *Drug Controller General of India*),
 JMHW (Japanese Ministry of Health and Welfare) KFDA (engl. *Korea Food and Drug
 Administration*) (105).

Naziv (proizvođač)	Primjena	Odobreno
Cellgram (Pharmicell)	Akutna infarkt miokarda	KFDA, 2011.
Cartistem (Medipost)	Traumatska degeneracija hrskavice, uključujući i degenerativni osteoartritis	KFDA, 2012.
Cartistem (Medipost)	Knee OA	KFDA, 2012.
Queencell (Anterogen)	Subkutani defekti tkiva	KFDA, 2010.
Holoclar (Chiesi Farmaceutici)	Deficit limbalnih matičnih stanica uzrokovan opeklinama	EMA, 2015.
Alofisel (TiGenix NV/Takeda)	Kompleks perianalne fistule kod Chronove bolesti	EMA, 2018.
Cupistem Anterogen	Chronova fistula	KFDA, 2012.
TEMCELL HS Inj. (JCR Pharmaceuticals)	Akutna GvHD	JMHW, 2015.
Reme-stemcel (Mesoblast, Ltd)	Akutna GvHD	FDA, 2015.
NeuroNata-R (Corestem)	Amiotrofična lateralna skleroza	KFDA, 2014.
Stemirac (Unique Access Medical)	Ozljeda leđne moždine	JMHW, 2018.
Stempeucel (Stempeutics)	Limbalna ishemija uzrokovana Buergerovom bolesti	DCGI, 2017.

1.3.2. Matične stanice i neurodegenerativne bolesti

Neurodegenerativne bolesti su jedan od većih uzroka smrtnosti i generalni uzročnik smanjena životnog vijeka. Iako još ne postoje terapije matičnim stanicama za liječenje bilo koje neurodegenerativne bolesti, postoje mnoga preklinička istraživanja koja pokazuju potencijal za daljnji razvoj kliničkih istraživanja (106). Od ukupno 492 klinička istraživanja, samo dva su došla do IV. faze istraživanja dok su ostala između I. i II. faze (107). Istraživanja su se najviše usredotočila na terapiju matičnim stanicama kod moždanog udara, multipla skleroze, moždanih tumora, oštećenja mozga, leđne moždine i perifernih živaca (108,109,110,111,112).

Za Alzheimerovu i Parkinsonovu bolest, veliki potencijal za terapijsku primjenu pokazali su egzosomi dobiveni od MSS-a i stanični derivati iPSC-a i EMS-a. Nažalost većina terapijskih pristupa i dalje je u prekliničkoj fazi istraživanja. Tu im se pridružuju i hOMSC kao novi izvor matičnih stanica. One predstavljaju obećavajuće rezultate kod moždanog udara gdje sprječavaju proliferaciju mikroglija, reduciraju moždane edeme i utječu na preživljenje hipoksijski oštećenih neurona (113,114).

1.4. HIPOKSIJSKA OZLJEDA

Kako bi ispravno funkcionirao, naš organizam treba stalnu razinu kisika u krvi koji dopire do stanica i tkiva. Kada razina kisika padne ispod određene granice, javlja se hipoksija. Fiziološka razina kisika u organizmu je znatno niža od koncentracije kisika u okolini (21%). Ona varira u različitim tkivima kako bi se prilagodila zahtjevima potrošnje kisika različitih staničnih tipova. Hipoksija može biti uzrokovana hipoksemijom koja označava smanjenu koncentraciju kisika u arterijskoj krvi zbog smanjenog parcijalnog tlaka kisika (P_{aO_2}), otežanom dostavom oksigenirane krvi iz alveolarnih kapilara u sama tkiva i otežanim prijenosom molekule kisika s hemoglobina u citoplazmu stanice pa sve do mitohondrija gdje se odvija oksidativni metabolizam (115,116).

Mozak je organ koji zahtjeva najviše kisika u našem organizmu. Oko 20% ukupnog kisika iz krvi troši mozak, što ga čini posebno osjetljivijim na hipoksijsko oštećenje (117).

Moždani udar predstavlja hipoksijsko - ishemijsku ozljedu živčanog sustava. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, engl. *World health organization*), moždani udar je drugi vodeći uzrok smrti u svijetu, uzrokujući 11% svih smrtnih slučajeva. Oko milijun stanovnika Europe doživi moždani udar svake godine, a širom svijeta ukupno 16.9 milijuna stanovnika. Epidemiolozi predviđaju da će do 2030. godine ta brojka narasti do 77 milijuna stanovnika (118). Moždani udar se definira kao cerebrovaskularna bolest kod koje dolazi do poremećaja opskrbe krvlju odgovarajućih područja mozga. Ona rezultira fokalnom ili globalnom cerebralnom disfunkcijom s vidljivim simptomima bez očiglednog uzroka vaskularnog problema. Postoje dvije vrste moždanog udara. Ishemijski moždani udar koji je rezultat začepjenja arterijskih krvnih žila uzrokovanih embolom ili trombom. Učestaliji je i javlja se u 80-85 % slučajeva. U ostalih 10-20 % slučajeva riječ je o hemoragijskom moždanom udar koji je posljedica rupture cerebralne arterije u mozgu (119,120). Smanjeni ili prekinuti dotok krvi u mozak dovodi do manjka kisika i glukoze što posljedično utječe i na sintezu ATP-a (adenozin trifosfat). Takva situacija izaziva ekscitotoksičnost i potiče aktivaciju

reaktivnih astrocita prisutnih u područjima lezija što dovodi do neuroinflamacije, stvaranja glijalnih ožiljaka i aktivacije protuupalnih citokina (121,122).

Osim ishemijskog moždanog udara, jedna od učestalijih bolesti SŽS-a (središnji živčani sustav) je perinatalna hipoksijsko-ishemijska encefalopatija (HIE) (123). Riječ je o bolesti koja se javlja kod novorođenčadi tijekom trudnoće, za vrijeme poroda ili poslije poroda kada dođe do nedostatka kisika u prenatalnom mozgu. Ovisno o stupnju razvoja mozga i veličini ishemijske ozljede, te proteklom vremenskom periodu mogu se razlikovati patofiziološki i neurološki poremećaji. HIE se pojavljuje u 26 slučajeva na 1000 porođaja od kojih 15-20% umire u ranom neonatalnom periodu. Preživjela novorođenčad boluje od neuroloških poremećaja poput cerebralne paralize, epilepsije te intelektualnih poteškoća. (124,125,126). Jedina odobrena terapija za liječenje HIE je hipotermija. Ovom terapijom se ciljano hladi glava na temperaturu od oko 34 °C ili cijelo tijelo na oko 33 °C gdje je vrlo važno da se terapijom započne unutar 6 sati nakon porođaja. Mora se strogo kontrolirati i održavati zadana temperatura sljedeća 72 sata. Iako terapija ima pozitivan učinak i dalje veliki postotak novorođenčadi ne uspijeva preživjeti ili se suočava s određenim stupnjem invalidnosti (127,128). Novija klinička istraživanja pokazala su potencijal u liječenju s MSS stanicama, ali trebaju proći završne faze testiranja (129,130).

2. HIPOTEZA

Matične stanice oralne sluznice poboljšavaju oporavak neurona oštećenih hipoksijom.

3. CILJEVI RADA

3.1. Opći cilj

Cilj ove disertacije je ispitati potencijal matičnih stanica oralne sluznice te istražiti hoće li njihova prisutnost povećavati preživljenje živčanih stanica oštećenih hipoksijom.

3.2. Specifični ciljevi

1. Uspostaviti standardiziran postupak izolacije matičnih stanica iz tkiva oralne sluznice čovjeka.
2. Pronaći biljege koji definiraju matične stanice oralne sluznice.
3. Istražiti potencijal matičnih stanica oralne sluznice za diferencijaciju u stanice živčanog tkiva.
4. Istražiti kako matične stanice oralne sluznice djeluju na neurone oštećene hipoksijom.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Postupci sa stanicama

4.1.1. Biopsija tkiva oralne sluznice čovjeka

Biopsija tkiva oralne sluznice čovjeka dobivena je od dobrovoljnih darivatelja, starosti između 20 do 30 godina. Darivatelji su prije uzimanja biopsije potpisali informirani pristanak o davanju uzorka (definiran Etičkom dopusnicom Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu) gdje su upoznati sa svrhom znanstvenog istraživanja, postupkom uzimanja biopsije i mogućim komplikacijama. U suradnji sa Stomatološkim fakultetom, Sveučilišta u Zagrebu, izvedena je *punch* biopsija. Ova vrsta biopsije pokazala se kao najbolja za uzimanje uzorka tkiva iz oralne sluznice. Riječ je o vrsti incizijske biopsije gdje se uz pomoć posebnog okruglog kirurškog instrumenta izrezuje cilindričan uzorak tkiva točno određenog promjera. Postupak se izvodi tako da se u područje bukalne sluznice, oko 5 cm iznad gingive prekutnjaka inicirala anestezija 2%-tnim lidokainom s epinefrinom u omjeru 1 : 100 000 u količini od jedne ampule ili manje (1.8 mililitara). Nakon 5 minuta provjerilo se djeluje li anestezija te se sluznica imobilizirala pincetom. Pomoću kirurškog instrumenta izvela se *punch* biopsija. Veličina sluznice koja se uzimala je bila 3x3x3 milimetara. Rana se zatvorila s 3 šava resorptivnim koncem. Uzorci su stavljeni u petrijeve zdjelice u kojima se nalazilo ukupno 2 ml DPBS (Gibco), poklopljeni i tako preneseni u laboratorij za kulturu stanica gdje su se provodili daljnji postupci.

4.1.2. Izolacija stanica iz tkiva oralne sluznice čovjeka

Komadići tkiva dobiveni biopsijom prvo su isprani u mediju za ispiranje sastavljenom od DPBS-a, 1x otopine antibiotika i antimikotika, Penicilin/Streptomycin (Gibco, Life Technologies, 100x) i 1x Amfotericina B (Gibco, Life Technologies) kako bi se spriječila kontaminacija mikroflorom oralne šupljine. Nakon 5 minuta ispiranja, Petrijeve zdjelice s komadićima tkiva su stavljene pod lupu gdje su pomoću sterilnih kirurški škarica komadići tkiva

izrezani na manje komadiće. To je učinjeno kako bi se omogućilo lakše djelovanje enzima koji pospješuju odvajanje *laminae propriae* od epitela. Izrezani komadići tkiva prebačeni su u epruvete gdje je bilo dodano 990 µl medija za rast i 10 µl smjese enzima kolagenaze/dispaze (Roche, 5 mg/ml). Medij za rast sastojao se od LG-DMEM (Gibco, Life Technologies), 10% FBS-a (fetalni goveđi serum, Gibco), 1% otopine Penicilina/Streptomocina i 1% Glutamaxa (Gibco, Life Technologies). Jedna epruveta s uzorcima je preko noći bila ostavljena na +4°C kako bi se razgradile membrane, a druga se prebacila u inkubator na 37°C na 2 sata. Nakon inkubacije s enzimima, komadići tkiva su bili izvađeni iz enzimske smjese te su prebačeni u Petrijevu zdjelicu gdje su ispirani 5 minuta u mediju za neutralizaciju koji je istog sastava kao medij za rast. Za vrijeme ispiranja, pripremljen je medij za rast čiji je sastav prethodno opisan i stavljen je na grijanje u vodenu kupelj na 37°C. Nakon ispiranja, zdjelica s uzorcima se prenijela pod lupu. Pomoću kirurški sterilne pincete odvojila se *lamina propria* (crvenkasti dijelovi tkiva) od epitela (bijeli dijelovi tkiva). Za daljnju izolaciju stanica korištena je samo *lamina propria* koja je bila dodatno usitnjena pod lupom pomoću sterilnog kirurškog nožića na manje komadiće. Pripremljene su sterilne pločice sa 6 bunarića (Falcon). U svaki bunarić je bilo dodano 3 ml medija za rast te se prebacilo oko 3 do 4 komadića usitnjene *laminae propriae*. Pločice sa stanicama su prebačene u inkubatoru na 37°C i 5% CO₂ s vlagom od minimalno 90%. Medij se stanicama mijenjao svaka 2 dana. Izvadilo se 50% starog medija i dodalo 50% novog medija za rast. Pod mikroskopom se pratila pojava adherentnih stanica.

4.1.3. Disocijacija matičnih stanica oralne sluznice

Nakon pojave adherentnih stanica, izvađeni su komadići tkiva. Kako bi se dobivene stanice odlijepile i dalje pasazirale, korišten je 0,25% tripsin (Gibco, Life Technologies). Iz bunarića se izvadilo sav medij i dodalo se ukupno 1 ml 0.25% tripsina. Pod mikroskopom se promatralo odljepljivanje stanica, a kako bi se pospješilo njihovo odljepljivanje, bile su lagano protresene. Kada je većinski dio stanica bio odljepljen, dodalo se 1 ml medija za rast kako bi se zaustavilo djelovanje tripsina. Stanice su lagano resuspendirane i prebačene u epruvetu s

medijem za rast. Neutralizirane su u volumenu od 6 ml medija za rast. Omjer tripsina i medija iznosio je najmanje 1:4, odnosno 1 ml tripsina neutraliziran je s minimalno 3 ml medija. Stanice su stavljene na centrifugiranje kako bi se odvojile iz otopine tripsina i medija na 200g, 6 minuta. Nakon centrifugiranja, supernatant se odlio. Talog sa stanicama je resuspendiran u 1 ml medija za rast pomoću nastavka za pipete od 1 ml. Stanice su prebačene u pločice sa 6 bunarića za daljnji uzgoj. U jednom bunariću je bilo ukupno 3 ml medija za rast. Pločice sa stanicama su vraćene natrag u inkubator gdje su držane u uvjetima na 37 °C i 5% CO₂ s vlagom od minimalno 90%. Medij se mijenjao svaka 2 dana i pratila se konfluentnost stanica pod mikroskopom.

Kada su stanice postigle konfluentnost od 70%, tada su ponovno pasažirane. Iz bunarića se izvio sav medij, a na stanice dodalo 1 ml 0,25% tripsina. Nakon par minuta, stanice su odlijepljene i neutralizirane s ukupno 6 ml medija za rast. Stavljene su na centrifugiranje 200g, 6 minuta. Nakon centrifugiranja, supernatant je odličen, a talog sa stanicama nježno resuspendiran s ukupno 1 ml medija za rast. Stanice su prebrojane pomoću Neubauerove komorice. U jedan bunarić nasadilo se između 600 000 i 1 000 000 stanica u mililitru (st/ml). Taj nasad predstavlja pasažu 1 (P1).

4.1.4. Zamrzavanje matičnih stanica oralne sluznice

Pošto istovremeno nisu potrebne sve stanice za pokus, dio stanica je zamrznut. Zamrzavanje stanica je omogućilo vremensku fleksibilnost u izvođenju pokusa i ponavljanju istih. Stanice su bile zamrznute u pasaži P1. Nakon izolacije, stanice su uzgajane u pločicama sa 6 bunarića kako bi se pojavile adherentne stanice (P0). Nakon pojave adherentnih stanica, bile su pasažirane (P1). Tri dana nakon disocijacije, stanice su bile zamrznute u P1 pasaži. Iz pločica sa 6 bunarića izvađen je sav medij, stanice su odlijepljene pomoću 0,25% tripsina te centrifugirane na 200g, 6 minuta. U međuvremenu, pripremio se medij za zamrzavanje stanica koji je bio držan na ledu. Za zamrzavanje stanica koristio se krioprotektant DMSO (dimetil sulfoksid). On povećava poroznost staničnih membrana i omogućava time slobodnije prolaženje vode i sprječava formiranje

kristalića leda prilikom zamrzavanja stanica na niske temperature (130). Medij za zamrzavanje sastojao se od medija za rast stanica s 20 % DMSO-a (Sigma-Aldrich) i 20 % FBS-a. Nakon centrifugiranja, supernatant se odlio, a talog u kojem su bile stanice, lagano resuspendirao pomoću pipete s nastavkom od 1 ml. Stanice su resuspendirane u ukupno 1 ml medija za zamrzavanje i nakon toga su prebačene u kriotubice (Thermo Scientific). U jednoj kriotubici su zamrznute stanice iz jednog bunarića. Kriotubice su bile držane na ledu, a kasnije su prebačene u spremnik za zamrzavanje (Corning) koji je prethodno bio ohlađen na +4 °C. Spremnik sa stanicama je potom prebačen na – 80 °C na 24 sata. Nakon toga, kriotubice sa stanicama su prebačene u spremnik s tekućim dušikom na dugotrajno skladištenje.

4.1.5. Odmrzavanje matičnih stanica oralne sluznice

Stanice u kriotubicama su zamrznute u pasaži P1. Za vađenje kriotubice iz tekućeg dušika potrebno je koristiti zaštitne rukavice i zaštitne laboratorijske naočale. Spremnik za zamrzavanje stanica ohlađen na +4 °C (Corning) koristio se za prijenos stanica do laboratorija sa staničnom kulturom. Kriotubice su otapane u vodenoj kupelji zagrijanoj na 37 °C kako bi proces otapanja bio što brži i smanjio se štetni utjecaj DMSO-a na stanice. Stanice su otapane otprilike 1 minutu i lagano resuspendirane. Nakon toga, odmah su prebačene u 10 ml medija za rast kako bi se neutraliziralo citotoksično djelovanje DMSO-a. Centrifugirane su na 200g, 6 min. Supernatant se odlio, a talog sa stanicama je nježno resuspendiran pomoću 1 ml medija za rast. Cjelokupni volumen od 1 ml prebačen je u 12 ml medija za rast. Stanice su lagano ispuštane, kap po kap u medij za rast. Stanice su ponovno lagano resuspendirane i prebačene u sterilne pločice sa 6 bunarića. U svaki bunarić je prethodno stavljeno ukupno 2 ml medija za rast. Pločica sa stanicama se stavila u inkubator na 37 °C i 5% CO₂ s vlagom od minimalno 90%. Nakon tri dana stanice su bile spremne za pasažiranje. Pasažiranje je provedeno kako je opisano u poglavlju 3.1.3.. Za pokuse su bile korištene stanice između pasaže P2 i P3.

4.1.6. Kultura neurona

Za potrebe pokusa s diferenciranim ljudskim neuronima korištena je komercijalno dostupna linija ljudskih iPSC-a (WTSli189-A) dobivena uz suglasnost iz suradničkog laboratorija dr. Songa (Innovation Diagnostics, Republika Koreja). Neuron (DIV50) su uzgojeni po standardiziranom protokolu od strane Laboratorija za matične stanice na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga (HIIM). Za potrebe ko-kulture, korišteni su isti neuroni koji su bili uzgojeni s hOMSC stanicama. Ko-kultura je trajala 28 dana. Vremenske točke koje su bile uzete za analizu su dan 0 (D0) – referentna točka, dan 14 (D14) i dan 28 (D28). Analiza promjene izražaja hOMSC biljega bila je analizirana pomoću metode RT-PCR-a (opisano u poglavlju 4.6.).

4.1.8. Nasađivanje za diferencijaciju

Za istraživanje potencijala diferencijacije hOMSC-a korištene su stanice iz pasaža P2 i P3. Stanice su bile nasađene u pločice s 24 bunarića, ukupno 70 000 st/ml u 500 µl medija za rast. Stanice su držane 24 h u inkubatoru na 37 °C i 5% CO₂. Nakon 24 h, aspiriran je sav medij i dodano je ukupno 1 ml medija za diferencijaciju. Medij za diferencijaciju sastojao se od Neurobasala (Gibco), 2% B27 (Gibco), 1% N2 (Gibco) i 1% mješavine Penicilina i Streptomicina. Medij je mijenjan svaka 2 dana. Izvadilo se 500 µl starog medija i dodalo 500 µl svježeg pripremljenog medija za diferencijaciju. Pod mikroskopom se promatrala promjena morfologije. Pojavom sfernih nakupina, medij sa sferama se pokupio i stavio na centrifugiranje 2 min na 300G kako bi ostale samo sferne nakupine. Kako bi se sferne nakupine razbile, korišten je enzim akutaza (Gibco). Akutaza je prirodna smjesa enzima koja ima djelovanje slično tripsinu i kolagenazi i manje je agresivna u odnosu na tripsin, a pošto se radi o osjetljivim sfernim nakupinama odlučili smo je koristiti kako se ne bi oštetile sam sfere. Ukupno 5 ml ugrijane akutaze je bilo dodano sfernim nakupinama za njihovo razbijanje.

Nakon razbijanja vršila se neutralizacija pomoću medija za diferencijaciju. Sada razbijene stanice su bile nasađene na stakalca presvučena poli-D-lizinom u pločice s 24 bunarića. Stanice i sferne nakupine su slikane pomoću uređaja EVOS FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific).

4.2. Fiksacija stanica za imunocitokemiju

Za potrebe imunocitokemijske analize, korištene su pločice s 24 bunarića (Falcon) u kojima su bila postavljena okrugla stakalca promjera 12 mm (Menzel). Nasadilo se ukupno 70 000 st/ml po bunariću u 500 µl medija za rast. Stanice su bile fiksirane treći dan svježe pripremljenim 4 % paraformaldehidom (PFA) u PBS-u. U svaki bunarić se dodalo ukupno 500 µl fiksatora. Stanice su fiksirane ukupno 10 min nakon čega su ispirane 3 x 10 min s 500 µl PBS-a. Fiksacija se vršila na sobnoj temperaturi. Stanicama na kojima se nije provodila imunocitokemija je bilo dodano 1 ml PBS-a u bunarić. Pločica se zatvorila parafilmom kako bi se spriječilo isparavanje i isušivanje stakalca. Pospremljena su na + 4 °C gdje se mogu držati najviše tjedan dana.

4.3. Imunocitokemija (ICC)

Procjena proteinskog sadržaja metodom imunocitokemije započela je permabilizacijom fiksiranih stanica. Fiksirane stanice permabilizirane su s 500 μ l otopine 0.2 % Tritona (Sigma Aldrich) u PBS-u na 10 min. Zatim su isprane 3x po 10 min s PBS-om sobne temperature. Nakon ispiranja, stanice je bilo potrebno blokirati te je na njih stavljeno 500 μ l otopine za blokiranje koju je činio 3 %-tni kozji serum (Thermo Fisher Scientific) otopljen u PBS-u. Blokiranje se vršilo 2 h na sobnoj temperaturi. Po završetku blokiranja, stanicama se dodalo 250 μ l otopine specifičnog primarnog protutijela koje je bilo otopljeno u 3%-tnom kozjem serumu u PBS-u. Stanice su stavljene na inkubaciju preko noći na +4 °C. Idući dan, primarna protutijela su isprana s PBS-om 3x 5 min. Nakon ispiranja, stanice su inkubirane s odgovarajućim sekundarnim protutijelima u 3%-tnom kozjem serumu u PBS-u. Inkubacija se vršila 2 h na sobnoj temperaturi, a stanice su prekrivene folijom kako bi se zaštitile od svjetlosti. Po završetku inkubacije, sekundarna protutijela su isprana 3x 10 min u PBS-u. Na stanice se dodala otopina DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole, Roche) koja se koristi za vizualizaciju staničnih jezgara. Stanice su bojane 10 min, a DAPI se razrijedio u PBS-u, koncentracije 0,1 μ g/ml. DAPI je ispran 3x 10 min, a stanice su nakon toga uklopljene medijem za poklapanje fluorescentnih preparata (engl. *Dako Fluorescent Mounting Medium*, Agilent) na mikroskopska stakalca. Poklopljeni preparati su ostavljeni da se suše preko noći na sobnoj temperaturi. Preparati su dugoročno čuvani na +4 °C. Preparati su analizirani na konfokalnom mikroskopu (Olympus, FV 3000), a obrada slika rađena je u ImageJ softveru (NIH, National Institutes of Health, SAD).

Tablica 3. Primarna protutijela korištena za imunocitokemiju (ICC).

Podrijetlo	Ciljani protein	Razrijeđenije	Proizvođač	Kataloški broj
Miš	<i>NESTIN</i>	1:200	Millipore	Mab353
Kunić	<i>SLUG</i>	1:100	Abcam	ab27568
	<i>SOX2</i>	1:200	Cell Signaling	D9B8N
	<i>OCT4</i>	1:250	Abcam	ab181557
	<i>MAP2</i>	1:1000	Abcam	ab32454

Tablica 4. Sekundarna protutijela korištena za imunocitokemiju (ICC).

