

Izolacija i diferencijacija matičnih stanica iz sluznice usne šupljine

Keršić, Filip

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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://um.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:674234>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2021-08-05**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Filip Keršić

**Izolacija i diferencijacija matičnih stanica iz
sluznice usne šupljine**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2016.

Diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za matične stanice Hrvatskog instituta za istraživanje mozga i u Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Dinka Mitrečića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2015/2016.

Mentor rada: doc. dr. sc. Dinko Mitrečić

POPIS KRATICA

ESC - embrionalne matične stanice (*engl.* embryonic stem cells)

TSSC – tkivno specifične matične stanice (*engl.* tissue-specific stem cells)

hOMSC – ljudske mezenhimske matične stanice sluznice usne šupljine (*engl.* human oral mesenchymal stem cells)

OMLP-PC - prastanice lamine proprije sluznice usne šupljine (*engl.* oral mucosa lamina propria progenitor cells)

MSC - mezenhimske matične stanice (*engl.* mesenchymal stem cells)

MHC – glavni kompleks gena tkivne podudarnosti (*engl.* major histocompatibility complex)

HLA – ljudski leukocitni antigen (*engl.* human leukocyte antigen)

CD – leukocitni diferencijacijski biljezi (*engl.* cluster of differentiation)

BMMSC – mezenhimske matične stanice koštane srži (*engl.* bone-marrow mesenchymal stem cells)

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

DPSC – matične stanice apikalne papile (*engl.* dental papilla stem cells)

PBS – fosfatni pufer (*engl.* phosphate buffer saline)

TABLICA SADRŽAJA

1. SAŽETAK	
2. SUMMARY	
3. UVOD	1
3.1. Oralna sluznica: razvoj i histologija	2
3.2. Oralne mezenhimske matične stanice.....	2
3.2.1. Imunosna svojstva matičnih stanica sluznice usne šupljine.....	3
3.2.2. Diferencijacija matičnih stanica sluznice usne šupljine.....	4
3.2.3. Identifikacija matičnih stanica usne šupljine	4
3.2.4. Izolacija matičnih stanica usne šupljine.....	5
3.2.5. Matične stanice sluznice usne šupljine kao izvor induciranih pluripotentnih matičnih stanica	5
3.3. Potencijalna primjena matičnih stanica sluznice usne šupljine	5
4. HIPOTEZA	7
5. CILJEVI RADA	7
6. MATERIJALI I METODE	7
6.1. Izolacija matičnih stanica sluznice usne šupljine	7
6.3. Priprema podloga za diferencijaciju stanica.....	8
6.4. Diferencijacija stanica	8
6.5. Fiksacija stanica.....	9
6.6. Imunocitokemija.....	9
7. REZULTATI.....	11
7.1. Spontana diferencijacija stanica	11
7.2. Diferencijacija usmjerena prema ektodermalnim stanicama.....	12
7.3. Diferencijacija usmjerena prema mezodermalnim stanicama.....	13
8. RASPRAVA.....	14
9. ZAKLJUČCI.....	16
10. ZAHVALE.....	17
11. POPIS LITERATURE	18
12. ŽIVOTOPIS	22

1. SAŽETAK

Izolacija i diferencijacija matičnih stanica iz sluznice usne šupljine

Filip Keršić

Matične stanice sluznice usne šupljine su prvi put opisane prije pet godina. Kao i druge matične stanice, posjeduju tri jedinstvene karakteristike koje ih razlikuju od bilo koje druge stanice u našem tijelu: samoobnavljanje, klonalnost te sposobnost diferenciranja u nekoliko staničnih vrsta. Budući da su matične stanice sluznice usne šupljine podrijetla neuralnog grebena, pokazuju sklonost diferenciranja prema živčanoj staničnoj lozi. Također, ove stanice pokazuju antibakterijska te imunomodulacijska svojstva. Zbog ovih karakteristika, obećavaju puno u terapiji brojnih bolesti.

Cilj ovog istraživanja bio je napraviti *in vitro* analizu diferencijacije matičnih stanica sluznice usne šupljine te dokazati njihovu sposobnost diferencijacije prema ektodermalnoj i mezodermalnoj staničnoj lozi. Rezultati su pokazali da se te stanice doista mogu diferencirati prema ektodermalnoj lozi pri čemu su izražavale biljege matičnih stanica (Oct4, Nestin i SOX2) te neurona (MAP2 i β 3-tubulin). Također, izražavajući biljeg Osterix smo dokazali i njihovu sposobnost diferencijacije prema mezodermalnoj staničnoj lozi.

Ključne riječi: matične stanice sluznice usne šupljine, jedinstvene karakteristike, multipotentnost, imunomodulacija

2. SUMMARY

Isolation and differentiation of stem cells from oral mucosa

Filip Keršić

Human oral mucosa stem cells (hOMSC) are a novel, stem cell population that was described five years ago