Protutijelo	Razrjeđenje	Proizvođač	Kataloški broj
Alexa Fluor 488 koza anti - miš IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen	A28175
Alexa Fluor 633 koza anti - kunić IgG (H+L)	1:500	Invitrogen	A-21070

4.4. Izolacija proteina iz stanica i mjerenje koncentracije proteina Bradfordovom metodom

Stanice iz pasaža P2 i P3 su nasađene u pločice sa 6 bunarića. Nakon što se postigla konfluentnost stanica od oko 70 %, stanice su bile spremne za izolaciju proteina. Pločica sa stanicama je bila stavljena na led, sav medij iz bunarića je aspiriran, a stanicama je bio dodan 1 ml hladnog PBS-a (+ 4 °C). Nakon 2 minute, PBS se maknuo, a stanicama se dodalo 150 µl RIPA pufera za lizu stanica (Millipore) s proteaznim (Roche) i fosfataznim inhibitorima (Roche). Nakon toga stanice su sastrugane pomoću strugača za stanice (Falcon). Pokupio se lizat stanica pomoću pipete i stavio se u tubicu od 1.5 ml (Thermo Scientific) koja je bila držana na ledu. Proteinski lizat stanica se sonificirao 10-15 sekundi na 30% jačine sonikatora (Qsonica, CL 188). Nakon sonifikacije, lizat stanica se centrifugirao na 14 000 g, 10 min, na + 4 °C. Supernatant se pažljivo odlio, a talog s proteinima spremio na –20 °C do korištenja.

Bradfordova metoda za mjerenje koncentracije proteina se izvodila prema uputama za korištenje. U pločice s 96 bunarića (Falcon) se dodalo 10 µl BSA standarda i uзорak. Sve je bilo rađeno u triplikatu, a na kraju se dodao Bradfordov reagens (Thermo Scientific) po 300 µl u svaki bunarić. Pločica se omotala folijom i ostavila na sobnoj temperaturi inkubirat 10 min. Apsorbancija se izmjerila na uređaju GloMax® Explorer Sytem na 600 nm.

4.5. Izolacija ukupne RNA

Ukupna RNA iz stanica je bila izolirana pomoću RNeasy Mini Kita (Qiagen). Za potrebe izolacije RNA, stanice su bile nasađene na pločice sa 6 bunarića. Nakon što je bila postignuta konfluentnost stanica od oko 80%, stanice su korištene za izolaciju. Iz bunarića se aspirirao sav medij, a stanicama se dodalo 600 µl RLT pufera iz kita. Stanice su nakon toga sastrugane pomoću strugača za stanice. Lizati stanica su pokupljeni pomoću pipete i prebačeni u tubice od 1.5 ml koje su bile držane na ledu. Pomoću spremnika lizati su prebačeni na -80 °C. Izolacija RNA se nastavila kada se sakupio dovoljan broj staničnih lizata. Lizati su otopljeni u vodenoj kupelji na 37 °C i nastavilo se s daljnjim postupcima kako je navedeno u uputama proizvođača. Koncentracija RNA se izmjerila na spektrofotometru (Thermo Scientific, NanoDrop ND- 1000).

4.6. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR)

Pomoću komercijalnog dostupnog High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor Kit-a (Applied Biosystems) izolirana RNA se prepisala u cDNA sljedeći upute proizvođača. Korištene su specifične kombinacije proba i početnica koje su navedene u Tablici 3. Svi uzorci su rađeni u triplikatima s koncentracijom cDNA od 1 ng/μL, a volumen ukupne reakcijske smjese bio je 20 μL. Ukupna reakcijska smjesa sastojala se od 10 μL TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems™), 1 μL određene kombinacije TaqMan početnica i proba, te jednake koncentracije cDNA razrijeđene u vodi bez RNAaze. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu napravljena je prema uputama proizvođača u uređaju 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Analiza genskog izražaja se određivala tako da je od CT (engl. *threshold cycle*) vrijednosti za određeni gen oduzeta CT vrijednost endogene kontrole. Tako se dobila Δ CT vrijednost. Relativna ekspresija gena dobivena je pomoću formule $2^{-\Delta CT}$.

Tablica 5. Popis korištenih kombinacija proba i početnica za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR).

Kombinacija proba i početnica (assay)	Kataloški broj
Actb	Mm02619580_g1
Oct4	Hs04260367_gH
Sox2	Hs04234836_s1
CD40	Hs01002915_g1
CD166	Hs00977641_m1
CD90	Hs06633377_s1
CD73	Hs00159686_m1
Nestin	Hs04187831_g1
Slug	Hs00161904_m1
BDNF	Hs02718934_s1
VEGF	Hs00900055_m1
NGF	Hs00171458_m1
GDNF	Hs01931883_s1

4.7. Model izlaganja hOMSC i iPSC stanica uvjetima anoksije

Za potrebe istraživanja utjecaja različitih razina kisika na preživljenje hOMSC-a, za usporedbu su bile korištene komercijalno dostupne iPSC stanice. Obje stanične linije su bile nasađene u pločice sa 6 bunarića u mediju za rast (opisan u poglavlju 4.1.2.). Nasađeno je bilo 6 pločica za svaku staničnu liniju, ukupno 12 pločica. Istovremeno su bila korištena dva inkubatora kako bi se mogli usporediti utjecaji različite razine kisika na stanične linije. Jedan inkubator je bio podešen na razinu od 5% kisika, dok je kod drugog inkubatora razina kisika iznosila 0% (anoksija). Odabrane su bile tri vremenske točke u kojima će se uspoređivati preživljenje stanica: 6h, 12h i 24h izlaganja 0% i 5% kisika. U inkubator s 5% kisika bile su stavljene 3 pločice s hOMSC stanicama i 3 pločice s iPSC stanicama. Isti postupak je bio napravljen za inkubator s 0% kisika (anoksija). Nakon svake vremenske točke, stanice su bile izvađene iz inkubatora. Napravio se Live/Dead test (Invitrogen) pomoću komercijalno dostupnog kita prema uputama proizvođača. Live/Dead test omogućuje kvantifikaciju živih i mrtvih stanica u stvarnom vremenu. Nakon provedenog testa, stanice su bile fiksirane pomoću 4% PFA (opisano u poglavlju 4.2.). Stanice su bile poslikane na EVOS uređaju za snimanje slika.

4.8. Model deprivacije kisika i glukoze (OGD) i reoksigenacija oštećenih neurona pomoću hOMSC i kondicioniranog medija

U dijelu istraživanja u kojem se uspoređivalo djelovanje hOMSC-a i kondicioniranog medija na hipoksijski oštećene neurone korišten je *in vitro* model ishemijskog moždanog udara. Neuronima nasađenim na stakalca u pločicama s 24 bunarića, nježno se aspirirao medij te se dodalo 1 ml medija bez glukoze koji se sastojao od DMEM, no glucose (Gibco) i 1% Penicilina i Streptomicina. Kako bi se induciralo hipoksijsko oštećenje, pločice s neuronima su bile stavljene u inkubator s kontroliranom razinom kisika od 1% uz razinu CO₂ od 5% i vlage 90%. Stanice su bile izložene ovim uvjetima 24 h nakon čega se provela reoksigenacija.

Po završetku OGD tretmana, iz bunarića se aspirirao sav medij i zamijenio s medijem za rast neurona. Kontrolnoj skupini, dodao se samo medij za rast neurona. U druge dvije skupine ispitivao se utjecaj hOMSC-a i njihovog kondicioniranog medija na oštećene neurone. Tako se jednoj skupini dodalo 30 % medija za rast neurona i 70% kondicioniranog medija u kojem su uzgajane hOMSC. Drugoj skupini se dodalo 100 000 st/ml korištenjem sterilnih staničnih inserata (Merck Millipore) u 1 ml medija za rast. Nije se koristio medij za rast neurona zbog trajanja ko-kulture (24 h) gdje bi moglo doći do morfoloških promjena hOMSC i njihovog gubitka matičnosti. Pločice sa stanicama su vraćene u inkubator u normalne uvjete od 5 % CO₂ i vlage 90% na 24 h. Nakon 24 h reoksigenacije, stanice su fiksirane.

U svrhu analize proveo se *Live/Dead* test (Invitrogen) prema uputama proizvođača i poslikao na EVOS uređaju za snimanje slika.

Također se odredio intenzitet stanične smrti mjerenjem oslobođene laktat dehidrogenaze (LDH test). Laktat dehidrogenaza je enzim koji je važan za metabolizam glukoze, a prilikom oštećenja stanične membrane se oslobađa. Korišten je LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay (Promega) prema uputama proizvođača. Kako bi se izmjerila oslobođena LDH-a, uzeo se medij na početku, prije oštećenja neurona hipoksijom što je predstavljalo početnu točku te nakon

24 sata reoksigenacije na temelju čega se izračunala koncentracija oslobođene LDH tijekom reoksigenacije. Mediji su bili pohranjeni na – 20 °C u otopini za pohranu (200mM Tris-HCl (pH 7.3), 10% Glicerol, 1% BSA). Na dan analize, uzorak se u omjeru 1:1 pomiješao sa LDH detekcijskim reagensom i inkubirao 50 min. Luminiscencija se izmjerila na uređaju GloMax® Explorer Sytem.

4.9. Statistička obrada rezultata

Za obradu rezultata, korišteni su podaci koji su se prikupili provedbom 3 neovisna eksperimentalna ponovljena pokusa. Za dio rezultata gdje su bila uspoređivana dva uvjeta, koristio se Student T-test i one-way Anova gdje se $p < 0.05$ smatrao statistički značajnim (*), $p < 0.01$ statistički iznimno značajnim (**), a $p > 0.05$ statistički beznačajnim (ns) pod pretpostavkom normalne distribucije podataka. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Za usporedbu podataka između različitih tretmana neurona izloženih hipoksijskom oštećenju korištena je Two-way ANOVA. Statistička analiza i grafički prikaz rađeni su u programu GraphPad Prism verzija 9.4.1. (681) za Windows operativni sustav (GraphPad Software, San Diego, California, SAD).

5. REZULTATI

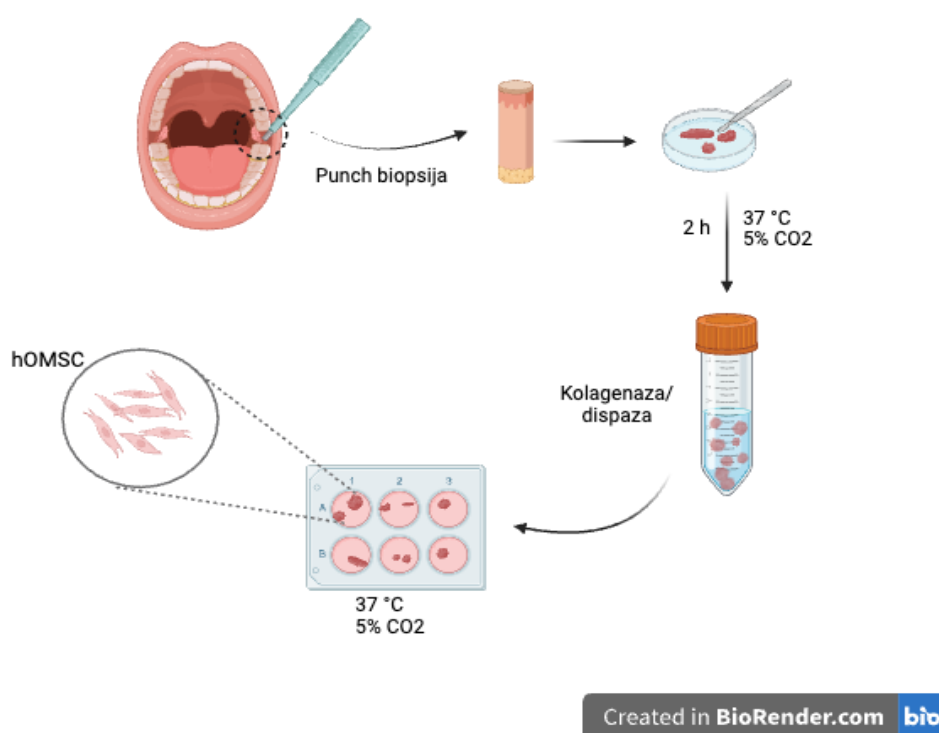
5.1. Uspostava učinkovitog protokola izolacije homogene populacije ljudskih matičnih stanica oralne sluznice

Kako bi se uspostavio protokol za dobivanje dovoljnog broja stanica iz bioptata usne sluznice, testiralo se nekoliko varijanti protokola.

Nakon što je napravljena biopsija oralne sluznice, prvo je bilo potrebno spriječiti kontaminaciju mikroflorom iz usne šupljine. To je postignuto tako što je tkivo bilo stavljeno u otopinu Streptomicina/Penicilina i Amfotericina B. Enzimatsko odvajanje epitela od *lamine proprie* kako bi se osigurale čiste mezenhimske stanice podležećeg veziva, predstavljalo je vrlo važan korak. Testirana su dva enzima; kolagenaza i dispaza. Dispaza razgrađuje glikoprotein fibronektin koji povezuje kolagen s izvanstaničnim matriksom, a kolagenaza razgrađuje kolagen tip IV kao jednu od ključnih molekula koja povezuje epitel s *laminom propriom*. U slučajevima kada se koristi samo jedan od tih enzima što je uobičajeno u sličnim protokolima, ne dobiva se zadovoljavajući rezultat. Stoga je bilo potrebno testirati kombinaciju enzima dispaze i kolagenaze u koncentraciji 5 mg/ml, čime se postiglo uspješno odvajanje epitela.

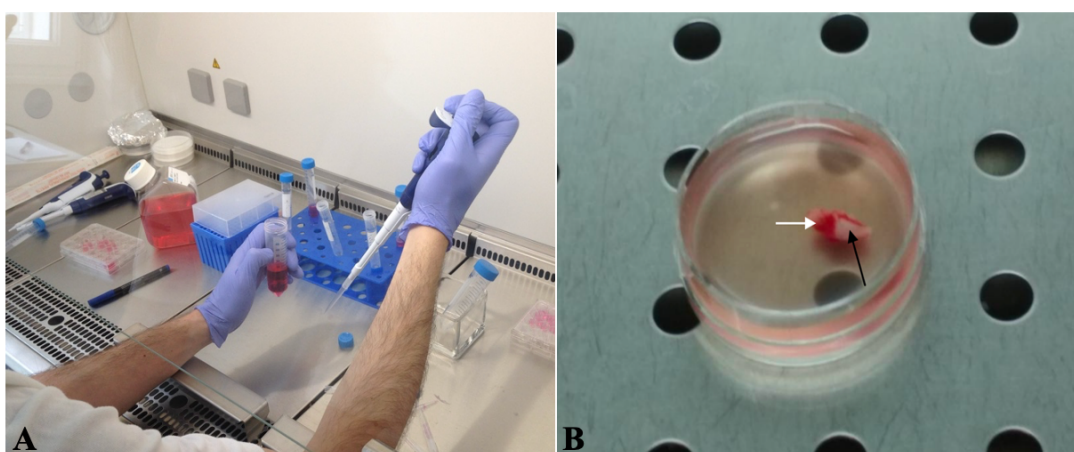
Također su testirana različite temperature i vremena djelovanja tih enzima. Jedan dio uzoraka je bio ostavljen preko noći na +4 °C u smjesi enzima, a drugi dio je bio stavljen u inkubator na 37 °C na 2 sata. Iako su oba postupka dovela do odvajanja *lamine proprie* od epitela, inkubacija tkiva s enzimima na 37 °C pokazala je znatno bolje rezultate. Viša temperatura omogućila je bolje djelovanje smjese enzima i bržu razgradnje vezivne membrane što je rezultiralo lakšim i preciznijim odvajanjem *lamine proprie* bez komadića epitela koji su bili zahvaćeni u slučaju kod odvajanja uzoraka koji su se inkubirali na +4 °C.

Nakon uspješnog odvajanja, komadići *laminae propriae* bili su dodatno usitnjeni kirurškim škaričama kako bi se olakšalo spontano izlaženje stanica iz njih. Nakon otprilike 2 tjedna iz komadića tkiva su počele migrirati stanice koje su bile adherirane za podlogu bunarića. Adherentne stanice su odlijepljene pomoću enzima tripsina i dalje pasažirane kako bi se dobila homogena populacija stanica.



Slika 4. Primarna kultura hOMSC. Pomoću "punch" biopsije dobiveni su uzorci tkiva oralne sluznice koji su usitnjeni i stavljeni na inkubaciju 2 h u smjesi enzima kolagenaze i dispaze. Enzimi su omogućili lakše odvajanje *laminae propriae* od epitela koja je dodatno usitnjena i nasađena u pločice s 6 bunarića u mediju za rast hOMSC-a. Nakon 15 dana uočena je pojava adherentnih stanica – hOMSC, koje su dalje pasažirane do dobivanja homogene populacije stanica. Slika izrađena u programu BioRender.

U pokušaju da se optimizira odvajanje stanica od podloge testirane su dvije različite koncentracije tripsina; 0,25 % i 0,5%. Odljepljivanje stanica se promatralo pod mikroskopom, gdje je uočeno da je brzina odljepljivanja stanica gotovo jednaka. Ono što je uočeno je da 0,5 % tripsin znatno povećava smrtnost stanica čak i pri kratkom izlaganju što je potvrđeno bojanjem stanica trypan blue bojom koja ulazi u stanice koje imaju oštećenu staničnu membranu i boja njihovu citoplazmu. Na temelju toga zaključeno je da je koncentracija od 0,25 % tripsina optimalna za ovaj protokol jer osigurava učinkovito odvajanje stanica uz minimalne negativne učinke na njihovu održivost.



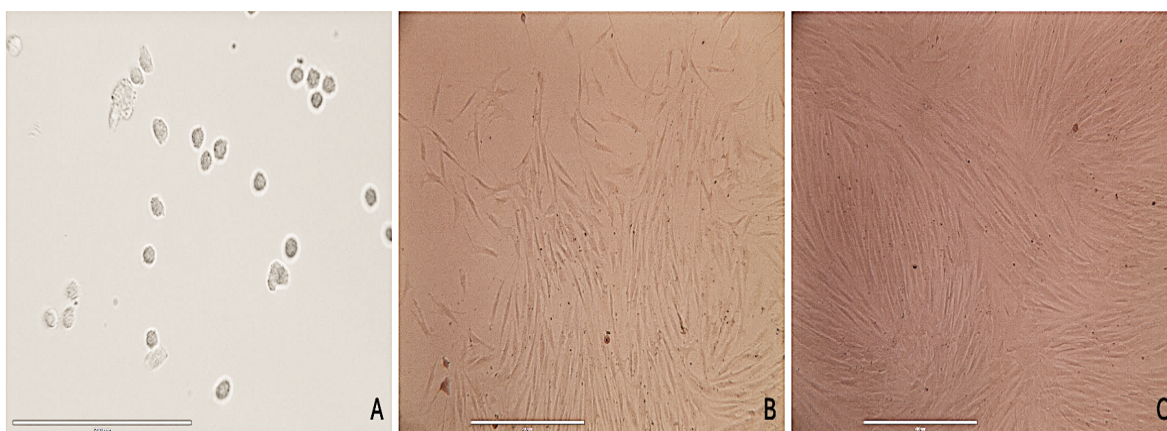
Slika 5. Biopstat oralne sluznice. Nakon uspješne “punch” biopsije, biopstatu su stavljeni u smjesu enzima kolagenaze/dispaze (A). Enzimi su uspješili odvajanje epitela (označen bijelom strelicom) od *lamine propriae* (označeno crnom strelicom) (B). Slike preuzete uz dozvolu Laboratorija za matične stanice (Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu).

Rezultati istraživanja pokazuju uspješno uspostavljeni protokol izolacije i uzgoja homogene populacije matičnih stanica iz oralne sluznice. Kombinacija enzima kolagenaze i dispaze te optimalna inkubacija na 37°C pokazali su se ključnima za uspješno odvajanje epitela od *lamine propriae*. Također, niža koncentracija tripsina (0,25%) omogućila je optimalno odvajanje adherentnih stanica uz minimalnu smrtnost, što je bitno za daljnji rast stanica i istraživanje ovih stanica

5.1.1. Morfologija matičnih stanica oralne sluznice

Nakon uspješne izolacije stanica iz oralne sluznice i uspostave primarne kulture matičnih stanica oralne sluznice (hOMSC), dobiveni rezultati pokazuju nekoliko važnih osobina tih stanica koje ih razlikuju od drugih tipova matičnih stanica.

Prva značajka je njihov tipičan izduženi oblik. Ovaj oblik je specifičan za hOMSC neposredno nakon izolacije, a tijekom uzgoja stanice poprimaju morfološki homogeni fenotip. Njihova izduženost, nastavci s centralno smještenom jezgrom i izraženom jezgricom omogućuju njihovo prepoznavanje pod mikroskopom. Ovakav morfološki izgled ukazuje na njihovu sposobnost da prijanjaju na podlogu bez potrebe za premazivanjem pločica lamininom ili kolagenom, što je čest zahtjev za druge stanične linije. To čini ove stanice relativno jednostavnima za uzgoj u staničnoj kulturi, te predstavlja još jednu prednost za eventualnu primjenu u medicini.



Slika 6. Morfologija oralnih matičnih stanica (hOMSC). Slika (A) prikazuje pojedinačne stanice nakon disocijacije. Nakon 48 h uspješno su bile priljepljene za podlogu te pokazuju karakterističnu morfologiju izduženog oblika, tipičnu za matične stanice u početnoj fazi rasta (B). Kada stanice dosegnu konfluentnost od 90% pokazuju zavojitu konformaciju što ukazuje na potpunu adheziju stanica i njihovu međusobnu interakciju. Slikano na EVOS FL Auto System (Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu) sustavu za slikanje stanica. Mjerna crta 200 μm (A,B) i 400 μm (C).

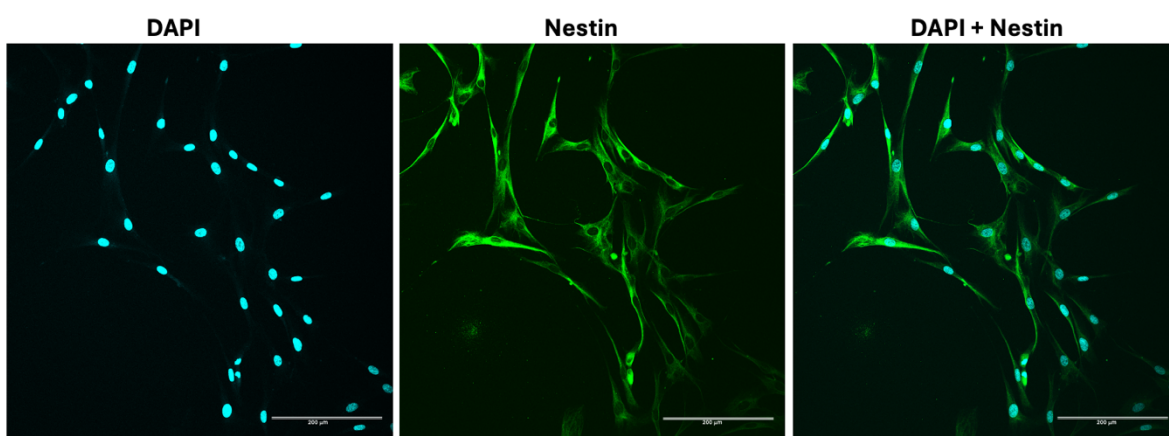
Također, stanice su pokazale visoku otpornost i prilagodljivost. Njihova sposobnost brzog rasta i dijeljenja potvrđena je činjenicom da su bile spremne za pasažiranje svaka tri dana. Pri postizanju 90%-tne konfluentnosti, ove stanice formiraju specifične zavijene linijaste strukture. Ovakav uzorak rasta potencijalno može ukazivati na organizaciju stanica koja je važna za njihovu funkcionalnost i specijalizaciju u tkivima, što je važno za daljnje istraživanje njihovih diferencijacijskih sposobnosti i terapijskog potencijala. Ovakva sposobnost stanične kolonizacije ukazuje na njihov visoki kapacitet za samoobnavljanje, koji je bitan za primjene u regenerativnoj medicini.

Rezultati opisani u ovom dijelu sugeriraju da hOMSC posjeduju sve ključne karakteristike potrebne za daljnja istraživanja i potencijalnu kliničku primjenu. Njihova morfologija, otpornost, brzina dijeljenja i sposobnost stvaranja kolonija čine ih obećavajućim kandidatom za regenerativne terapije.

5.2. Izražaj biljega matičnosti *NESTIN* i *SOX2* u matičnim stanicama oralne sluznice

Kako bismo definirali identitet matičnih stanica oralne sluznice temeljem izražavanja specifične kombinacije gena, testirali smo *NESTIN*, *SOX2* i *OCT4*. Za to smo koristili lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR) i imunocitokemiju (ICC).

Biljeg *NESTIN* je specifičan za održavanje svojstva matičnost stanica. Glavni je intermedijalni filamentni (IF) protein tipa IV. Povezan je s osnovnim funkcijama kao što su regeneracija, proliferacija, diferencijacija i migracija (131). Na temelju toga, prepostavili smo da bi *NESTIN* trebao biti izražen u hOMSC-ima. Naša pretpostavka je potvrđena ICC analizom, gdje je više od 95% hOMSC-a pokazalo izraženost ovog biljega što upućuje na visoku razinu matičnosti stanica.

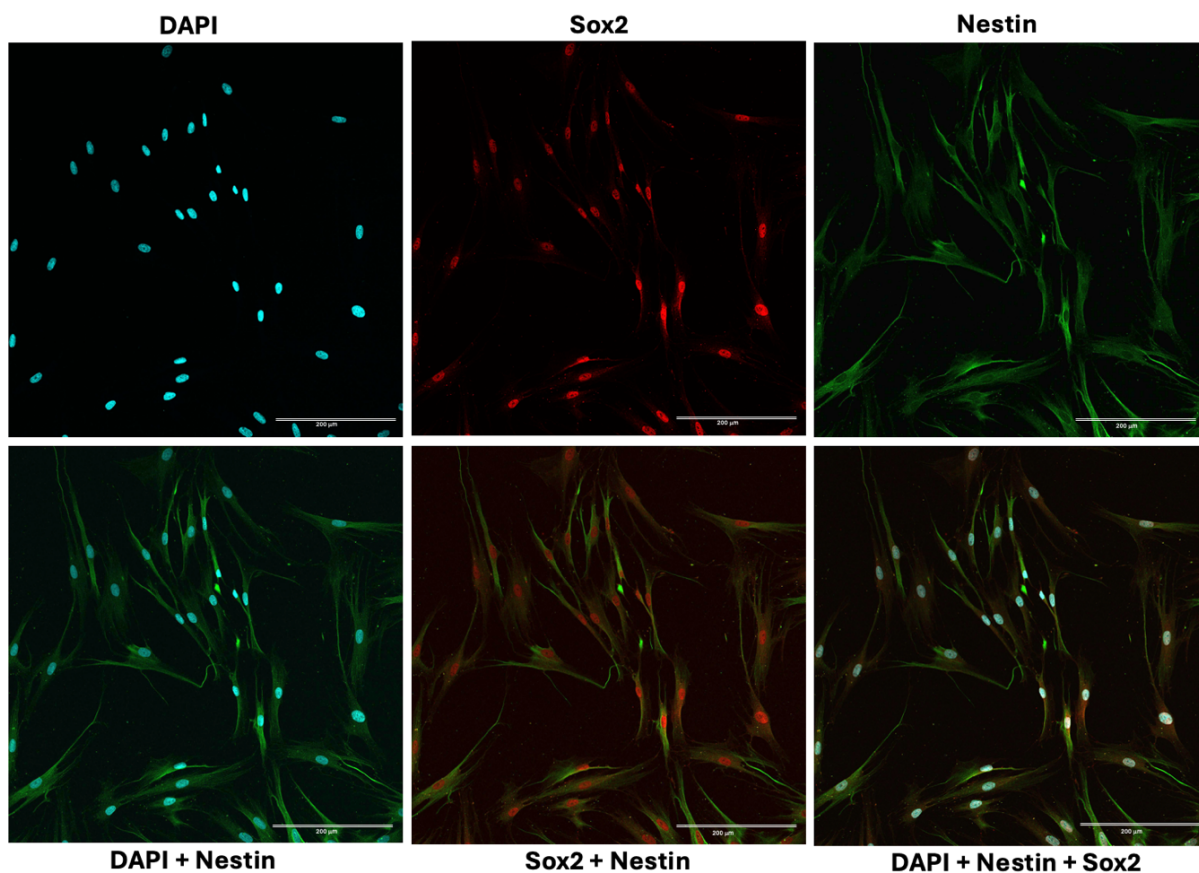


Slika 7. Izražaj biljega matičnosti *NESTIN* u hOMSC stanicama. Imunocitokemijski (ICC) prikaz izražaja biljega *NESTINA* (zeleno) u hOMSC-ima. Ovaj biljeg matičnosti lokalizira se u citoplazmi stanica. Jezgre stanica su obojene pomoću DAPI boje (plavo) koja omogućava vizualizaciju nuklearnih struktura i razlikovanje jezgra stanica od citoplazmatskih dijelova. Većina stanica na slici pokazuje snažnu pozitivnost na *NESTIN* što sugerira njihovu pluripotentnost ili multipotentnost. Slike su snimljene pomoću konfokalnog mikroskopa pri povećanju 20x (Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu). Mjerna crta je 200 µm.

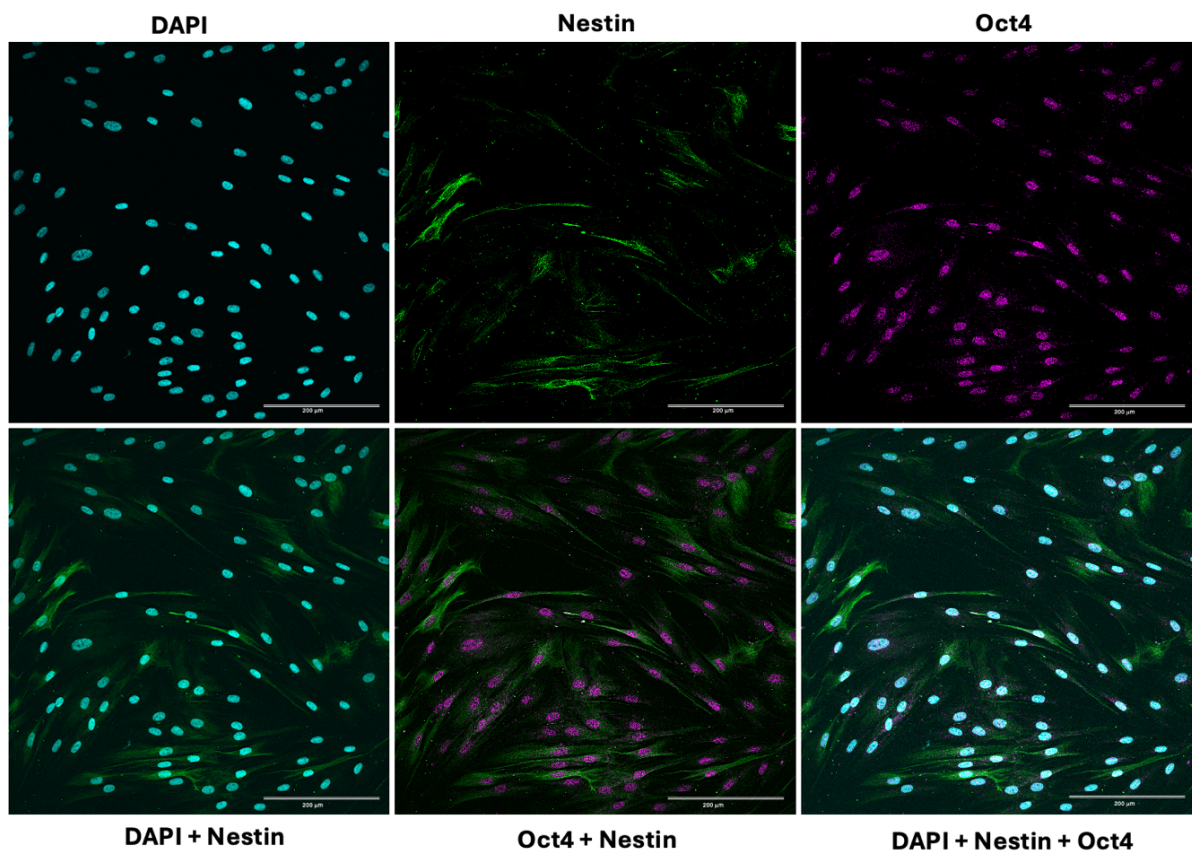
Biljeg SOX2 je transkripcijski čimbenik izražen u embrionalnim matičnim stanicama (ESC) i ima važnu ulogu u održavanju stanične pluripotentnosti (132). Pretpostavljajući da su stanice pozitivne na marker nestin, očekivali smo da će biti i na SOX2 što je uspješno potvrđeno s ICC i RT-PCR-om.

Biljeg OCT4 također je jedan od transkripcijski čimbenik čija je prisutnost bila očekivana kod hOMSC, jer je često izražen uz SOX2. On je od iznimne važnosti za pluripotentnost stanica, a izražaj mu se gubi njihovom diferencijacijom (133). Većina stanica pozitivno je izražavala ovaj biljeg što je potvrdila i ICC.

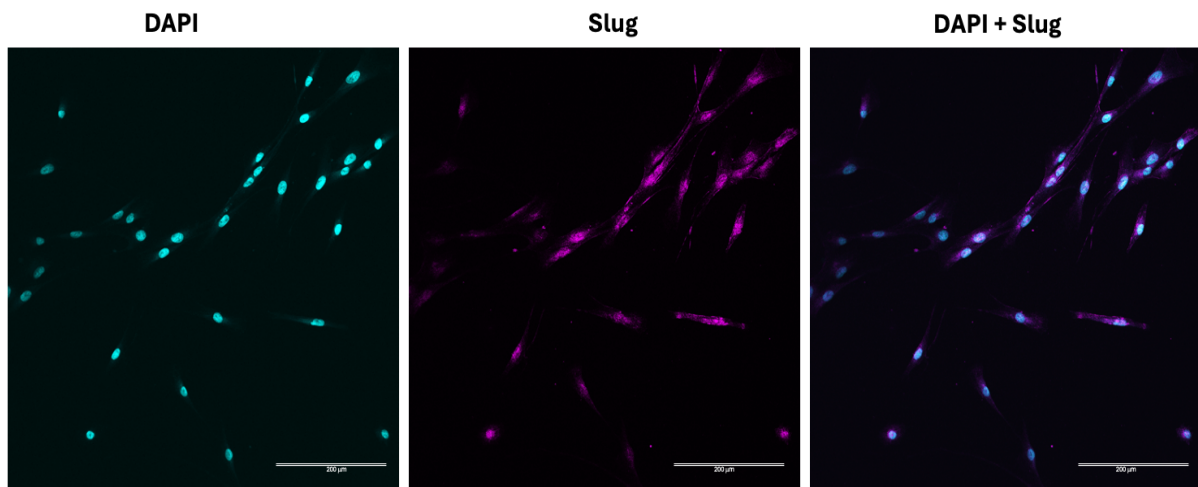
SLUG (SNAIL2) je važan biljeg koji ukazuje na mezenhimsku prirodu hOMSC-a. Kod matičnih stanica on je povezan s održavanjem njihove plastičnosti i multipotentnosti. Metodom ICC nismo uspjeli dobiti zadovoljavajuće rezultate, ali pomoću RT-PCR-a smo ga detektirali u stanicama.



Slika 8. Izražaj biljega *SOX2* i *NESTIN* u hOMSC stanicama. Imunocitokemijski (ICC) prikaz izražaja biljega *SOX2* (crveno) u hOMSC stanicama koji je detektiran u jezgrama. Većina stanica pokazuje snažnu pozitivnost na *SOX2* što ukazuje na njegovu značajnu ulogu u održavanju pluripotentnih svojstava tih stanica. Citoplazmatski nastavci stanica prikazani su pomoću biljega *NESTIN* (zeleno). On se ističe u obliku filamentoznih struktura unutar citoplazme čime se označavaju potencijalne proliferativne ili neurorazvojne stanice. Jezgre su prikazane pomoću DAPI boje (plavo). Slike su snimljene konfokalnim mikroskopom pri povećanju 20x (Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu). Mjerna crta je 200 µm.

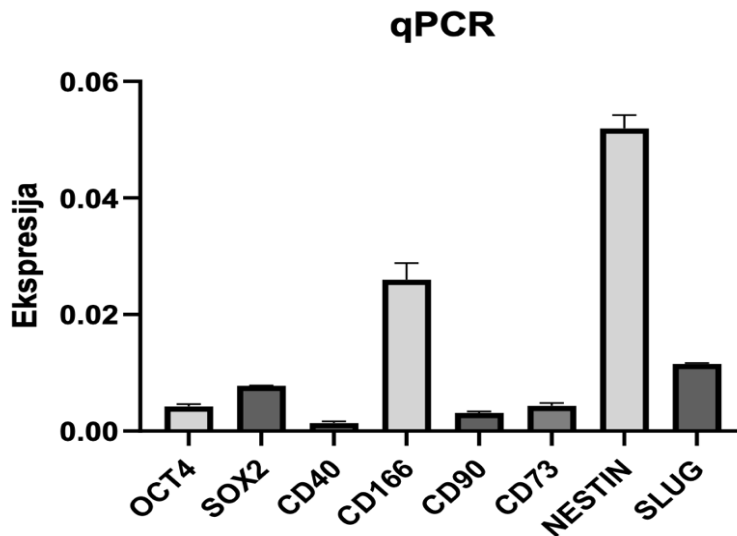


Slika 9. Izražaj biljega *OCT4* i *NESTIN* u hOMSC stanicama. Imunocitokemijski (ICC) prikaz pozitivnog izražaja biljega *OCT4* (ljubičasto) koji je lokaliziran unutar jezgri hOMSC stanica. Njegova prisutnost sugreira na pluripotentnu karakteristiku ovih stanica. Citoplazmatski nastavci stanica prikazani su pomoću biljega *NESTIN* (zeleno) koji se često povezuje s neuralnim progenitorskim stanicama, naglašavajući neuralni potencijal ovih stanica. Slike su snimljene konfokalnim mikroskopom pri povećanju od 20x (Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu). Mjerna crta je 200 µm.



Slika 10. Izražaj biljega *SLUG* u hOMSC stanicama. Imunocitokemijski (ICC) prikaz izražaja biljega *SLUG* u hOMSC-ima. *SLUG* je prikazan ljubičastom bojom i vidljiv je u jezgri i citoplazmi stanica što upućuje na njegovu prisutnost i aktivnost unutar njih. Jezgre svih stanica obojene su DAPI bojom (plavo) što olakšava razlikovanje stanica u prikazu. Slike su snimljene konfokalnim mikroskopom pri povećanju od 20x (Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu). Mjerna crta je 200 µm,

Pomoću RT-PCR-a analiziran je izražaj dodatnih biljega: CD166, CD90 i CD73 i CD40. Za razliku od RT-PCR-a, imunocitokemijska (ICC) analiza nije bila dovoljno osjetljiva da bi jasno detektirala sve markere u ovoj populaciji stanica stoga je ovom metodom dodatno provjeren i dokazan izražaj biljega. Biljeg CD166 koji je specifičan za MSS, pokazao je posebno visoku razinu izražaja u stanicama. Potvrđena je pozitivna ekspresija i biljega CD90 i CD73 dok izražaj CD40 je neznatno detektiran što je ujedno odvojilo hOMSC od fibroblasta.



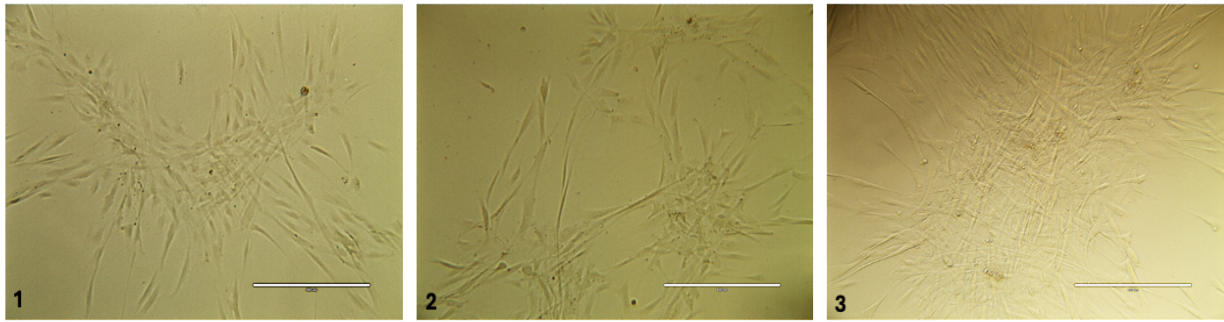
Slika 11. Izražaj biljega hOMSC stanica. Graf prikazuje rezultate RT-PCR analize za specifične biljege u stanicama hOMSC. Na x-osi su prikazani analizirani biljezi: OCT4, SOX2, CD40, CD166, CD90, CD73, *NESTIN* i *SLUG* dok y-os prikazuje relativan izražaj biljega. Iz grafa se može uočiti da su biljezi CD166, *NESTIN* i *SLUG* izraženi u visokom intenzitetu u odnosu na ostale i samim time potvrđuju da hOMSC potječu od neuralnog grebena. Biljezi *OCT4* i *SOX2* ukazuju na pluripotentni potencijal stanica. Biljezi CD90 i CD73 također pokazuju mjerljiv izražaj, ali u nižim razinama. Biljeg CD40 ima najmanji izražaj među analiziranim biljezima s minimalnim prisutnim signalom što dodatno hOMSC odvaja od fibroblasta. Vrijednost izražaja za svaki pojedini pokus dobivena je normalizacijom intenziteta pojedinih signala s odgovarajućim signalom β -Aktina.

5.3. Diferencijacija matičnih stanica oralne sluznice

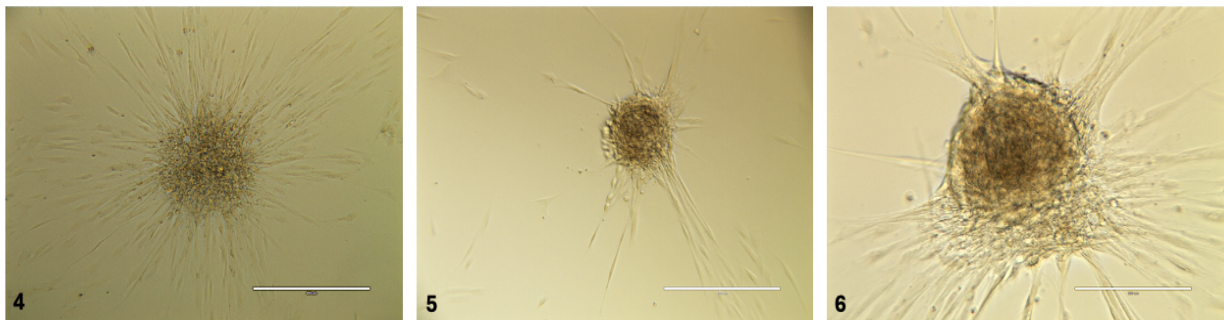
Pretpostavljajući da hOMSC potječu od neuralnog grebena, trebao se ispitati njihov potencijal za diferencijaciju prema živčanom tkivu. Diferencijaciju hOMSC-a opisuje proces u kojem ove stanice počinju poprimati specifične karakteristike nekog tkiva, u ovom slučaju živčanog.

Kako bi se ispitao diferencijacijski potencijal stanica, bile su uzgajane u Neurobasalnom mediju koji je dizajniran za održavanje diferencijacije u živčane stanice. Suplementi N2 (1%) i B27 (2%) su bili dodani kako bi se stimulirao rast i razvoj stanica u smjeru živčanog tkiva. Medij se mijenjao svaka dva dana te se pod mikroskopom pratila promjena morfologije stanica. Tijekom prvog tjedna, nije bilo značajnih morfoloških promjena osim povećanja broja stanica. Ovo sugerira da su stanice prolazile kroz proliferaciju, ali još nisu ušle u fazu diferencijacije. Nakon 10 dana, stanice su se počele organizirati u male kuglaste nakupine, ali su i dalje bile adherentne (pričvršćene) za podlogu. Iz nakupina su počele izrastati stanice koje se zrakasto-radijalno šire od glavne skupine stanica. Ove nakupine predstavljaju početne znakove organizirane diferencijacije. Oko 15. dana uzgoja stanice su se odvojile od podloge i počele slobodno plutati u mediju. Ovaj fenomen stvaranja sfernih struktura u kulturi često je znak stanične diferencijacije u smjeru živčanih stanica.

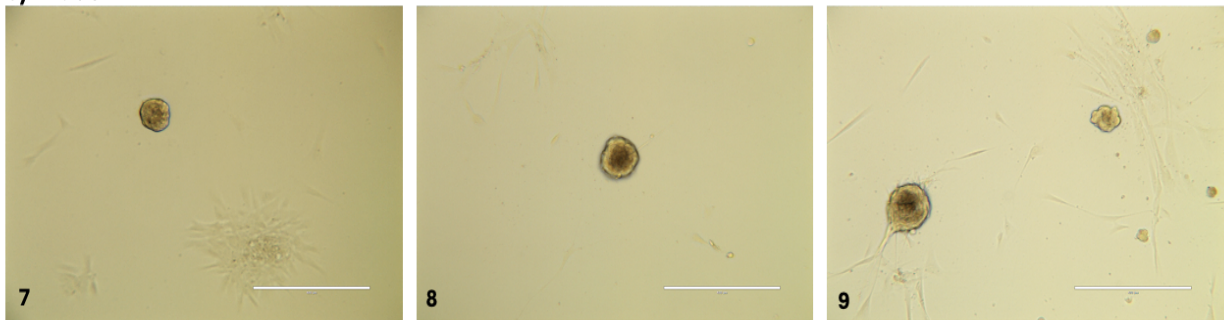
a) 8. dan



b) 10. dan

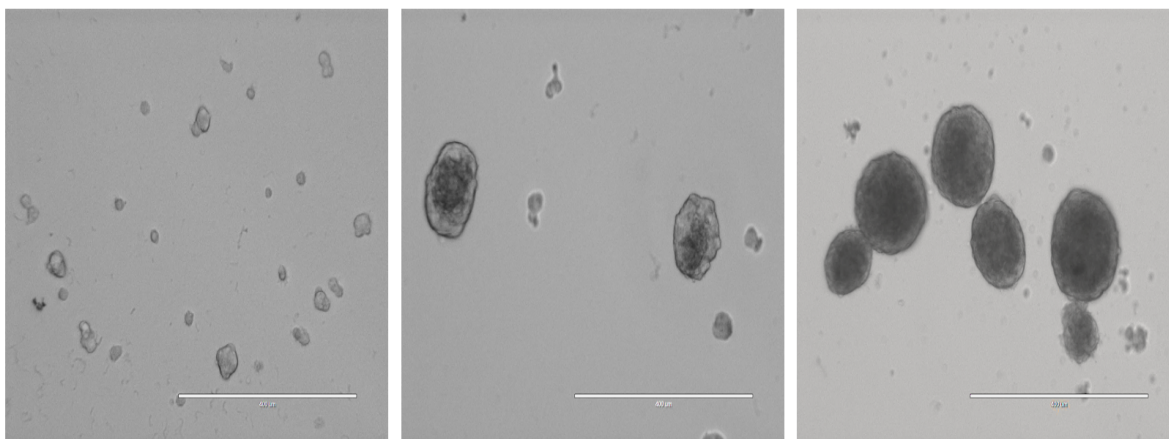


c) 12. dan



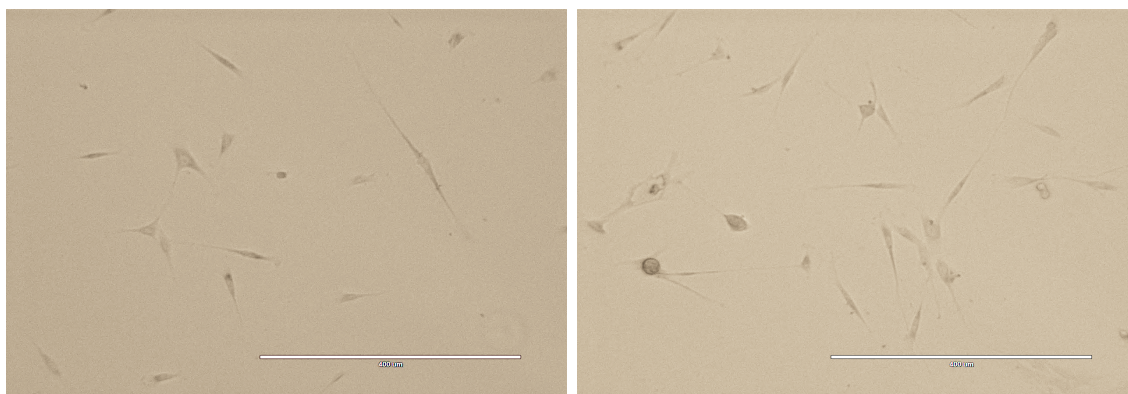
Slika 12. Sferne (kuglaste) nakupine stanica hOMSC u Neurobasalnom mediju.

a) Nakon 8 dana u neurobasalnom mediju, hOMSC počinju migrirati i usmjeravati se prema centralnoj točki, stvarajući početne oblike sfernih nakupina. **b)** Nakon 10 dana, jasno su vidljive kuglaste formacije iz kojih zrakasto izrastaju stanice koje su orijentirane prema vanjskom dijelu sfere. Stanice ostaju adherentne za podlogu. **c)** Do 12. dana formiraju se dobro definirane sfere koje su i dalje pričvršćene za podlogu, zadržavajući karakterističan sferni oblik. Sve slike su snimljene pomoću EVOS FL Auto System (Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu) sustava za slikanje stanica. Mjerna crta je 400 μm (slike 1,2,3,4,5,7,8,9) i 200 μm (slika 6).



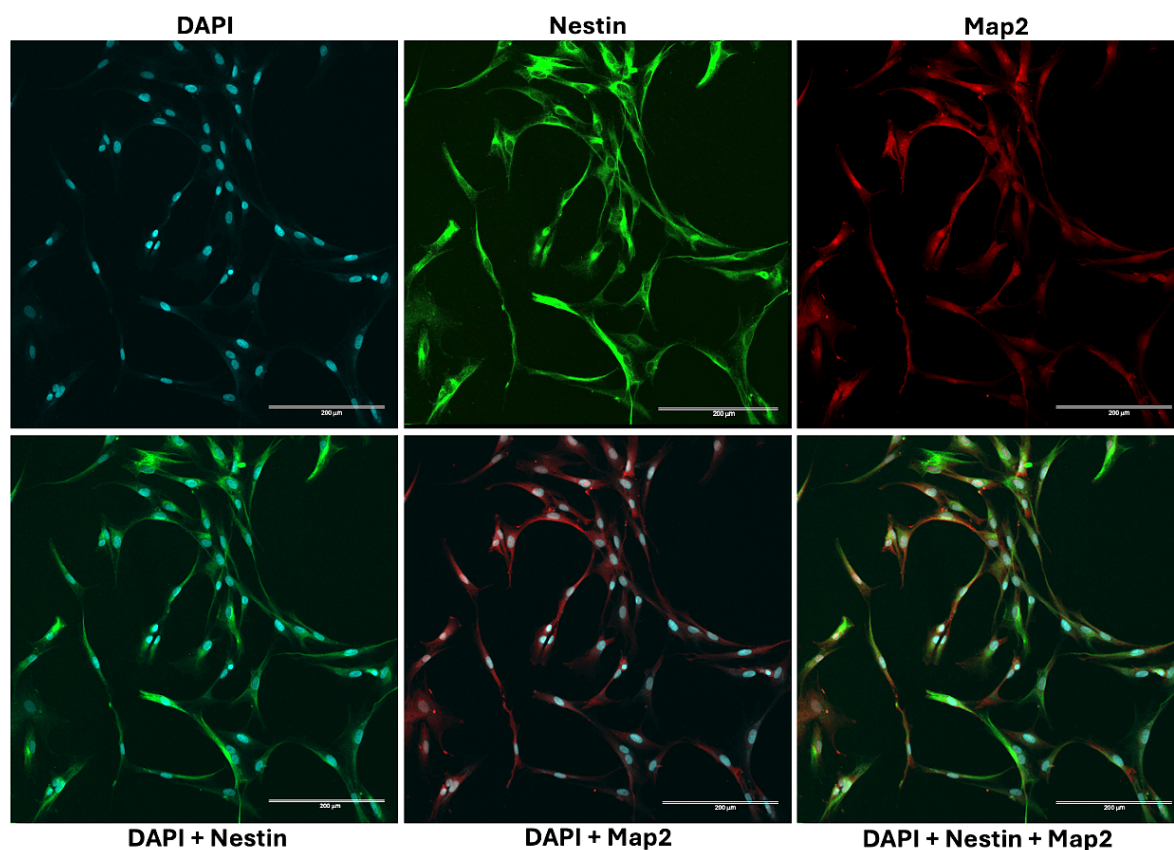
Slika 13. Slobodno plutajuće sferne nakupine stanica nakon 15 dana uzgoja.

Na slici su prikazane sferne nakupine stanica koje su se nakon 15 dana uzgoja odvojile od podloge te slobodno plutale u mediju. Ovaj fenomen ukazuje na promjenu u prijanjanju stanica što može biti znak diferencijacije ili druge fiziološke promjene u stanicama. Snimljeno pomoću EVOS FL Auto System (Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu) sustava za slikanje stanica. Mjerna crta iznosi 400 μm .



Slika 14. Stanice razbijenih sfera. Nakon razbijanja sfernih nakupina, oslobođene stanice su nasadene na stakalca premazana poli-D-lizinom. Uočljiv je drugačiji fenotip stanica u odnosu na hOMSC stanice koje sada imaju znatno izdužene stanične izadnke. Snimka je napravljena pomoću EVOS FL Auto System (Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu) sustava za slikanje stanica. Mjerna crta je 400 μm .

Kako bi se istražio daljnji potencijal hOMSC-a za proliferaciju i diferencijaciju primijenio se postupak pasažiranja. Medij sa sferama se pokupio i stavio na centrifugiranje kako bi ostale samo sferne nakupine. Razbijene sferne nakupine bile su nasađene na stakalca. Na stanicama je napravljena ICC koristeći neuralni biljeg *MAP2* te biljeg matičnosti Nestin.



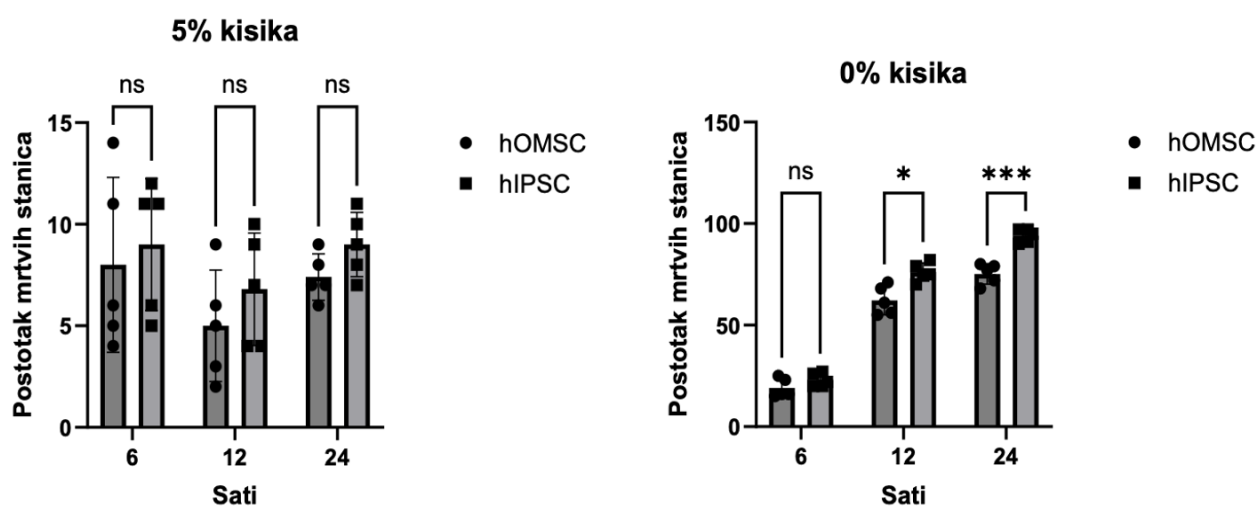
Slika 15. Istraživanje potencijala stanica u sferama. Za detaljniju analizu diferencijacije, provedena je imunocitokemijska analiza (ICC). DAPI (plavo) označava jezgre dok *MAP2* (crveno) i *NESTIN* (zeleno) označavaju citoplazmatske markere. Stanice pokazuju izduženu morfologiju karakterističnu za živčane stanice te su pozitivne na biljeg *MAP2*. Ovi rezultati sugeriraju potencijal diferencijacije stanica iz sfera prema neuralnim fenotipovima. Snimljeno konfokalnim mikroskopom pri povećanju 20x (Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu). Mjerna crta je 200 µm.

5.4. Otpornost matičnih stanica oralne sluznice u uvjetima anoksije

Budući da je jedan od ciljeva ove disertacije bio istražiti potencijal hOMSC-a u tretiranju živčanog tkiva oštećenog hipoksijom, prvo se istražio utjecaj anoksije na ponašanje hOMSC-a. Za usporedbu su bile korištene komercijalno dobivene ljudske iPSC. Eksperiment je proveden kako bi se usporedila preživljenja stanica pod različitim razinama kisika i u različitim vremenskim točkama.

Obje stanične linije (hOMSC i iPSC) su bile izložena razini kisika od 5% i od 0%. Odabrane su bile tri vremenske točke u kojima se uspoređivalo preživljenje stanica nakon 6 h, 12 h i 24 h izlaganja. Preživljenje i smrt stanica analizirani su pomoću komercijalno dostupnog kita za za Live/Dead test koji omogućuje kvantifikaciju živih i mrtvih stanica u stvarnom vremenu.

Provedeni eksperiment je pokazao da su i hOMSC i iPSC imale visoku stopu preživljenja u uvjetima s 5% kisika što je bilo očekivano jer je poznato da niža razina kisika pogoduje matičnim stanicama, omogućavajući im da zadrže svoja svojstva i bolje proliferiraju. Stoga je uočen porast broja stanica u obje stanične linije za otprilike 150% nakon 24 h što ukazuje na intenzivnu proliferaciju pod blagim hipoksičnim uvjetima. Visoka stopa preživljenja hOMSC-a i slična proliferacija kao kod iPSC-a ukazale su na to da hOMSC imaju sposobnost prilagodbe na blago hipoksične uvjete koji su često prisutni unutra niša matičnih stanica.



Slika 16. Usporedba hOMSC i iPSC u uvjetima anoksije. Grafikoni prikazuju izloženost dviju staničnih populacija, hOMSC i iPSC, uvjetima s 0% kisika i 5% kisika. Izloženost stanica ovim uvjetima analizirana je u tri vremenske točke: 6h, 12h i 24h koje su prikazane na x-osi, a postotak mrtvih stanica prikazan je na y-osi. Može se uočiti kako nema statistički značajne razlike između staničnih populacija kod izlaganja 5% kisika isto kao i kod utjecaja vremenskog perioda izloženosti stanica. Kod izlaganja hOMSC i iPSC 0% kisika, prvih 6h nisu uočene značajne razlike, ali nakon 12h i 24h uočeno je kako su hOMSC znatno rezistentnije u odnosu na iPSC. Napravljena je two-way Anova. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost smatrana je ukoliko je $p < 0.01$ (**) ili $p < 0.05$ (*), a $p > 0.05$ statistički beznačajnim (ns).

Iako su hOMSC i iPSC pokazale slične rezultate u uvjetima s 5% kisika, iznenađujuće je bilo da su hOMSC pokazale značajno veću otpornost u uvjetima potpune anoksije, razina kisika 0%. Analiza stanica nakon 6 h izlaganja anoksičnim uvjetima nije ukazala na značajne razlike između hOMSC-a i iPSC-a. Obje stanične linije pokazivale su visoku stopu preživljenja, bez vidljivih znakova oštećenja ili gubitka funkcionalnosti. Međutim, nakon 12 sati anoksije, prve promjene u preživljenju stanica postale su očite gdje je pokazano da je manje od 20% iPSC stanica preživjelo, dok je kod hOMSC-a stopa preživljenja bila znatno viša, oko 50%. Ovo je značajan nalaz, jer sugerira da hOMSC imaju veću otpornost na dugotrajni nedostatak kisika u usporedbi s iPSC-om. Nakon

24 h anoksije, učinci su postali još izraženiji. Preživljenje iPSC stanica bilo je gotovo nepostojeće, dok je hOMSC stanica uspjelo preživjeti oko 20%, što je vrlo značajan rezultat s obzirom na ekstremne uvjete. Ovi podaci sugeriraju da su hOMSC daleko otpornije na uvjete ekstremne hipoksije u odnosu na iPSC.

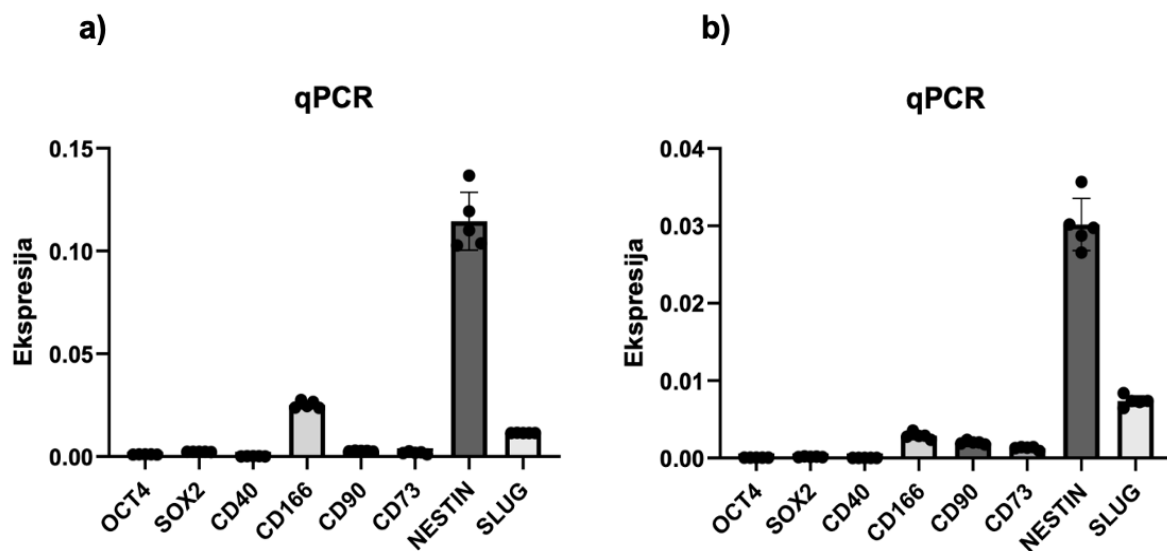
Rezultati jasno pokazuju ključnu razliku između otpornosti hOMSC-a i iPSC-a na uvjete anoksije. Dok su iPSC, unatoč svojoj pluripotentnost, pokazale vrlo ograničenu sposobnost preživljavanja u uvjetima potpunog nedostatka kisika, hOMSC su pokazale značajnu rezistentnost. Ova povećana otpornost hOMSC-a može biti povezana s njihovim izvornim okolišem, budući da oralna sluznica ima kapacitet za oporavak i prilagodbu na stresne uvjete, uključujući povremenu hipoksiju, što možda objašnjava njihovu veću izdržljivost u laboratorijskim uvjetima anoksije.

5.5. Utjecaj trajanja ko-kulture hOMSC i zrelih neurona na genski izražaj hOMSC-a

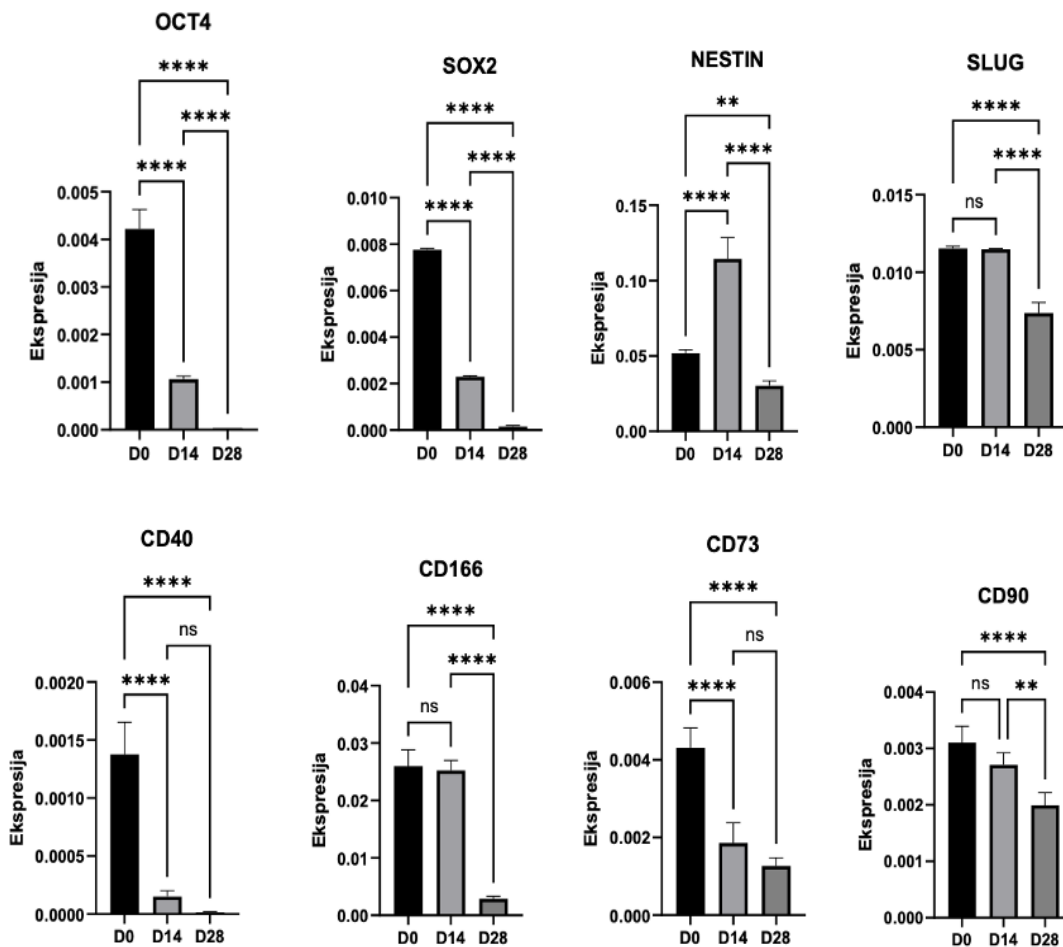
Kako bi se istražilo kako se hOMSC ponašaju kada su izložene živčanom tkivu, bile su uzgojene s neuronima dobivenim iz ljudskih iPSC (DIV50) tijekom 28 dana. Odabrane su bile tri vremenske točke tokom koji je analizirana ekspresija markera pomoću RT-PCR-a.

Prva vremenska točka D0, referentna točka, omogućila je praćenje promjene genskog profila hOMSC-a pod utjecajem živčanog tkiva. Kao što je potvrđeno i prilikom karakterizacije samih stanica, očekivalo se da će nulti dan iskazivati biljege pluripotencije poput *OCT4* i *SOX2* što je i potvrđeno. Uočeno je da hOMSC iskazuju visoku razinu ovih biljega, ali isto tako i biljega mezenhimskog podrijetla *CD166*, *CD90* i *CD73* te biljega neuralnog grebena *NESTIN* i *SNAIL2*. Biljezi neuralnog grebena bili su jasno pozitivni i potvrdili važnu pretpostavku da su hOMSC tog podrijetla. Važno je uočiti kako je biljeg fibroblasta *CD40* bio negativan, čime se dodatno potvrdila jedinstvenost ovih stanica.

Nakon uspješno uspostavljene ko-kulture neurona sa stanicama hOMSC-a, sljedeća vremenska točka bio je 14. dan (D14). Ova vremenska točka omogućila je praćenje promjene genskog profila hOMSC-a, te kako se on mijenja pod utjecajem živčanog tkiva. Uočio se smanjeni izražaj biljega pluripotencije *OCT4* i *SOX2* što ukazuje na početak diferencijacije i prijelaza prema specifičnim staničnim tipovima. Smanjena ekspresija *CD73* biljega, dodatno podržava ovu tranziciju jer ukazuje na postupno gubljenje tipičnih svojstava mezenhimskih stanica. S druge strane, povećan izražaj *NESTINA* ukazuje da hOMSC pod utjecajem živčanog tkiva počinju poprimiti fenotip koji je bliži neuralnoj liniji što je u skladu s pretpostavkom da su podrijetlom neuralnog grebena. Zadnja vremenska točka koja je bila uzeta je 28. dan ko-kulture, D28. Izražaj mnogih ključnih biljega i čimbenika rasta, značajno se smanjio što sugerira da nakon dulje izloženosti živčanom tkivu, hOMSC postupno gube svoja inicijalna obilježja pluripotencije.



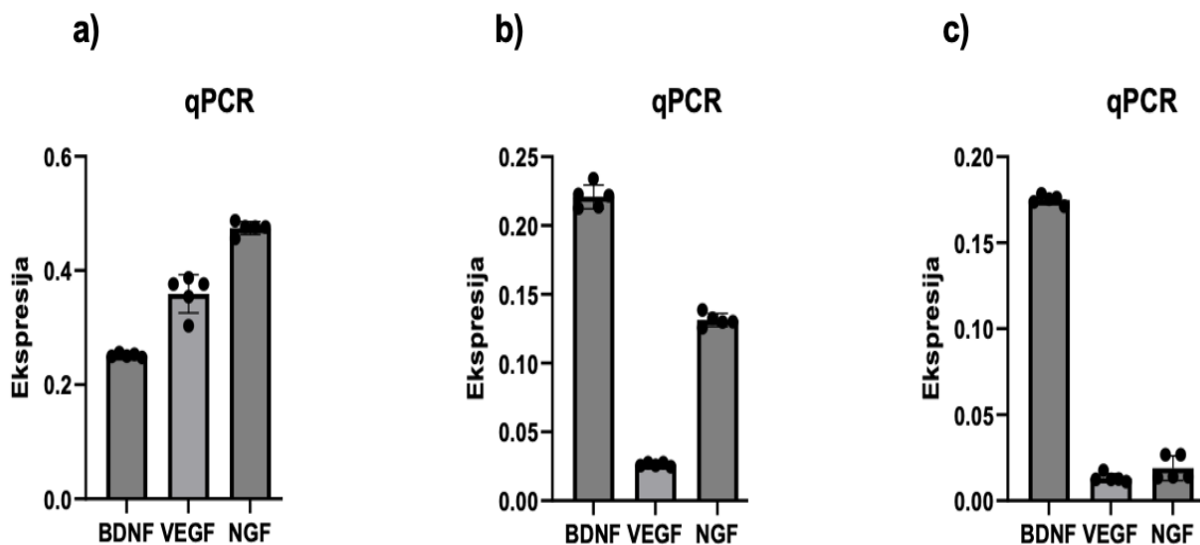
Slika 17. Promjena genskog profila hOMSC ovisno o duljini izlaganja neuronskoj kulturi. Uspostavljena ko-kultura između neurona i hOMSC-a ukazuje na promjenu u izražaju biljega hOMSC-a ovisno o vremenskom razdoblju izlaganja.. Na x-osi prikazani su biljezi, a na y-osi njihov izražaj. **a)** Grafički prikaz izražaja biljega kod hOMSC izloženih ko-kulturi 14 dana. Smanjena izražaj *OCT4* i *SOX2* ukazuje na smanjenu pluripotentnost hOMSC-a. Povećana izraženost *NESTINA* potvrđuje da hOMSC poprimaju fenotip stanica koje su podrijetlom od neuralnog grebena. **b)** Grafički prikaz izražaja biljega kod hOMSC izloženih ko-kulturi 28 dana. Nakon dužeg vremenskog izlaganja ko-kulturi neurona, izražaj mnogih ključnih biljega se značajno smanjio, što sugerira da hOMSC postupno gube svoja inicijalna obilježja pluripotentnosti. Vrijednost izražaja za svako pojedino mjerenje dobivena je normalizacijom intenziteta pojedinih signala s odgovarajućim signalom β -Aktina.



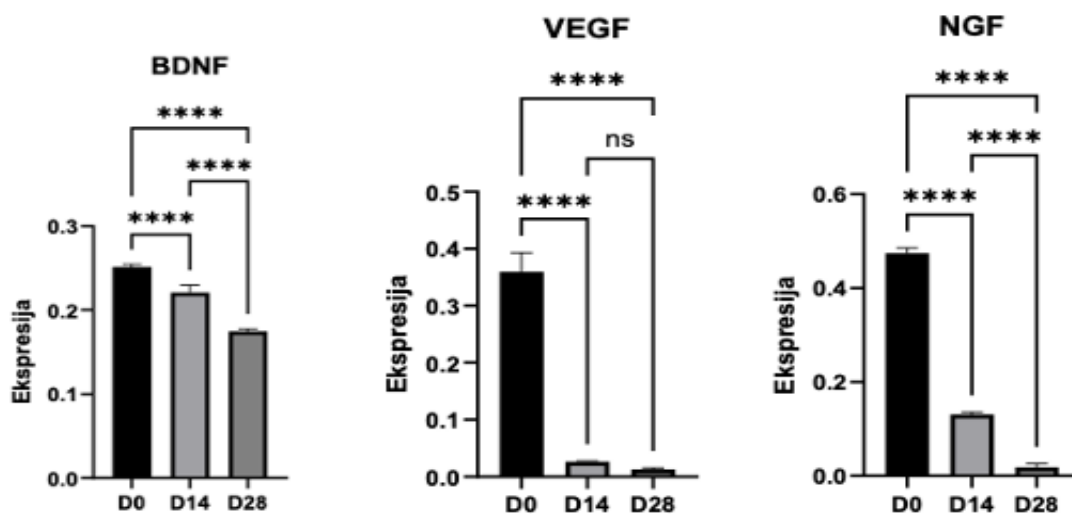
Slika 18. Izražaj specifičnih biljega hOMSC-a prema duljini izlaganja ko-kulturi.

Na x-osi prikazan je vremenski period izlaganja hOMSC-a kulturi neurona (D0, D14, D28), a y-os pokazuje njihovu izražaj normaliziran prema β -Aktinu. Najvažnije je istaknuti pozitivan izražaj biljega *NESTIN* i CD166, te da je detekcija izražaja biljega fibroblasta CD40 gotovo zanemariva. Vrijednost izražaja za svako pojedino mjerenje dobivena je normalizacijom intenziteta pojedinih signala s odgovarajućim signalom β -Aktina. Napravljena je one-way Anova. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost smatrana je ukoliko je $p < 0.01$ (**) ili $p < 0.05$ (*), a $p > 0.05$ statistički beznačajnim (ns).

Kako bi se istražila ovisnost lučenja molekula koje sudjeluju u obnovi tkiva u odnosu na dan diferencijacije, provjerena je prisutnost tri čimbenika rasta – BDNF, VEGF i NGF. BDNF (engl. *Brain-Derived Neurotrophic Factor*) igra važnu ulogu u preživljavanju i rastu neurona, te u sinaptičkoj plastičnosti. VEGF (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*) poznat je po svojoj ulozi u angiogenezi, ali također ima značajne neuroprotektivne funkcije koje pomažu u održavanju zdravlja neuronskog tkiva. NGF (engl. *Nerve Growth Factor*) je presudan za rast, održavanje i preživljavanje simpatičkih i senzoričkih neurona. Sva tri čimbenika su bila izražena u hOMSC-ima, a njihovo prisustvo omogućilo nam je da bolje razumijemo regenerativni potencijal hOMSC-a i njihovu moguću primjenu u terapijama za popravak neuronskih oštećenja, posebno nakon hipoksičnih ozljeda.



Slika 19. Izražaj faktora rasta: BDNF, VEGF i NGF kod hOMSC. Grafikoni prikazuju promjene u izražaju faktora rasta kod duljine izlaganja hOMSC kulturi neurona. Na x-osi su predstavljeni faktori rasta, a na y-osi njihov izražaj analizirana metodom RT-PCR u tri vremenske točke. **a)** Dan 0 predstavlja početnu točku, kada hOMSC nisu izložene ko-kulturi neurona. Zamijećena je pozitivan izražaj sva tri faktora od čega najviše NGF-a. **b)** Nakon 14 dana izlaganja, naglo raste izražaj BDNF, a VEGF značajno opada. **c)** Zadnja vremenska točka je bila 28 dan ko-kulture kada se može uočiti kako BDNF ima najveći izražaj u odnosu na dan 0 te kako izražaj ostalih faktora rasta značajno opada. Vrijednost izražaja za svako pojedino mjerenje dobivena je normalizacijom intenziteta pojedinih signala s odgovarajućim signalom β -Aktina.



Slika 20. Promjena izražaja faktora rasta: BDNF, VEGF i NGF kod hOMSC. Grafikoni prikazuju promjenu u izražaju faktora rasta kod hOMSC koje su izložene kulturi neurona. Izražaj BDNF, VEGF i NGF je analizirana pomoću RT-PCR metode u tri vremenske točke: D0, D14 i D28 (D - dani). BDNF je faktor s najvećim izražajem u odnosu na ostale. Vrijednost izražaja za svako pojedino mjerenje dobivena je normalizacijom intenziteta pojedinih signala s odgovarajućim signalom β -Aktina. Provedena je two-way ANOVA. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost smatrana je ukoliko je $p < 0.01$ (**) ili $p < 0.05$ (*), a $p > 0.05$ statistički beznačajnim (ns).

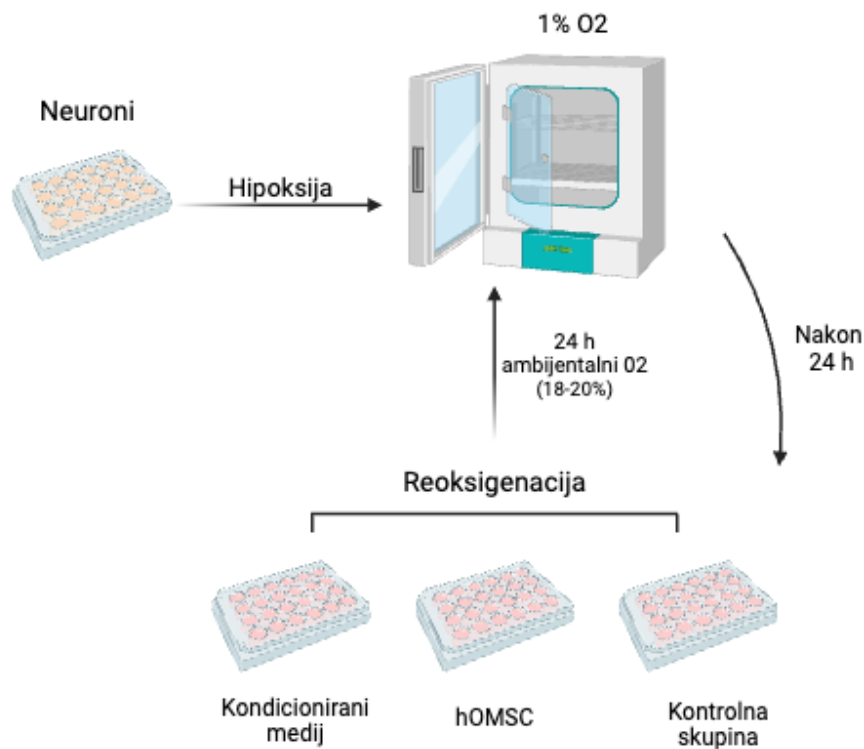
Ovi rezultati ukazuju na to da hOMSC-i kada su izloženi živčanom okruženju, prolaze kroz promjene u morfologiji i biljezima specifičnim za neuronsku diferencijaciju što potencijalno implicira njihovu sposobnost diferencijacije u smjeru živčanih stanica.

5.6. Utjecaj matičnih stanica oralne sluznice i njihovog kondicioniranog medija na hipoksijski oštećene neurone *in vitro*

Jedan od glavnih ciljeva ove disertacije je bio istražiti potencijal hOMSC-a za oporavak živčanog tkiva oštećenog hipoksijom. Kako bi se istražio potencijal ove nove populacije matičnih stanica, dizajnirao se pokus koji je uključivao deprivaciju kisika i glukoze (OGD), te hipoksijske uvjete od 1% kisika u inkubatoru. Dizajnom ovog pokusa simulirani su *in vitro* uvjeti moždanog udara. Također ispitan se utjecaj hOMSC-a i njihovog kondicioniranog medija na eventualni oporavak oštećenih neurona.

Nakon 24 h izloženosti hipoksijskim uvjetima, utvrđene su značajne razlike između kontrolne i eksperimentalne skupine neurona. Kontrolna skupina neurona pokazala je vrlo nisku stopu preživljenja gdje je više od 90% neurona bilo oštećeno što je bilo i u skladu s očekivanjima s obzirom na njihovu izloženost teškim hipoksičnim uvjetima.

Skupini neurona tretiranoj kondicioniranim medijem, dodala se kombinacija kondicioniranog medija (60%) i medija za rast neurona (40%). U ovoj skupini oko 22% neurona je pokazalo znakove oporavka, odnosno preživljenja što zapravo sugerira da faktori prisutni u kondicioniranom mediju hOMSC-a imaju neuroprotektivni učinak, ali ne u dovoljnoj mjeri kako bi omogućili veću stopu preživljenja neurona.



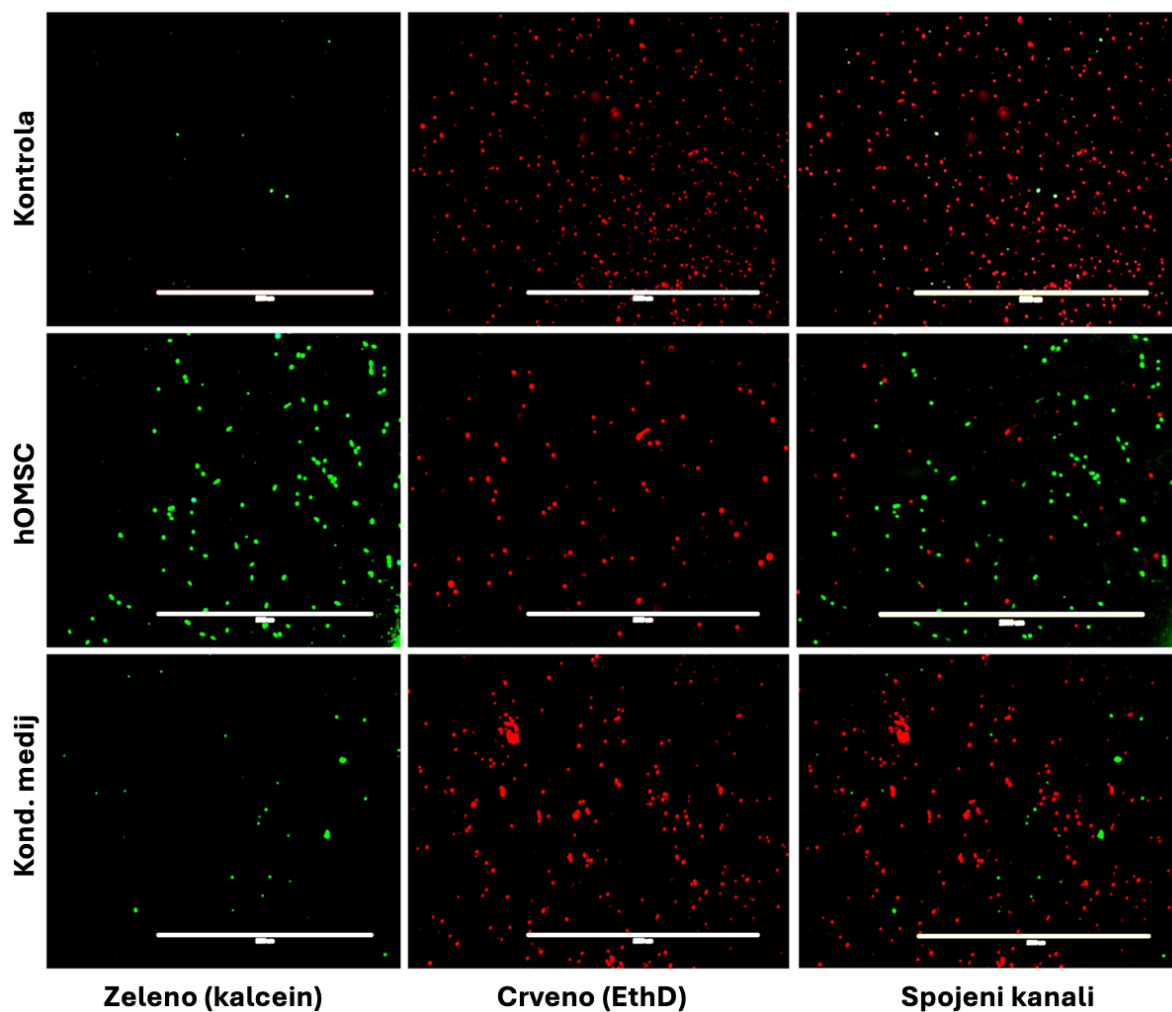
Created in BioRender.com 

Slika 21. Shematski prikaz plana pokusa. Neuronima nasađenim u pločice s 24 bunarića stavio se novi medij bez glukoze te su pločice prebačene u inkubator s 1% kisika na 24 h. Nakon 24h izlaganja hipoksiji, pločice s neuronima su bile izvađene. Kontrolnoj skupini se vratio medij za rast neurona, druga skupina tretirana je izravnim dodatkom hOMSC stanica, a treća skupina tretirana je kondicioniranim medijem dobivenim od hOMSC-a. Pločice s neuronima vratile su se u inkubator na 24 h reoksigenacije. Slika izrađena u programu BioRender.

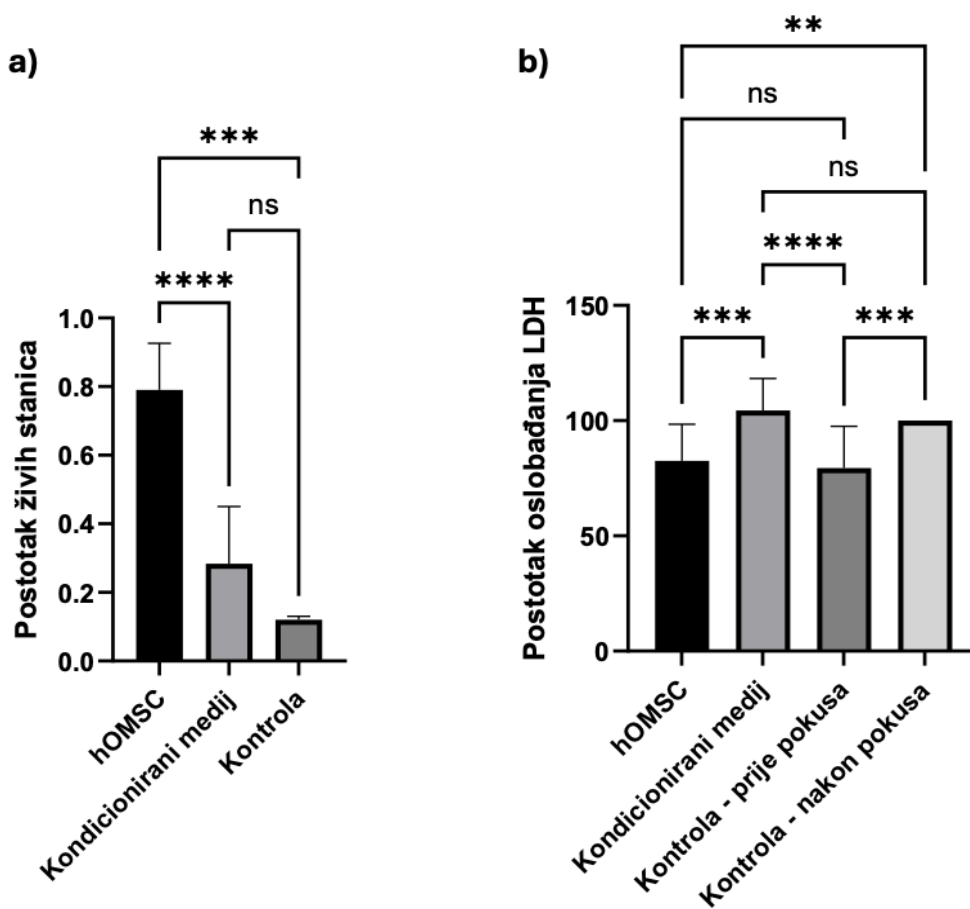
U skupini neurona koji su tretirani izravno s hOMSC stanicama, dodano je 100 000 st/ml u mediju za rast hOMSC-a. Izabran je upravo taj medij kako bi se izbjegao potencijalni utjecaj medija za rast neurona na same stanice hOMSC-a, ali i na neurone. Ovaj pristup omogućio je procjenu utjecaja izravnog kontakta hOMSC-a na oporavak hipoksijski oštećenih neurona. U ovoj skupini, oko 84% neurona je preživjelo.

Ovi rezultati nam ukazuju da izravan kontakt između neurona i hOMSC-a ima dostatan učinak na njihovo preživljenje te da ova interakcija može pružiti dodatne signale ili faktore koji potiču oporavak neurona.

Proveden je Live/Dead test prema uputama proizvođača na sve tri skupine, a pločice sa stanicama su poslikane na EVOS uređaju za snimanje slika. Analiza slika odrađena je pomoću programa Fiji.



Slika 22. Live/Dead test. Na slikama su zelenim kanalom prikazane žive stanice obojane kalceinom, a crvenim kanalom mrtve ili oštećene stanice obojane EthD (etidium homodimer-1). Iz slika se može uočiti kako skupina neurona tretirana izravnim dodatkom hOMSC-a pokazuje najveće preživljenje stanica. Kondicionirani medij također pokazuje preživljenje stanica u odnosu na kontrolu skupinu, ali u znatno manjoj mjeri. Slike su snimljene na EVOS FL Auto System (Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu) sustavu za slikanje stanica. Mjerna crta je 2000 μm .



Slika 23. Utjecaj hOMSC-a i kondicioniranog medija na preživljenje neurona.

a) Graf pokazuje utjecaj dvije skupine tretmana na hipoksijski oštećene neurone koje su prikazane na x-osi te postotak živih stanica na y-osi. Može se uočiti kako je tretman izravnim dodatkom hOMSC stanica imamo znatno bolji učinak na oporavak neurona u odnosu na kondicionirani medij dobiven od hOMSC što je i sam Live/Dead test pokazao.

b) Graf pokazuje koji postotak LDH se oslobodio prikazano na y-osi kod hipoksijski oštećenih neurona tretiranih hOMSC stanicama i njihovim kondicioniranim medijem, prikazano na x-osi. Manje LDH se otpustilo kod tretmana hOMSC stanicama što je u skladu s rezultatima koji su prikazani na grafu a). Ono što možemo zaključiti je da sam kondicionirani medij nije imao dovoljno pozitivan učinak na preživljenje neurona kao što je izravan kontakt s hOMSC-ima. Napravljen je one-way ANOVA. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost smatrana je ukoliko je $p < 0.01$ (**) ili $p < 0.05$ (*), a $p > 0.05$ statistički beznačajnim (ns).

Stupanj stanične smrti uzrokovane hipoksijskim oštećenjem neurona i utjecaj hOMSC-a te njihovog kondicioniranog medija na oporavak neurona procijenjen je mjerenjem oslobađanja laktat dehidrogenaze (LDH). LDH je enzim koji se oslobađa prilikom oštećenja staničnih membrana te je njegovo otpuštanje korišteno kao indikator citotoksičnosti i oštećenja stanica.

Za mjerenje oslobođene LDH, medij je prikupljen na dvije vremenske točke: na početku pokusa (prije hipoksijskog oštećenja neurona), što je služilo kao početna točka, te nakon 24 sata reoksigenacije. Na temelju koncentracije oslobođene LDH izračunata je razina hipoksijskog oštećenja tijekom reoksigenacije. Rezultati su pokazali razlike u razinama LDH oslobađanja između različitih eksperimentalnih skupina, što je omogućilo kvantifikaciju stupnja oštećenja neurona te utjecaja hOMSC-a i njihovog kondicioniranog medija na preživljenje stanica nakon hipoksije i reoksigenacije. Povećana razina LDH ne ukazuje nužno na smrtnost stanica nego na njihovo oštećenje i pokušaj stanica za oporavak.

Rezultati mjerenja oslobođene LDH pokazuju da hOMSC-i i njihov kondicionirani medij mogu imati pozitivan učinak na oporavak hipoksijom oštećenih neurona. Unatoč izazovima, rezultati sugeriraju da hOMSC-i bilo izravnim kontaktom s neuronima ili putem izlučenih faktora u kondicioniranom mediju mogu imati potencijal za regeneraciju oštećenog neuralnog tkiva. Potrebna su dodatna optimiziranja eksperimentalnog dizajna kako bi se smanjio stupanj stanične smrti i osigurali bolji uvjeti za preživljenje neurona nakon hipoksije. Time bi se omogućila preciznija evaluacija stvarnog terapijskog potencijala hOMSC-a u oporavku hipoksijskih oštećenja živčanog tkiva, što bi moglo imati važan doprinos u istraživanjima regenerativne medicine.

6. RASPRAVA

6.1. Važnost standardizacije protokola izolacije stanica

Istraživanje matičnih stanica predstavlja jedno od najperspektivnijih područja biomedicinskih znanosti. One nude potencijal za liječenje mnogih ozbiljnih bolesti uključujući i neurodegenerativne bolesti. Međutim, unatoč velikim mogućnostima, mnoga klinička istraživanja suočila su se s brojnim preprekama. Prepreke uključuju etičke dileme, posebno kada je riječ o već dobro poznatom izvoru embrionalnih matičnih stanica, gdje se postavljaju pitanja o prirodi života i moralnosti njihovog korištenja (134). Uz to, postoje i tehnički izazovi, poput kontrole diferencijacije stanica i rizika od stvaranja tumora. Sve te prepreke usporavaju napredak. Stoga je potraga za novim izvorom matičnih stanica jedan od načina kojim možemo prevladati navedene prepreke u istraživanju. Otkriće iPSC-a je jedno od važnijih postignuća koje je omogućilo izbjegavanje etičkih dilema. Osim iPSC-a, bilo je potrebno istražiti i druge izvore, poput stanica iz tkiva pupkovine, masnog tkiva, koštane srži te iz oralne sluznice, čime se bavi ova disertacija. Ovi izvori nude mnoge prednosti jer su lakše dostupni, manje etički sporni i imaju potencijal za regeneraciju tkiva, a samim time i za liječenje određenih bolesti.

Ono što je važno kod novih izvora matičnih stanica je precizna selekcija staničnog izvora, njihova karakterizacija te standardizacija i definiranje kriterija koji određuju njihovu matičnost. Pretpostavka da hOMSC potječu od neuralnog grebena je bila važna za odabir ovih stanica za istraživanje zbog potencijalne primjene u neuroregeneraciji. Istraživanje je započelo biopsijom oralne sluznice. Bilo je vrlo važno uspostaviti i standardizirati protokol izolacije jer je neophodan za daljnju primjenu stanica u pretkliničkim i kliničkim istraživanjima kako bi se osigurala kontrola kvalitete i da matične stanice budu uvijek korisne i učinkovite. To je učinjeno ispitivanjem najbolje kombinacije enzima za odvajanje lamine proprie od epitela gdje smo došli do zaključka da smjesa enzima kolagenaze i dispaze pri temperaturi od 37 djeluje najbolje. Kolagenaza je enzim koji se često koristi za izolaciju stanica iz vezivom bogatih tkiva, kao što su koža, jetra, hrskavica,

razgrađujući glavnu komponentu izvanstaničnog matriksa – kolagen (135). Koliko je važna optimizacija enzima potvrđuje i istraživanje Yonenage i sur. (2017) koji su isto tako tražili najbolju koncentraciju kolagenaze za izolaciju hondrocita iz hrskavice (136). Usporedbom literaturnih nalaza zaključili smo da kolagenaza omogućuje izolaciju stanica bez oštećivanja njihove stanične membrane, ali previsoka koncentracija može dovesti do prekomjerne razgradnje i oštećenja stanica. Dispaza je blagi proteolitički enzim koji razgrađuje izvanstanične proteine, poput fibronektina i kolagena manje agresivno u odnosu na kolagenazu. Najčešće se koristi za izolaciju epitelnih stanica i embrionalnih stanica gdje je važno sačuvati veze između stanica, ali zbog toga je sporija u usporedbi s drugim enzimima i nije tako učinkovita (137). U jednom od istraživanja ispitao se utjecaj dispaze na djelovanje amniotičke membrane koja se koristi za rekonstrukciju očne površine kod nedostatka limbalnih matičnih stanica ili oštećenja rožnice stoga je jako važno da odvajanjem, membrana ne bude oštećena. Dokazano je da dispaza minimalno utječe na samu strukturu membrane ukoliko je vrijeme izlaganja kontrolirano (138). Stoga se izabralo koristiti kombinaciju kolagenaze i dispaze koja se pokazala vrlo učinkovitom jer je dovela do brze, ali blage disocijacije tkiva i omogućila je oslobađanje stanica uz njihovo minimalno oštećenje. Nadalje, ovaj pristup nam je omogućio dobivanje homogene populacije hOMSC-a. Kako bismo odlijepili stanice od podloge, testirali smo različite koncentracije tripsina. Tripsin razgrađuje proteine koje stanice izlučuju kako bi ih držali vezane za podlogu posude u kulturi. Djeluje brzo i učinkovito, ali zahtjeva preciznu kontrolu i upotrebu kako bi se izbjegla oštećenja stanica (139). Tako se najboljim pokazao 0,25% tripsin za odljepljivanje hOMSC-a od podloge i njihovo daljnje uzgajanje u kulturi. Ovime je navedeno istraživanje ostvarilo jedan od glavnih ciljeva što je uspostava učinkovitog i ne prezahtjevnog protokola za izolaciju hOMSC.

6.2. Karakterizacija matičnih stanica

Nakon uspješno uspostavljenog protokola izolacije, sljedeći važni korak je bila karakterizacija matičnih stanica kako bi se bolje opisala njihova biološka svojstva i potencijal koje je potrebno temeljito proučiti prije njihove kliničke upotrebe (140).

Koristeći metode ICC i RT-PCR, ustanovili smo da su hOMSC pozitivne na nestin koji je dobro definiran marker matičnih stanica koje sudjeluju u razvoju živčanog tkiva. Osobito je važan kod razvoja neurona i regeneracije tkiva, zbog čega se još koristi kao marker za identifikaciju ŽMS-a i stanica neuralnog grebena (141). Njegova visoka ekspresija tijekom embrionalnog razvoja omogućuje proliferaciju i migraciju neuralnih prekursora, a smanjuje se diferencijacijom ŽMS u neurone, astrocite i oligodendrocite (142). U odraslom tkivu se javlja kod stanica koje sudjeluju u procesima regeneracije, osobito nakon ozljeda. Tako primjerice nestin pozitivne stanice doprinose regeneraciji nakon ozljede leđne moždine, pomažu u procesu angiogeneze nakon ishemične ozljede (143,144). Isto tako održavaju nišu matičnih stanica kod koštane srži i služe kao biomarkeri za detekciju matičnih stanica u gušterači (145,146). Sve navedeno, čini nestin važnim markerom za istraživanje potencijala matičnih stanica u regeneraciji tkiva, ali i za identifikaciju različitih vrsta matičnih stanica.

Jedan od transkripcijskih biljega čija je prisutnost isto potvrđena u hOMSC-ima je *OCT4* koji sudjeluje u održavanju pluripotentnosti stanica. Ekspirira se u ranim embrionalnim fazama, a važan je za održavanje ESC-a te se koristi kod reprogramiranja diferenciranih stanica u iPSC (147). Njegova smanjena ekspresija indikacija je da stanice počinju gubiti pluripotentnost što dovodi do induciranja diferencijacije ESC-a prema trofoblastu ili primitivnom endodermu i mezodermu (148).

Ono što je dodatno potvrdilo matičnost hOMSC-a je prisustvo *SOX2* biljega koji zajedno s *OCT4* kontrolira pluripotentnost i djeluje na formiranje ranih embrionalnih stanica (149). *SOX2* potiče ESC na diferencijaciju prema

neuroektodermu, a značajna ekspresija je zabilježena kod neuralnih progenitorskih stanica *in vivo* i *in vitro* gdje njegova slaba izraženost označava diferencijaciju prema post mitotičkim neuronima i glijalnim stanicama (150).

Idući biljeg koji je bitan u definiraju populacije hOMSC-a je CD166. CD166 ukazuje na regenerativne sposobnosti samih stanica i na njihovo preživljavanje u mikrokruženju. Pripada obitelji imunoglobulina, a poznat je još pod nazivom ALCAM (engl. activated leukocyte cell adhesion molecule). Ekspirira se kod matičnih i progenitorskih stanica sva tri zametna listića (151). Glikoprotein CD90 (Thy-1) se često koristi za izolaciju ASC-a gdje kontrolira diferencijaciju (152).

Slično kao CD166, hOMSC su pozitivne i na CD73. Smatra se da ima imunomodulatornu ulogu što je potvrđeno eksperimentom gdje su kod miševa s infarktom srca bile transplantirane stanice koje imaju veliku i nisku ekspresiju CD73. Stanice s većom ekspresijom potaknule su anitupalnu reakciju te funkcionalni oporavak srca (153). Njegova aktivacija može imati zaštitni učinak na stanice pod hipoksijskim oštećenjem te s kod hOMSC može gledati u kontekstu regeneracije.

Potvrda da hOMSC gotovo uopće ne izražavaju marker fibroblasta CD40 je dodatno potvrdila karakterizaciju ovih stanica kao matičnih. Matične stanice i fibroblasti su dvije populacije stanica koje imaju različite uloge u regenerativnoj medicini, svaka sa specifičnim funkcijama i potencijalnim terapijskim primjenama. Fibroblasti su specijalizirane stanice koje primarno sudjeluju u sintezi i održavanju izvanstaničnog matriksa. Proizvode kolagena i druge proteine koji čine osnovnu strukturu tkiva te sudjeluju zacjeljivanju rana (154). Morfološki, fibroblasti se odlikuju vretenastim ili zvjezdastim oblikom, s ovalnom jezgrom i razvijenim endoplazmatskim retikulumom, što ukazuje na sličnu morfologiju s hOMSC stanicama (155). Iako su fibroblasti izolirani iz različitih tkiva, uključujući kožu, masno tkivo, srčano tkivo i mišiće, njihova specifična definicija ostaje nejasna. Tradicionalno su smatrani terminalno diferenciranim stanicama, ali se sada zna da imaju potencijal za diferencijaciju u osteogene, hondrogene i

adipogene stanice (156). Ova fleksibilnost u diferencijaciji dodatno komplicira njihovu klasifikaciju i razlikovanje od matičnih stanica. Prema međunarodnim smjernicama donesenim od strane Internacionalnog društva za staničnu terapiju (ISCT, engl. *The International Society for Cellular Therapy*) 2006. godine, matične stanice moraju zadovoljiti određene kriterije za klasifikaciju. Ovi kriteriji uključuju adherentnost stanica, izražavanje specifičnih površinskih markera: CD90, CD73 i CD105 te negativnost za druge markere poput CD40, CD45, CD34 i CD14 kao i sposobnost diferencijacije *in vitro* (157). Ovi kriteriji uspješno su zadovoljeni kod oralnih matičnih stanica. Jedan od značajnih izazova u karakterizaciji fibroblasta i matičnih stanica je nespecifičnost markera koji se koriste za njihovo razlikovanje. Prema istraživanju Halfona i suradnika (2011.), marker CD166 se pokazao kao specifičan isključivo za MSC kojeg također izražavaju i hOMSC što ih dodatno karakterizira kao matične stanice (158). Iako se obje populacije stanica (fibroblasti i MSC) razlikuju u svojim funkcijama i kapacitetima, složenost njihove karakterizacije i preklapanja u ekspresiji markera predstavljaju izazov koji zahtijeva daljnja istraživanja. Razvoj specifičnih markera i kriterija za njihovu klasifikaciju mogao bi značajno unaprijediti sposobnost da pravilno identificiramo i iskoristimo ove stanice u terapijskim kontekstima.

U zaključku možemo reći kako smo definirali populaciju hOMSC-a kao onu koja osim morfoloških osobina prepoznatih tijekom uzgoja izražava sljedeće biljege: *NESTIN*, *OCT4*, *SOX2*, *SLUG2*, CD166, CD90 i CD73.

6.3. Diferencijacija matičnih stanica oralne sluznice (hOMSC) u sferne nakupine s neuralnim obilježjima

Neurosfera su trodimenzionalne stanične strukture koje nastaju kada se progenitorske stanice ili ŽMS uzgoje u posebnim *in vitro* uvjetima bez goveđeg seruma (FBS) koji sadrži faktore rasta kao što su EGF i FGF. Ovi faktori potiču proliferaciju i omogućuju stanicama da ostanu u nediferenciranom stanju gdje se onda spontano počinju stvarati kuglaste strukture stanica (159).

Kako želimo predložiti hOMSC kao dobar potencijalni kandidat za terapijske primjene u neurodegenerativnim bolestima, bilo je važno istražiti njihov potencijal za diferencijaciju prema živčanom tkivu. Posebice jer proizlaze iz neuralnog grebena. Stoga su hOMSC držane u Neurobasalnom mediju specifično formuliranom za poticanje diferencijacije stanica prema živčanom tkivu uz dodatak N2 i B27. Riječ je o suplementima koji se često koriste u kulturi ŽMS-a kako bi se potaknulo njihovo preživljavanje, proliferacija i diferencijacija (160). Zajedno, oni stvaraju optimalne uvjete za formiranje neurosfera. Dobiveni rezultati pokazuju nekoliko važnih aspekata diferencijacije ovih stanica, uključujući stvaranje specifičnih sfernih nakupina, što sugerira prisutnost neurogenog potencijala kod hOMSC. Kod hOMSC koristili smo medij bez faktora FGF i EGF jer same hOMSC već imaju prirodnu sposobnost stvaranja sferoidnih struktura što je karakteristično za mnoge populacije matičnih stanica. Za razliku od ŽMS koje ovise o EGF i FGF za proliferaciju i održavanje, hOMSC imaju svojstva MSC-a, a njihova diferencijacija i proliferacija slijede drugačije signalne puteve (161). Također ne dodavanje faktora rasta omogućuje spontano formiranje sfera i izbjegavanje pretjerane proliferacije. Isto tako, FGF i EGF bi mogli pristrano potaknuti proliferaciju i diferencijaciju hOMSC-a prema živčanom tkivu.

Tijekom prvog tjedna eksperimenta nisu bile uočene nikakve značajne morfološke promjene kod stanica, osim povećanja njihovog broja. Ovaj početni period može se objasniti potrebom stanica da se prilagode novom mediju i proliferiraju prije nego što započnu proces diferencijacije. Umnažanje bez

diferencijacije često se opaža kod matičnih stanica kada su izložene stimulirajućim uvjetima jer stanice prolaze kroz niz promjena koje pripremaju njihov fenotip za specifičnu diferencijaciju. Također, ovaj period bez diferencijacije mogao bi biti ključan za uspostavljanje stabilne stanične kulture prije aktivacije diferencijacijskih puteva (162).

Nakon 10 dana u kulturi, stanice su počele formirati male zrakaste nakupine, koje su i dalje bile pričvršćene za podlogu. Ovaj fenomen formiranja radijalnih izdanaka može se smatrati prvim znakom diferencijacije, budući da mnoge matične stanice, osobito one s neurogenim potencijalom, formiraju takve strukture prije nego što uđu u kasnije faze diferencijacije (163). Stvaranje zrakastih struktura koje smo uočili nakon 10 dana sugerira usmjerenje hOMSC-a u smjeru neuralnih progenitorskih stanica, koje su poznate po svojoj sposobnosti organiziranja u nakupine tijekom razvoja živčanog tkiva. Važno je napomenuti da se stanice u ovoj fazi i dalje ponašaju kao adherentne, što znači da su još uvijek pričvršćene za podlogu. Ova adhezija može biti indikator da stanice nisu u potpunosti prešle u mobilniji fenotip, ali su u ranoj fazi transformacije. Najznačajnija promjena u diferencijaciji uočena je 15. dan, kada su stanice formirale sferne nakupine koje su se odvojile od podloge i slobodno plutale u mediju. Ovaj proces stvaranja sfernih struktura poznat je u istraživanju živčanih stanica. Iako se smatralo da je to obilježje ŽMS-a, potvrđeno je kako matične stanice imaju sposobnost stvaranja sfernih nakupina i da do toga vrlo vjerojatno dolazi jer su izložene uvjetima kulture koji kao kod ŽMS-a promiču neurogeni lozu (164). Stoga smatramo da je to isto jedno od obilježja i karakteristika matičnih stanica u ovom slučaju hOMSC-a. Isto tako, sfere će se razlikovati, ovisno potječu li od pluripotentnih ili multipotentnih matičnih stanica, ali formacija sfera je u oba slučaja funkcionalno skoro ista (165). Sferne nakupine stoga možemo koristiti kao biljeg za potvrdu neurogenog potencijala stanica jer one predstavljaju skupine nediferenciranih stanica koje imaju sposobnost diferencijacije u različite tipove živčanih stanica.

Odvajanje sfernih nakupina od podloge dodatno potvrđuje njihovu promjenu u fenotipu te ukazuje na povećanu mobilnost što može biti znak rane faze

neurogeneze, gdje stanice postaju sposobne za migraciju i diferencijaciju u specifične neuronske ili glijalne tipove (166).

Rezultati pokazuju da su sfere iako su inicijalno uspješno formirane, pokazale nisku stopu adherencije nakon procesa razbijanja. Ovaj nalaz može ukazivati na nekoliko potencijalnih problema koji se mogu javiti tijekom manipulacije matičnim stanicama. Prvo, mogući uzrok niske stopa adherencije mogao bi biti neprikladna primjena akutaze. Iako je akutaza korištena za razbijanje sfernih nakupina, postoje mogućnosti da je enzimska aktivnost nije bila optimalna za sve sferne komponente, što može rezultirati nedovoljnim razdvajanjem stanica unutar sfera (167). Također, ukoliko su sferne nakupine bile previše čvrste ili kompaktne, moglo bi biti teško omogućiti jednolično razbijanje, što bi dodatno otežalo kasniju adherenciju. Isto tako možda bi korištenje 0,25% tripsina bilo učinkovitije. Drugo, korištenje poli-D lizina za premazivanje stakalaca je uobičajena praksa koja poboljšava adherenciju stanica, ali može postojati potreba za dodatnim optimizacijama uvjeta rasta ili promjenom koncentracije poli-D lizina kako bi se osigurala bolja adherencija stanica. Različite koncentracije i uvjeti korištenja ovog premaznog materijala mogli bi utjecati na sposobnost stanica da se prilagode i adheriraju na podlogu (168). Nadalje, niska uspješnost adherencije može implicirati da hOMSC možda zahtijevaju specifične uvjete za rast i diferencijaciju koji se razlikuju od onih koji su korišteni tijekom razbijanja i pasažiranja.

Rezultati ovog istraživanja sugeriraju da hOMSC imaju značajan potencijal za diferencijaciju prema živčanom tkivu, što je u skladu s hipotezom da ove stanice potječu iz neuralnog grebena. Neurobasalni medij, u kombinaciji s dodacima N2 i B27, stvorio je optimalne uvjete za pokretanje diferencijacije, čime je potaknuo formiranje sfernih struktura karakterističnih za matične stanice s neurogenim potencijalom. Stvaranje sfernih nakupina i njihovo odvajanje od podloge važan su pokazatelj da hOMSC mogu proći kroz rane faze neurogeneze u odgovarajućim uvjetima. Ovi nalazi imaju važnu implikaciju za potencijalnu primjenu hOMSC-a u neuroregenerativnim terapijama, gdje bi se ove stanice mogle koristiti za obnavljanje oštećenih neuronskih mreža. Razvoj neurona iz

hOMSC može biti osobito koristan za liječenje neurodegenerativnih bolesti ili ozljeda središnjeg živčanog sustava, gdje je potrebna zamjena oštećenih ili izgubljenih stanica.

Jedno od ograničenja ovog istraživanja je činjenica da nije provedena analiza izražaja specifičnih neuralnih biljega, što bi moglo pružiti dodatnu potvrdu o stupnju diferencijacije hOMSC prema neuralnim stanicama. Buduća istraživanja trebala bi uključivati detaljnu molekularnu analizu, poput izražaja *NESTINA*, TUJ1 ili GFAP-a koji su biljezi za neuralne progenitorske stanice, neurone i astrocite kako bi se dodatno potvrdio neurogeni potencijal hOMSC-a (169). Također, potrebno je proučiti funkcionalna svojstva diferenciranih stanica, uključujući njihovu sposobnost stvaranja sinaptičkih veza i provođenja signala, kako bi se procijenila njihova primjena u regenerativnim medicinskim terapijama. To bi moglo pružiti dublji uvid u mogućnosti korištenja hOMSC-a za specifične terapijske namjene, kao što je liječenje neurodegenerativnih bolesti. Ovo istraživanje ukazuje na potencijal hOMSC za diferencijaciju prema živčanom tkivu u specifičnim uvjetima. Formiranje sfernih nakupina nakon 15 dana sugerira da ove stanice mogu ući u ranu fazu neurogeneze kada su izložene optimalnim uvjetima, čime se otvaraju mogućnosti za njihovu primjenu u neuroregenerativnim terapijama. Daljnja istraživanja usmjerena na molekularnu karakterizaciju i funkcionalnu analizu diferenciranih stanica potrebna su kako bi se dodatno razumio njihov puni terapijski potencijal.

6.4. Usporedba preživljavanja hOMSC i iPSC u anoksičnim uvjetima

Iako hipoksija oštećuje živčano tkivo, postoje radovi koji sugeriraju kako hipoksični uvjeti mogu doprinijeti diferencijaciji stanica živčanog tkiva (170). Stoga smo pretpostavili kako blaga hipoksija pogoduje hOMSC-ima te da vjerojatno iskazuju i veću otpornost na nedostatak kisika. Uspoređivanjem stanica hOMSC-a s iPSC-ima željeli smo utvrditi postavljenu hipotezu. Rezultati istraživanja su potvrdili kako su hOMSC puno robusnije u odnosu na iPSC. Pokus smo izveli tako da su obje stanične populacije bile držane u anoksičnim uvjetima, gdje je razina kisika bila 0%. Takvi uvjeti često nastaju u tkivima koja su pretrpjela ishemijske ozljede, poput onih uzrokovanih moždanim udarom, srčanim udarom ili teškim ozljedama. Preživljavanje stanica u anoksiji ovisi o njihovoj sposobnosti prilagodbe putem promjena u metabolizmu i aktivaciji zaštitnih mehanizama.

U ovom istraživanju, rezultati jasno ukazuju na to da hOMSC pokazuju bolju prilagodljivost u usporedbi s iPSC, posebice pri dužoj izloženosti. Nakon 6 sati anoksije, obje stanične populacije nisu pokazale značajan gubitak preživljenja, što sugerira da kratkotrajna anoksija nije dovoljna da inducira ozbiljnu staničnu smrt. Ovaj rezultat je očekivan, jer stanice mogu koristiti različite mehanizme, poput anaerobnog metabolizma kako bi osigurale preživljavanje tijekom kratkih razdoblja bez kisika. Međutim, nakon 12 sati, razlike između dvije stanične populacije postaju očite. Oko 50% hOMSC-a je preživjelo dok je manje od 20% iPSC stanica ostalo održivo. Ova razlika u preživljenju može se pripisati inherentnim razlikama u njihovom staničnom metabolizmu i otpornosti na stres. hOMSC, koje su somatske matične stanice, možda posjeduju bolji kapacitet za preživljavanje u uvjetima metaboličkog stresa, dok iPSC, unatoč svojoj pluripotentnosti, možda nemaju istu razinu otpornosti, jer su ponovno programirane iz diferenciranih stanica. Nakon 24 sata anoksije, preživljenje stanica postaje kritično gdje su hOMSC pokazale iznimnu otpornost s preživljenjem od 20% dok iPSC stanice nisu preživjele. To nam ukazuje da iPSC imaju značajno ograničenu sposobnost prilagodbe na anoksične uvjete, vjerojatno zbog nedostatka specifičnih zaštitnih mehanizama ili sposobnosti

održavanja energetske potrebe bez kisika. S druge strane, hOMSC su mogle aktivirati mehanizme koji im omogućuju produljeno preživljavanje, poput promjene u metabolizmu ili ekspresiji proteina stresa.

Otpornost hOMSC na anoksiju može se objasniti prisutnošću nekoliko mogućih mehanizama. Anaerobna glikoliza je jedan od procesa koji može omogućiti hOMSC da učinkovitije prijeđu na anaerobni način proizvodnje energije, koristeći glikolizu kako bi generirale ATP bez prisutnosti kisika (171). Također stanice pod stresom mogu koristiti autofagiju. Riječ je o procesu u kojem one razgrađuju vlastite komponente kako bi imale dovoljno energije i spriječile samim time staničnu smrt. Nedavno je i naša istraživačka grupa objavila rezultate istraživanja u kojem smo pokazali kako stanice na različitim stupnjevima razvoja selektivno aktiviraju autofagiju i mitofagiju (172). Ukoliko su hOMSC aktivirale protektivne mehanizme autofagije i mitofagije, to bi im moglo omogućiti njihovo dulje preživljavanje u anoksičnim uvjetima. Isto tako hOMSC bi mogle izražavati antiapoptotski protein kao što je Bcl-2 koji inhibira apoptozu, programiranu staničnu smrt (173). Stanice koje preživljavaju u niskim razinama kisika često pokazuju povećan izražaj proteina koje nazivamo hipoksijom inducirani faktori (HIF). Oni reguliraju niz gena koji pomažu stanicama da se prilagode na nedostatak kisika, poput onih koji sudjeluju u angiogenezi, metabolizmu i preživljavanju stanica. Jedan od poznatijih faktora je HIF-1 α koji potiče izražaj gena koji su ključni za preživljavanje stanica i prilagodbu metabolizma na stresne uvjete (174). Svi navedeni mehanizmi predstavljaju samo jednu od mogućnosti kojom su hOMSC mogle preživjeti anoksične uvjete bolje u odnosu na iPSC.

Jedno od ograničenja ovog istraživanja je relativno kratko vremensko razdoblje praćenja stanica nakon anoksijskog oštećenja. Svakako bi bilo korisno analizirati učinak anoksije na stanice kroz duže vremenske periode ili u različitim fazama anoksije. Također, budući da je istraživanje provedeno u kontroliranim laboratorijskim uvjetima *in vitro*, rezultati možda neće biti izravno primjenjivi na složene uvjete u *in vivo* organizmu. Stoga bi bilo korisno proučiti molekularne

mehanizme odgovorne za otpornost hOMSC-a na anoksiju, što bi moglo otvoriti nove mogućnosti za terapijsku primjenu ovih stanica.

Neovisno o navedenom, naši rezultati sugeriraju da bi hOMSC mogle biti pogodnije za primjene u uvjetima gdje stanice trebaju izdržati ekstremne metaboličke stresove, dok su iPSC, iako izuzetno fleksibilne i korisne za terapije zbog svoje pluripotentnosti, osjetljivije na uvjete poput anoksije. Daljnja istraživanja trebala bi se usmjeriti na bolju karakterizaciju ovih razlika i mehanizme zaštite hOMSC.

6.5. Učinci matičnih stanica oralne sluznice (hOMSC) i njihovog kondicioniranog medija na preživljenje hipoksijski oštećenih neurona *in vitro*

Jedan od glavnih ciljeva ove disertacije bio je istražiti regenerativni potencijal hOMSC-a u oporavku neurona oštećenih hipoksijom *in vitro*. Dizajn ovog pokusa temeljio se na deprivaciji kisika i glukoze te izlaganju stanica 1% kisika (hipoksija) kako bi smo dobili uvjete koji oponašaju ishemijsko oštećenje moždanog tkiva. OGD model koristi se za istraživanje patofizioloških mehanizama moždanog udara, traumatske ozljede mozga i neurodegenerativnih bolesti. Model je vrlo pogodan za testiranje učinaka različitih terapijskih strategija, uključujući upotrebu matičnih stanica i njihovih derivata jer omogućuje kontrolirane uvjete u kojima se mogu analizirati mehanizmi stanične smrti, preživljenja i regeneracija. Sam OGD model omogućuje procjenu različitih bioloških parametara tijekom i nakon ishemijskog oštećenja (175). U okviru ovog istraživanja koristili smo ovaj model kako bi ispitali regenerativni potencijal hOMSC-a i njihovog kondicioniranog medija. Nakon 24 h hipoksije, neuroni su bili tretirani na tri načina: medijem za rast neurona (kontrolna skupina), kondicioniranim medijem hOMSC-a i izravnim dodavanjem samih hOMSC stanica. Proces reoksigenacije trajao je 24 h nakon čega su bili analizirani učinci na preživljenje neurona. Reoksigenacija je bila ključna komponenta pokusa, jer je omogućavala procjenu oporavka neurona različitim tretmanima.

Osim direktnog utjecaja stanica, odlučili smo testirati i kondicionirani medij jer ga smatramo važnim za poticanje regenerativnih procesa i povećavanja preživljenja oštećenih neurona bez potrebe za izravnim kontaktom s hOMSC-ima. Same stanice u kondicioniranom mediju izlučuju razne bioaktivne molekule poput faktora rasta, citokina i ekstracelularnih vezikula koje sudjeluju u neuroprotekciji, regeneraciji i regulaciji upalnih procesa (176). Jedan dio našeg istraživačkog tima već je dokazao kako egzosomi izolirani iz ŽMS-a imaju blagotvoran učinak na stanice oštećene ishemijsko reperfuzijskom ozljedom, smanjujući razinu superoksidinih aniona i samim time staničnu smrt (177). Kondicionirani medij je imao blag učinak na neurone u odnosu na hOMSC stanice koje su pokazale

znatno pozitivniji utjecaj. Uspoređujući učinak izravnog dodavanja hOMSC-a i kondicioniranog medija donio je važna saznanja o mogućim mehanizmima putem kojih hOMSC doprinose regeneraciji. Činjenica da je kondicionirani medij bio slabo uspješan u poticanju oporavka u odnosu na same stanice može se pripisati slabo zastupljenoj koncentraciji različitih neurotrofnih čimbenika i drugih signalnih molekula koje mogu potaknuti preživljenje i oporavak neurona. Do sada su istraživanja bila usmjerena isključivo na učinak samih matičnih stanica na oštećena tkiva. Iako su pokazale dobar potencijal i dalje se suočavamo s poteškoćama u staničnoj terapiji koja treba zadovoljavati određene kriterije poput stabilne pasaže stanica, uvjeta u staničnoj kulturi i najvažniji problem kod transplantacije samih stanica. Kondicionirani medij nudi izvrsnu alternativu za transplantaciju matičnih stanica. Neka istraživanja pokazala su budući potencijal kondicioniranog medija, poput medija MSC-a koji je poboljšao oporavak mukoze crijeva kod eksperimentalnog kolitisa ili poboljšao oporavak kod kožnih bolesti poput psorijaze, atopičnog dermatitisa ili obnove dlačnih folikula kose (178,179). Njegova primjena istražuje se i kod neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove gdje potencijalno utječe na inhibiciju upalnih procesa i prevenciju apoptoze (180).

Tretman izravnim dodavanjem hOMSC-a rezultirao je značajnim poboljšanjem što opet ukazuje na mogućnost da hOMSC ne djeluju samo parakrino već i kroz izravan kontakt na neurone. U modelu štakora s ozljedom leđne moždine, jedna skupina istraživača je transplantirala stanice oralne sluznice koje su smanjile apoptozu (111). Isto tako u radu gdje su transplantirane epitelne stanice oralne sluznice, potaknule su regeneraciju oštećenog epitela rožnice kod deficita matičnih stanica limbusa oka (110). Interakcija između hOMSC i oštećenog tkiva može uključivati stanične adhezijske molekule koje pružaju fizičku potporu ili je riječ o celularnom prijenosu signalnih molekula putem izvanstaničnih vezikula - egzosoma. Isto tako hOMSC mogu ispoljiti imunomodulatorni učinak i tako smanjiti upalni proces koji je prisutan nakon hipoksije.

Najveći problem s kojim smo se susreli tijekom eksperimenta bio je taj što su se neuroni nakon izlaganja hipoksiji odlijepili od podloge zbog visokog stupnja stanične smrti. Nakon 24 sata izloženosti hipoksiji, stanice su formirale plutajuće nakupine staničnog smeća što je značajno smanjilo broj živih neurona dostupnih za daljnju analizu nakon reoksigenacije. Ovaj problem otežao je pouzdanu procjenu učinaka hOMSC-a i njihovog kondicioniranog medija na preživljenje i oporavak hipoksijski oštećenih neurona. Razlog za ovakvo ponašanje neurona nakon izlaganja hipoksiji može se objasniti ozbiljnim oštećenjem stanične membrane koje je dovelo do stanične smrti i odvajanja neurona od podloge. Hipoksija izaziva nedostatak kisika i glukoze koji rezultira metaboličkim stresom i nakupljanjem reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) u stanicama što na kraju oštećuje vitalne stanične funkcije (181). Oštećenje staničnih membrana uzrokuje da neuroni postanu nestabilni i odvoje se od podloge čime se smanjuje njihova sposobnost preživljavanja i dodatno otežava njihova regeneracija nakon reoksigenacije. Neka od mogućih rješenja ovog problema bila bi postepena reoksigenacija, gdje umjesto naglog vraćanja neurona u normoksične uvjete nakon hipoksije imamo postepeno povećavanje koncentracije kisika što može smanjiti oksidativni stres i olakšati stanicama prilagodbu na promjenu. Također dodavanje neuroprotektivnih faktora kao što su BDNF ili NGF u medij može pomoći neuronima da prežive hipoksične uvjete i smanji staničnu smrt ili upotreba antioksidanasa poput N-acetilcisteina i glutaciona koji mogu pomoći u smanjenju nakupljanja ROS-a (182,183,184,185). Ove promjene mogle bi povećati preživljenje neurona nakon hipoksije i omogućiti bolju procjenu učinaka hOMSC-a i njihovog kondicioniranog medija na oštećene neurone.

7. ZAKLJUČAK

1. Ovo istraživanje je dovelo do standardizacije protokola za izolaciju stanica iz bioptata oralne sluznice koji uključuju primjenu mehaničkih postupaka i smjese enzima kolagenaze i dispaze u vremenski precizno definiranim fazama
2. Matične stanice oralne sluznice (hOMSC) definirane su kao populacija koja izražava biljege matičnosti: *OCT4* i *SOX2*, biljege neuralnog grebena: *SLUG* i *NESTIN* te biljege mezenhimalnih matičnih stanica: *CD166*, *CD90* i *CD73*. Istovremeno, stanice su negativne na biljeg fibroblasta *CD40*.
3. Matične stanice oralne sluznice izlučuju tri važna faktora rasta koja sudjeluju u obnovi tkiva; *BDNF*, *VEGF* i *NGF*.
4. Matične stanice oralne sluznice (hOMSC) pokazale su diferencijacijski potencijal stvarajući sferne nakupine karakteristične za matične stanice s neurogenim potencijalom.
5. Duljina izlaganja matičnih stanica oralne sluznice (hOMSC) kulturi neurona smanjuje njihovu gensku ekspresiju biljega matičnosti što sugerira da nakon duljeg izlaganja živčanom tkivu hOMSC polako gube pluripotentnost.
6. U uvjetima anoksije, matične stanice oralne sluznice (hOMSC) pokazale su veću rezistentnost na nedostatak kisika u odnosu na inducirane pluripotentne matične stanice (iPSC).
7. Matične stanice oralne sluznice (hOMSC) i njihov kondicionirani medij, pospješuju preživljenje hipoksijski oštećenih neurona *in vitro*.

8. SAŽETAK

Regenerativna medicina je moderna disciplina koja jedan dio svojih uspjeha temelji na terapijskom učinku matičnih stanica i molekula koje one izlučuju. Ipak, mnoge vrste matičnih stanica se teško dobivaju ili je njihova primjena povezana s etičkim nedoumicama, pa je pronalaženje lako dostupnih izvora stanica važno za daljnji napredak. Ovo istraživanje je opisalo novu populaciju matičnih stanica, dobivenu biopsijom oralne sluznice, nazvanih ljudske matične stanice oralne sluznice (hOMSC). Nakon što smo usporedbom različitih protokola uspostavili postupak kojim dobivamo dovoljnu količinu homogenih stanica koje su diferencijacijom oblikovale strukture tipične za nezrele ektodermalne stanice, testiranjem različitih biljega smo ovu populaciju definirali kao značajno pozitivnu na nestin i CD166, uz mjerljivu prisutnost *OCT4*, *SOX2*, *CD90*, *CD40* i *SNAIL2*. Testiranje njihove otpornosti na anoksiju je otkrilo kako oralne matične stanice bolje preživljavaju u odnosu na iPSC. Također, hOMSC izlučuju regenerativne molekule BDNF, VEGF i NGF što je ovisilo o duljini kontakta s neuronima. Isto tako je pokazano kako oralne matične stanice povećavaju preživljenje ljudskih neurona oštećenih manjkom kisika. Sve navedeno ukazuje kako je ovo istraživanje uspostavilo protokol dobivanja stanične populacije iz razmjerno lako dostupnog izvora koja ima značajan potencijal u liječenju ishemijski oštećenog živčanog tkiva.

9. SUMMARY

Regenerative effect of oral mucosa stem cells on hypoxia damaged neurons *in vitro*

Paula Stančin

Zagreb, 2025.

Regenerative medicine is a contemporary discipline that relies part of its success on the therapeutic effects of stem cells and the molecules they secrete. However, many types of stem cells are difficult to obtain or are associated with ethical concerns, making the identification of easily accessible cell sources crucial for further advancement. This study describes a novel population of stem cells, obtained through oral mucosa biopsy, referred to as human oral mucosa stem cells (hOMSC). By comparing different protocols, we established a method to obtain enough of homogeneous cells that differentiate into structures typical of immature ectodermal cells. Through marker analysis, this population was characterized as significantly positive for nestin and CD166 with a measurable expression of *OCT4*, *SOX2*, CD90, CD40, and *SNAIL2*. Testing their resistance to anoxia revealed that oral stem cells exhibit substantial resilience under extreme conditions compared to iPSC. Additionally, hOMSC secretes essential regenerative molecules: BDNF, VEGF, and NGF. The duration of contact with neurons modulates the secretion levels of these molecules. It was also demonstrated that oral stem cells enhance the survival of human neurons subjected to hypoxic damage. These findings indicate that this study has established a protocol for deriving a cell population from an easily accessible source with significant potential for treating ischemic neural tissue damage.

10. LITERATURA

1. Poliwoda S, Noor N, Downs E, Schaaf A, Cantwell A, Ganti L i sur. Stem cells: a comprehensive review of origins and emerging clinical roles in medical practice. *Orthop Rev (Pavia)*. 2022;25;14(3):37498.
2. Kaminska A, Radoszkiewicz K, Rybkowska P, Wedzinska A, Sarnowska A. Interaction of Neural Stem Cells (NSCs) and Mesenchymal Stem Cells (MSCs) as a Promising Approach in Brain Study and Nerve Regeneration. *Cells*. 2022;26;11(9):1464.
3. Drela K, Siedlecka P, Sarnowska A, Domanska-Janik K. Human mesenchymal stem cells in the treatment of neurological diseases. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2013;73(1):38-56.
4. Marynka-Kalmani K, Treves S, Yafee M, Rachima H, Gafni Y, Cohen MA i sur. The lamina propria of adult human oral mucosa harbors a novel stem cell population. *Stem Cells*. 2010;28(5):984-95.
5. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*. 2012;85(1):3-10.
6. Smith, A. A glossary for stem-cell biology. *Nature*. 2006;411;1060.
7. Poliwoda S, Noor N, Downs E, Schaaf A, Cantwell A, Ganti L i sur. Stem cells: a comprehensive review of origins and emerging clinical roles in medical practice. *Orthop Rev (Pavia)*. 2022;25;14(3):37498.
8. Kandarakov O, Belyavsky A, Semenova E. Bone Marrow Niches of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Int. J. Mol. Sci*. 2022;23;4462.
9. Dulak J, Szade K, Szade A, Nowak W, Józkwicz A. Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim Pol*. 2015;62(3):329-37.
10. Dulak J, Szade K, Szade A, Nowak W, Józkwicz A. Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim Pol*. 2015;62(3):329-37.
11. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;9;292(5819):154-6.
12. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA i sur. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;15;92(17):7844-8.

13. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS. i sur. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;6;282(5391):1145-7.
14. Chen HF, Kuo HC, Chien CL, Shun CT, Yao YL, Ip PL i sur. Derivation, characterization and differentiation of human embryonic stem cells: comparing serum-containing versus serum-free media and evidence of germ cell differentiation. *Hum Reprod*. 2007;22(2):567-77.
15. Baharvand H, Ashtiani SK, Valojerdi MR, Shahverdi A, Tae A, Sabour D. Establishment and in vitro differentiation of a new embryonic stem cell line from human blastocyst. *Differentiation*. 2004;72(5):224-9.
16. Müller T, Fleischmann G, Eildermann K, Mätz-Rensing K, Horn PA, Sasaki E i sur. A novel embryonic stem cell line derived from the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) exhibiting germ cell-like characteristics. *Hum Reprod*. 2009;24(6):1359-72.
17. Vazin T, Freed WJ. Human embryonic stem cells: derivation, culture, and differentiation: a review. *Restor Neurol Neurosci*. 2010;28(4):589-603.
18. Dulak J, Szade K, Szade A, Nowak W, Józkwicz A. Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim Pol*. 2015;62(3):329-37.
19. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Cesaro S, Dreger P. i sur. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually. *Bone Marrow Transplant*. 2016;51(6):786-92.
20. Gratwohl A, Baldomero H, Passweg J. Hematopoietic stem cell transplantation activity in Europe. *Curr Opin Hematol*. 2013;20(6):485-93.
21. Lu F, Zhang Y. Cell totipotency: molecular features, induction, and maintenance. *Natl Sci Rev*. 2015;2(2):217-225.
22. Prentice, D. A. Adult Stem Cells. *Circulation Research*. 2019;124(6):837–839.
23. Hombach-Klonisch S, Panigrahi S, Rashedi I, Seifert A, Alberti E, Pocar P i sur. Adult stem cells and their trans-differentiation potential--perspectives and therapeutic applications. *J Mol Med (Berl)*. 2008;86(12):1301-14.
24. Barker N, Bartfeld S, Clevers H. Tissue-resident adult stem cell populations of rapidly self-renewing organs. *Cell Stem Cell*. 2010;3;7(6):656-70.
25. Boulais PE, Frenette PS. Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood*. 2015;23;125(17):2621-9.

26. Seshadri M, Qu CK. Microenvironmental regulation of hematopoietic stem cells and its implications in leukemogenesis. *Curr Opin Hematol.* 2016;23(4):339-45.
27. Lévesque JP, Winkler IG. Hierarchy of immature hematopoietic cells related to blood flow and niche. *Curr Opin Hematol.* 2011;18(4):220-5.
28. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* 2011;20(1):5-14.
29. Sharpe PT. Dental mesenchymal stem cells. *Development.* 2016;1;143(13):2273-80.
30. Galipeau J, Sensébé L. Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell.* 2018;1;22(6):824-833.
31. Chhabra A. Derivation of Human Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC) Lines and Mechanism of Pluripotency: Historical Perspective and Recent Advances. *Stem Cell Rev Rep.* 2017;13(6):757-773.
32. Takahashi, K., & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell.* 2006;126(4), 663–676.
33. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K i sur. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell.* 2007;131(5), 861–872.
34. Scudellari, M. How iPS cells changed the world. *Nature.* 2016;534:310–312.
35. Yamanaka S. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges. *Cell Stem Cell.* 2020;1;27(4):523-531.
36. Zaehres H, Schöler HR. Induction of Pluripotency: From Mouse to Human. *Cell.* 2007;131(5):834–835.
37. Corrò C, Novellademunt L, Li VSW. A brief history of organoids. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2020;1;319(1):C151-C165.
38. Chen B, Du C, Wang M, Guo J, Liu X. Organoids as preclinical models of human disease: progress and applications. *Med Rev.* 2024;14;4(2):129-153.
39. Velasco S, Kedaigle AJ, Simmons SK, Nash A, Rocha M, Quadrato G i sur. Individual brain organoids reproducibly form cell diversity of the human cerebral cortex. *Nature.* 2019;570(7762):523-527.
40. Prior N, Inacio P, Huch M. Liver organoids: from basic research to therapeutic applications. *Gut.* 2019 ;68(12):2228-2237.

41. Miyamoto M, Nam L, Kannan S, Kwon C. Heart organoids and tissue models for modeling development and disease. *Semin Cell Dev Biol.* 2021;118:119-128.
42. Famuyide A, Massoud TF, Moonis G. Oral Cavity and Salivary Glands Anatomy. *Neuroimaging Clin.* 2022;32;(4):777-790.
43. Squier C, Brogden KA. The Organization of Oral Mucosa. *Human Oral Mucosa.* 2013;9:17.
44. Mescher A. Junqueira Basic Histology Text and Atlas 14th Edition. McGraw-Hill Education. 2016.
45. Rothova M, Thompson H, Lickert H, Tucker AS. Lineage tracing of the endoderm during oral development. *Dev Dyn.* 2012;241(7):1183-91.
46. Winning TA, Townsend GC. Oral mucosal embryology and histology. *Clin Dermatol.* 2000;18(5):499-511.
47. Benitez BK, Brudnicki A, Nalabothu P, Jackowski JAV, Bruder E, Mueller AA. Histologic Aspect of the Curved Vomerine Mucosa in Cleft Lip and Palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 2022;59(8):1048-1055.
48. Robinson CM, Thomson P. Form and Function of the Oral Mucosa. *Oral Precancer.* 2013;13:30.
49. Jones KB, Klein OD. Oral epithelial stem cells in tissue maintenance and disease: the first steps in a long journey. *Int J Oral Sci.* 2013;5(3):121-9.
50. Davies LC, Locke M, Webb RDJ, Roberts JT, Langley M, Thomas DW i sur. A Multipotent Neural Crest-Derived Progenitor Cell Population Is Resident Within the Oral Mucosa Lamina Propria. *Stem Cells and Development.* 2010;19(6):819–830.
51. Gaffen SL, Moutsopoulos NM. Regulation of host-microbe interactions at oral mucosal barriers by type 17 immunity. *Sci Immunol.* 2020;3;5(43):4594.
52. Griffin MF, Fahy EJ, King M, Guardino N, Chen K, Abbas DB i sur. Understanding Scarring in the Oral Mucosa. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2022;11(10):537-547.
53. Iglesias-Bartolome R, Uchiyama A, Molinolo AA, Abusleme L, Brooks SR, Callejas-Valera JL i sur. Transcriptional signature primes human oral mucosa for rapid wound healing. *Sci Transl Med.* 2018;25;10(451):8798.
54. Şenel S. An Overview of Physical, Microbiological and Immune Barriers of Oral Mucosa. *Int J Mol Sci.* 2021;22;22(15):7821.

55. Dawson DV, Drake DR, Hill JR, Brogden KA, Fischer CL, Wertz PW. Organization, barrier function and antimicrobial lipids of the oral mucosa. *Int J Cosmet Sci.* 2013;35(3):220-3.
56. Madani M, Berardi T, Stoopler ET. Anatomic and examination considerations of the oral cavity. *Med Clin North Am.* 2014;98(6):1225-38.
57. Chen J, Ahmad R, Li W, Swain M, Li Q. Biomechanics of oral mucosa. *J R Soc Interface.* 2015;6;12(109):20150325.
58. Dave JR, Tomar GB. Dental Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: Applications in Tissue Engineering. *Crit Rev Biomed Eng.* 2018;46(5):429-468.
59. Marynka-Kalmani K, Treves S, Yafee M, Rachima H, Gafni Y, Cohen MA i sur. The lamina propria of adult human oral mucosa harbors a novel stem cell population. *Stem Cells.* 2010;28(5):984-95.
60. Li Y, Duan X, Chen Y, Liu B, Chen G. Dental stem cell-derived extracellular vesicles as promising therapeutic agents in the treatment of diseases. *Int J Oral Sci.* 2022;14:2.
61. Lopez-Letayf S, Arie I, Araidy S, Abu El-Naaj I, Pitaru S, Arzate H. Human oral mucosa-derived neural crest-like stem cells differentiate into functional osteoprogenitors that contribute to regeneration of critical size calvaria defects. *J Periodontal Res.* 2022;57(2):305-315.
62. Man RC, Yong TK, Hwei NM, Halim WHWA, Zahidin AZM, Ramli R i sur. Corneal regeneration by induced human buccal mucosa cultivated on an amniotic membrane following alkaline injury. *Mol Vis.* 2017;21;23:810-822.
63. Leavitt T, Hu MS, Marshall CD, Barnes LA, Lorenz HP, Longaker MT. Scarless wound healing: finding the right cells and signals. *Cell Tissue Res.* 2016;365(3):483-93.
64. Ganz J, Arie I, Buch S, Zur TB, Barhum Y, Pour S i sur. Dopaminergic-like neurons derived from oral mucosa stem cells by developmental cues improve symptoms in the hemi-parkinsonian rat model. *PLoS One.* 2014;19;9(6):e100445.
65. Ganz J, Arie I, Ben-Zur T, Dadon-Nachum M, Pour S, Araidy S i sur. Astrocyte-like cells derived from human oral mucosa stem cells provide neuroprotection in vitro and in vivo. *Stem Cells Transl Med.* 2014;3(3):375-86.
66. Miyoshi K, Horiguchi T, Tanimura A, Hagita H, Noma T. Gene Signature of Human Oral Mucosa Fibroblasts: Comparison with Dermal Fibroblasts and Induced Pluripotent Stem Cells. *Biomed Res Int.* 2015;2015:121575.

67. DiPietro LA. Oral Stem Cells: The Fountain of Youth for Epithelialization and Wound Therapy? *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014;1;3(7):465-467.
68. Jones KB, Klein OD. Oral epithelial stem cells in tissue maintenance and disease: the first steps in a long journey. *Int J Oral Sci*. 2013;5(3):121-9.
69. Shakoori P, Zhang Q, Le AD. Applications of Mesenchymal Stem Cells in Oral and Craniofacial Regeneration. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2017;29(1):19-25.
70. Dupin E, Coelho-Aguiar JM. Isolation and differentiation properties of neural crest stem cells. *Cytometry A*. 2013;83(1):38-47.
71. Achilleos A, Trainor P. Neural crest stem cells: discovery, properties and potential for therapy. *Cell Res*. 2012;22: 288–304.
72. Sauka-Spengler T, Bronner-Fraser M . A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:557–568.
73. Mehrotra P, Tseropoulos G, Bronner ME, Andreadis ST. Adult tissue–derived neural crest-like stem cells: Sources, regulatory networks, and translational potential. *Stem Cells Translational Medicine*. 2019;9(3):328–341.
74. Young HM, Anderson RB, Newgreen DF. Neural Crest. *Encyclopedia of Neuroscience*. 2009;123–133.
75. Stemple DL, Anderson DJ. Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell*. 1992;71:973-985.
76. Morrison SJ, White PM, Zock C, Anderson DJ .Prospective identification, isolation by flow cytometry, and *in vivo* self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell*. 1999;96:737–749.
77. Colas JF, Schoenwolf GC. Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev Dyn* 2001;221(2):117-45.
78. Laplane L, Solary E. Towards a classification of stem cells. *Elife*. 2019;13;8:e46563.
79. Fernandez-Muñoz B, Garcia-Delgado AB, Arribas-Arribas B, Sanchez-Pernaute R. Human Neural Stem Cells for Cell-Based Medicinal Products. *Cells*. 2021;9;10(9):2377.
80. Hipp J, Atala A. Sources of stem cells for regenerative medicine. *Stem Cell Rev*. 2008;4(1):3-11.
81. Umscheid CA, Margolis DJ, Grossman CE. Key concepts of clinical trials: a narrative review. *Postgrad Med*. 2011;123(5):194-204.

82. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 2008;22(3):659-61.
83. Mitrecic D, Nicaise C, Klimaschewski L, Gajovic S, Bohl D, Pochet R. Genetically modified stem cells for the treatment of neurological diseases. *Front Biosci.* 2012;1;4(3):1170-81.
84. Zeng X, Couture LA. Pluripotent stem cells for Parkinson's disease: progress and challenges. *Stem Cell Res Ther.* 2013;15;4(2):25.
85. Takagi Y, Takahashi J, Saiki H, Morizane A, Hayashi T, Kishi Y i sur. Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J Clin Invest.* 2005;115(1):102-9.
86. López-González R, Kunckles P, Velasco I. Transient recovery in a rat model of familial amyotrophic lateral sclerosis after transplantation of motor neurons derived from mouse embryonic stem cells. *Cell Transplant.* 2009;18(10):1171-81.
87. Mitrečić D, Gajović S, Pochet R. Toward the treatments with neural stem cells: experiences from amyotrophic lateral sclerosis. *Anat Rec (Hoboken).* 2009;292(12):1962-7.
88. Shakoori P, Zhang Q, Le AD. Applications of Mesenchymal Stem Cells in Oral and Craniofacial Regeneration. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2017;29(1):19-25.
89. Chen HC, Chen HL, Lai JY, Chen CC, Tsai YJ i sur. Persistence of transplanted oral mucosal epithelial cells in human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(10):4660-8.
90. Toshida H, Kasahara T, Kiriya M, Iwasaki Y, Sugita J, Ichikawa K i sur. Early Clinical Outcomes of the First Commercialized Human Autologous Ex Vivo Cultivated Oral Mucosal Epithelial Cell Transplantation for Limbal Stem Cell Deficiency: Two Case Reports and Literature Review. *Int J Mol Sci.* 2023;18;24(10):8926.
91. Hur JW, Cho TH, Park DH, Lee JB, Park JY, Chung YG. Intrathecal transplantation of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells for treating spinal cord injury: A human trial. *J Spinal Cord Med.* 2016;39(6):655-664.
92. Muir KW, Bulters D, Willmot M, Sprigg N, Dixit A, Ward N i sur. Intracerebral implantation of human neural stem cells and motor recovery after stroke: multicentre prospective single-arm study (PISCES-2). *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2020;91(4):396-401.
93. Wiki IM, Barbieux-Guillot M, Vadot W, Marcel S, Lamalle L, Grand S i sur. Autologous Mesenchymal Stem Cells Improve Motor Recovery in Subacute

- Ischemic Stroke: a Randomized Clinical Trial. *Transl Stroke Res.* 2020;11(5):910-923.
94. Shakoory P, Zhang Q, Le AD. Applications of Mesenchymal Stem Cells in Oral and Craniofacial Regeneration. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2017;29(1):19-25.
95. Cho YS, Ko IG, Kim SE, Lee SM, Shin MS, Kim CJ i sur. Oral mucosa stem cells alleviates spinal cord injury-induced neurogenic bladder symptoms in rats. *J Biomed Sci.* 2014;13;21(1):43.
96. Kouchakian MR, Baghban N, Moniri SF, Baghban M, Bakhshalizadeh S, Najafzadeh V i sur. The Clinical Trials of Mesenchymal Stromal Cells Therapy. *Stem Cells Int.* 2021;3;2021:1634782.
97. Clavellina D, Balkan W, Hare JM. Stem cell therapy for acute myocardial infarction: Mesenchymal Stem Cells and induced Pluripotent Stem Cells. *Expert Opin Biol Ther.* 2023;23(10):951-967.
98. Richardson SM, Kalamegam G, Pushparaj PN, Matta C, Memic A, Khademhosseini A i sur. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration. *Methods.* 2016;99:69-80.
99. Murata M, Teshima T. Treatment of Steroid-Refractory Acute Graft-*Versus*-Host Disease Using Commercial Mesenchymal Stem Cell Products. *Front Immunol.* 2021;19;12:724380.
100. Song E, Yang W, Cui ZH, Dong Y, Sui DM, Guan XK i sur. Transplantation of human limbal cells cultivated on amniotic membrane for reconstruction of rat corneal epithelium after alkaline burn. *Chin Med J.* 2005;5;118(11):927-35.
101. Das J, Sharrack B, Snowden JA. Autologous hematopoietic stem-cell transplantation in neurological disorders: current approach and future directions. *Expert Rev Neurother.* 2020 Dec;20(12):1299-1313.
102. Frey BM, Humpe A. ATMPs: New Challenge for Transfusion Services. *Transfus Med Hemother.* 2022 May 25;49(3):127-128.
103. Bellino S, La Salvia A, Cometa MF, Botta R. Cell-based medicinal products approved in the European Union: current evidence and perspectives. *Front Pharmacol.* 2023 Jul 31;14:1200808.
104. Giommetti A, Papanikolaou E. Advancements in Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy: A Journey of Progress for Viral Transduction. *Cells.* 2024 Jun 15;13(12):1039.

105. Fernández-Garza LE, Barrera-Barrera SA, Barrera-Saldaña HA. Mesenchymal Stem Cell Therapies Approved by Regulatory Agencies around the World. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023 Sep 21;16(9):1334.
106. Alessandrini M, Preynat-Seauve O, De Bruin K, Pepper MS. Stem cell therapy for neurological disorders. *S Afr Med J*. 2019;10;109(8b):70-77.
107. Namiot ED, Niemi JVL, Chubarev VN, Tarasov VV, Schiöth HB. Stem Cells in Clinical Trials on Neurological Disorders: Trends in Stem Cells Origins, Indications, and Status of the Clinical Trials. *Int J Mol Sci*. 2022;28;23(19):11453.
108. Kawabori M, Shichinohe H, Kuroda S, Houkin K. Clinical Trials of Stem Cell Therapy for Cerebral Ischemic Stroke. *Int J Mol Sci*. 2020;6;21(19):7380.
109. Alanazi A, Alassiri M, Jawdat D, Almalik Y. Mesenchymal stem cell therapy: A review of clinical trials for multiple sclerosis. *Regen Ther*. 2022;23;21:201-209.
110. Kwon S, Yoo KH, Sym SJ, Khang D. Mesenchymal stem cell therapy assisted by nanotechnology: a possible combinational treatment for brain tumor and central nerve regeneration. *Int J Nanomedicine*. 2019;29;14:5925-5942.
111. Shinozaki M, Nagoshi N, Nakamura M, Okano H. Mechanisms of Stem Cell Therapy in Spinal Cord Injuries. *Cells*. 2021;6;10(10):2676.
112. Lin WY, Wu KH, Chen CY, Guo BC, Chang YJ, Lee TA i sur. Stem Cell Therapy in Children with Traumatic Brain Injury. *Int J Mol Sci*. 2023;28;24(19):14706.
113. Han F, Bi J, Qiao L, Arancio O. Stem Cell Therapy for Alzheimer's Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1266:39-55.
114. Vasic V, Barth K, Schmidt MHH. Neurodegeneration and Neuro-Regeneration-Alzheimer's Disease and Stem Cell Therapy. *Int J Mol Sci*. 2019;31;20(17):4272.
115. MacIntyre NR. Tissue Hypoxia: Implications for the Respiratory Clinician. *Respiratory Care*. 2014;59(10):1590–1596.
116. Mairbäurl H, Weber RE. Oxygen transport by hemoglobin. *Compr Physiol*. 2012;2(2):1463-89.
117. Bonkowsky JL, Son JH. Hypoxia and connectivity in the developing vertebrate nervous system. *Dis Model Mech*. 2018;12;11(12):037127.
118. Martin SS, Aday AW, Almarzooa ZI, Anderson CAM, Pankaj A, Avery CL i sur. American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee; 2024 Heart disease and stroke statistics: A report of

- US and global data from the American Heart Association. *Circulation*. 2024; 149:347–913.
119. Montaña A, Hanley DF, Hemphill JC 3rd. Hemorrhagic stroke. *Handb Clin Neurol*. 2021;176:229-248.
 120. Grysiewicz RA, Thomas K, Pandey DK. Epidemiology of ischemic and hemorrhagic stroke: incidence, prevalence, mortality, and risk factors. *Neurol Clin*. 2008;26(4):871-95.
 121. Alsbrook DL, Di Napoli M, Bhatia K, Biller J, Andalib S, Hinduja A i sur. Neuroinflammation in Acute Ischemic and Hemorrhagic Stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2023;23(8):407-431.
 122. Hribljan V, Lisjak D, Petrović DJ, Mitrečić D. Necroptosis is one of the modalities of cell death accompanying ischemic brain stroke: from pathogenesis to therapeutic possibilities. *Croat Med J*. 2019;30;60(2):121-126.
 123. Ristovska S, Stomnaroska O, Danilovski D. Hypoxic Ischemic Encephalopathy (HIE) in Term and Preterm Infants. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)*. 2022;22;43(1):77-84.
 124. Lai MC, Yang SN. Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:609813.
 125. Russ JB, Simmons R, Glass HC. Neonatal Encephalopathy: Beyond Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Neoreviews*. 2021;22(3):e148-e162.
 126. Greco P, Nencini G, Piva I, Scioscia M, Volta CA, Spadaro S i sur. Pathophysiology of hypoxic-ischemic encephalopathy: a review of the past and a view on the future. *Acta Neurol Belg*. 2020;120(2):277-288.
 127. Silveira RC, Procianoy RS. Hypothermia therapy for newborns with hypoxic ischemic encephalopathy. *J Pediatr*. 2015;91(6):78-83.
 128. Finder M, Boylan GB, Twomey D, Ahearne C, Murray DM, Hallberg B. Two-Year Neurodevelopmental Outcomes After Mild Hypoxic Ischemic Encephalopathy in the Era of Therapeutic Hypothermia. *JAMA Pediatr*. 2020;1;174(1):48-55.
 129. Park YJ, Borlongan CV, Dezawa M. Cell-based treatment for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Brain Circ*. 2021;30;7(1):13-17.
 130. Nair S, Rocha-Ferreira E, Fleiss B, Nijboer CH, Gressens P, Mallard C i sur. Neuroprotection offered by mesenchymal stem cells in perinatal brain injury: Role of mitochondria, inflammation, and reactive oxygen species. *J Neurochem*. 2021;158(1):59-73.

131. Whaley D, Damyar K, Witek RP, Mendoza A, Alexander M, Lakey JR. Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell Transplant*. 2021;30:963689721999617.
132. Xie L, Zeng X, Hu J, Chen Q. Characterization of Nestin, a Selective Marker for Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International*. 2015;1:9.
133. Park S, Seo KW, So AY, Seo MS, Yu KR, Kang SK i sur. SOX2 has a crucial role in the lineage determination and proliferation of mesenchymal stem cells through Dickkopf-1 and c-MYC. *Cell Death Differ* 2012;19:534–545.
134. Shi G, Jin Y. Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. *Stem Cell Res Ther*. 2010;14;1(5):39.
135. King NM, Perrin J. Ethical issues in stem cell research and therapy. *Stem Cell Res Ther*. 2014;7;5(4):85.
136. Tanaka K, Okitsu T, Teramura N, Iijima K, Hayashida O, Teramae Hi sur. Recombinant collagenase from *Grimontia hollisae* as a tissue dissociation enzyme for isolating primary cells. *Sci Rep*. 2020;3;10(1):3927.
137. Yonenaga K, Nishizawa S, Nakagawa T, Fujihara Y, Asawa Y, Hikita A i sur. Optimal conditions of collagenase treatment for isolation of articular chondrocytes from aged human tissues. *Regen Ther*. 2017;26;6:9-14.
138. Jin SH, Lee JE, Yun JH, Kim I, Ko Y, Park JB. Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells from gingival connective tissue. *J Periodontal Res*. 2015;50(4):461-7.
139. Lim LS, Riau A, Poh R, Tan DT, Beuerman RW, Mehta JS. Effect of dispase denudation on amniotic membrane. *Mol Vis*. 2009;25;15:1962-70.
140. Lai TY, Cao J, Ou-Yang P, Tsai CY, Lin CW, Chen CC i sur. Different methods of detaching adherent cells and their effects on the cell surface expression of Fas receptor and Fas ligand. *Sci Rep* 2022;12:5713 (2022).
141. Zhao Q, Liu F. Derivation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells from iPS Cells. *Methods Mol Biol*. 2022;2454:443-454.
142. Bernal A, Arranz L. Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(12):2177-2195.
143. Han DW, Do JT, Araúzo-Bravo MJ, Lee SH, Meissner A, Lee HT i sur. Epigenetic Hierarchy Governing Nestin Expression. *Stem cells*. 2009;27(5): 1088–1097.

144. Shu M, Xue X, Nie H, Wu X, Sun M, Qiao L i sur. Single-cell RNA sequencing reveals Nestin+ active neural stem cells outside the central canal after spinal cord injury. *Science China Life Sciences*. 2021.
145. Béguin PC, El-Helou V, Gillis MA, Duquette N, Gosselin H, Brugada R i sur. Nestin(+) stem cells independently contribute to neural remodelling of the ischemic heart. *Journal of Cellular Physiology*. 2011;226(5):1157–1165.
146. Xie L, Zeng X, Hu J, Chen Q. Characterization of Nestin, a Selective Marker for Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International*. 2015;1:9.
147. Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B i sur. Multipotential Nestin-Positive Stem Cells Isolated From Adult Pancreatic Islets Differentiate Ex Vivo Into Pancreatic Endocrine, Exocrine, and Hepatic Phenotypes. *Diabetes*. 2001;50(3):521–533.
148. Pan G, Chang Z, Schöler H, Pei D. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res*. 2002;12:321–329.
149. Niwa H, Miyazaki Ji, Smith A. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*. 2000;24:372–376.
150. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*. 2003;17(1):126-40.
151. Bylund M, Andersson E, Novitch BG, Muhr J. Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci*. 2003;6(11):1162-8.
152. Zhang J, Ghosh J, Mohamad SF, Zhang C, Huang X, Capitano ML i sur. CD166 Engagement Augments Mouse and Human Hematopoietic Progenitor Function via Activation of Stemness and Cell Cycle Pathways. *Stem Cells*. 2019;37(10):1319-1330.
153. Moraes DA, Sibov TT, Pavon LF, Alvim PQ, Bonadio RS, Da Silva RJ i sur. A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7:97.
154. Tan K, Zhu H, Zhang J, Ouyang W, Tang J, Zhang Y i sur. CD73 Expression on Mesenchymal Stem Cells Dictates the Reparative Properties via Its Anti-Inflammatory Activity. *Stem Cells International*. 2019;1:12.
155. Muhl L, Genové G, Leptidis S, Liu J, He L, Mocci G i sur. Single-cell analysis uncovers fibroblast heterogeneity and criteria for fibroblast and mural cell identification and discrimination. *Nat Commun*. 2020;11:3953.
156. Lendahl U, Muhl L, Betsholtz C. Identification, discrimination and heterogeneity of fibroblasts. *Nat Commun*. 2022;13:3409.

157. Ugurlu B, Karaoz E. Comparison of similar cells: Mesenchymal stromal cells and fibroblasts. *Acta Histochemica*. 2020;122(8):151634.
158. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D i sur. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
159. Halfon S, Abramov N, Grinblat B, Ginis I. Markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts are downregulated with passaging. *Stem Cells Dev*. 2011;20(1):53-66.
160. Sirko S, Akita K, Von Holst A, Faissner A. Structural and Functional Analysis of Chondroitin Sulfate Proteoglycans in the Neural Stem Cell Niche. *Functional Glycomics*. 2010;37:71.
161. Sünwoldt J, Bosche B, Meisel A, Mergenthaler P. Neuronal Culture Microenvironments Determine Preferences in Bioenergetic Pathway Use. *Front Mol Neurosci*. 2017;29;10:305.
162. Liu L, Michowski W, Kolodziejczyk A, Sicinski P. The cell cycle in stem cell proliferation, pluripotency and differentiation. *Nat Cell Biol*. 2019;21:1060–1067.
163. Basabrain MS, Zhong J, Luo H, Liu J, Yi B, Zaeneldin A i sur. Formation of Three-Dimensional Spheres Enhances the Neurogenic Potential of Stem Cells from Apical Papilla. *Bioengineering (Basel)*. 2022;22;9(11):604.
164. Sukach AN, Ivanov EN. Formation of spherical colonies as a property of stem cells. *Cell Tiss. Biol*. 2007;1:476–481.
165. Yang E, Liu N, Tang Y, Hu Y, Zhang P, Pan C i sur. Generation of neurospheres from human adipose-derived stem cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015:743714.
166. Da Silva SL, Majolo F, Da Silva APB, Da Costa JC, Marinowic DR. Neurospheres: a potential in vitro model for the study of central nervous system disorders. *Mol Biol Rep*. 2021;48:3649–3663.
167. Gonmanee T, Arayapisit T, Vongsavan K, Phruksaniyom C, Sritanaudomchai H. Optimal culture conditions for neurosphere formation and neuronal differentiation from human dental pulp stem cells. *J Appl Oral Sci*. 2021;1;29:e20210296.
168. Radoszkiewicz K, Hribljan V, Isakovic J, Mitrecic D, Sarnowska A. Critical points for optimizing long-term culture and neural differentiation capacity of rodent and human neural stem cells to facilitate translation into clinical settings. *Exp Neurol*. 2023;363:114353.

169. Stil A, Liberelle B, Guadarrama Bello D, Lacomme L, Arpin L, Parent P i sur. A simple method for poly-D-lysine coating to enhance adhesion and maturation of primary cortical neuron cultures *in vitro*. *Front Cell Neurosci*. 2023;21;17:1212097.
170. Miller Rhodes P. A Guide to Neural Stem Cell Markers. *Life Sci.Articles*. 2022. Dostupno na: <https://www.biocompare.com/Editorial-Articles/592536-A-Guide-to-Neural-Stem-Cell-Markers/>
171. Li G, Liu J, Guan Y, Ji X. The role of hypoxia in stem cell regulation of the central nervous system: From embryonic development to adult proliferation. *CNS Neurosci Ther*. 2021;27(12):1446-1457.
172. Pu J, Han J, Yang J, Yu L, Wan H. Anaerobic Glycolysis and Ischemic Stroke: From Mechanisms and Signaling Pathways to Natural Product Therapy. *ACS Chem Neurosci*. 2024;4;15(17):3090-3105.
173. Jagečić D, Petrović DJ, Šimunić I, Isaković J, Mitrečić D. The Oxygen and Glucose Deprivation of Immature Cells of the Nervous System Exerts Distinct Effects on Mitochondria, Mitophagy, and Autophagy, Depending on the Cells' Differentiation Stage. *Brain Sci*. 2023;4;13(6):910.
174. Czabotar P, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15: 49–63.
175. Taylor CT, Scholz CC. The effect of HIF on metabolism and immunity. *Nat Rev Nephrol*. 2022;18:573–587.
176. Tasca CI, Dal-Cim T, Cimarosti H. In vitro oxygen-glucose deprivation to study ischemic cell death. *Methods Mol Biol*. 2015;1254:197-210.
177. Noverina R, Widowati W, Ayuningtyas W, Kurniawan D, Afifah E, Laksmiawati DR i sur. Growth Factors Profile in Conditioned Medium human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells (CM-hATMSCs). *Clinical Nutrition Experimental*. 2019.
178. Andjus P, Kosanović M, Milićević K, Gautam M, Vainio SJ, Jagečić D i sur. Extracellular Vesicles as Innovative Tool for Diagnosis, Regeneration and Protection against Neurological Damage. *Int. J. Mol. Sci*. 2020;21:6859.
179. Liu P, Xie Xr, Wu Hao, Li H, Chi J, Liu X i sur. Conditioned medium of mesenchymal stem cells pretreated with H₂O₂ promotes intestinal mucosal repair in acute experimental colitis. *Sci Rep*. 2022;12:20772.
180. Montero-Vilchez T, Sierra-Sánchez Á, Sanchez-Diaz M, Quiñones-Vico MI, Sanabria-de-la-Torre R, Martinez-Lopez A i sur. Mesenchymal Stromal Cell-Conditioned Medium for Skin Diseases: A Systematic Review. *Front Cell Dev Biol*. 2021;23;9:654210.

181. Alidoust L, Akhoondian M, Atefi AH, Keivanlou MH, Hedayati Ch M, Jafari A. Stem cell-conditioned medium is a promising treatment for Alzheimer's disease. *Behav Brain Res.* 2023;24;452:114543.
182. Chen R, Lai UH, Zhu L, Singh A, Ahmed M, Forsyth NR. Reactive Oxygen Species Formation in the Brain at Different Oxygen Levels: The Role of Hypoxia Inducible Factors. *Front Cell Dev Biol.* 2018;10;6:132.
183. Chen A, Xiong LJ, Tong Y, Mao M. The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury. *Biomed Rep.* 2013;1(2):167-176.
184. Baldassarro VA, Cescatti M, Rocco ML, Aloe L, Lorenzini L, Giardino L i sur. Nerve growth factor promotes differentiation and protects the oligodendrocyte precursor cells from *in vitro* hypoxia/ischemia. *Front Neurosci.* 2023;16;17:1111170.
185. Turovskaya MV, Gaidin SG, Vedunova MV, Babaev AA, Turovsky EA. BDNF Overexpression Enhances the Preconditioning Effect of Brief Episodes of Hypoxia, Promoting Survival of GABAergic Neurons. *Neurosci. Bull.* 2020;36:733–760.
186. Montero P, Roger I, Estornut C, Milara J, Cortijo J. Influence of dose and exposition time in the effectiveness of N-Acetyl-L-cysteine treatment in A549 human epithelial cells. *Heliyon.* 2023;20;9(5):15613.

11. ŽIVOTOPIS

Paula Stančin rođena je 22. svibnja 1996. godine u Koprivnici, gdje završava osnovnu školu i Jezičnu gimnaziju. 2015. godine upisuje preddiplomski studij biologije na Biološkom Odsjeku, Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku. 2018. godine upisuje diplomski studij Fiziologija i imunologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu. Od 2020. godine zaposlena je kao doktorandica na projektu Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ): „Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“, pod mentorstvom prof. dr. sc. Dinka Mitrečića te se pridružuje radu Laboratorija za matične stanice Hrvatskog instituta za istraživanje mozga i Zavoda za Histologiju i embriologiju. Također, iste godine je upisala poslijediplomski studij Neuroznanost na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Za vrijeme doktorskog studija sudjeluje u izvođenju dodiplomske nastave u sklopu kolegija Histologija i embriologija za studente medicine hrvatskog i engleskog studija. 2020. godine je dobitnica je Rektorove nagrade, Sveučilišta u Zagrebu. Dobitnica je stipendije Cost programa u sklopu koje je držala izlaganje na ljetnoj školi u Italiji. Sudjelovala je u organizaciji i popularizaciji neuroznanosti koju organiziraju Hrvatski institut za istraživanje mozga i Hrvatsko društvo za neuroznanost pod nazivom “Tjedan mozga”. Rezultate svog istraživanja prezentirala je na domaćim i međunarodnim kongresima u sklopu kojih je održala dva usmena izlaganja i osvojila nagradu za najbolje poster izlaganje. Autor je na tri znanstvena rada, od kojih je na jednom u sklopu doktorske disertacije prvi autor. Članica je Hrvatskog društva za neuroznanost i Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju.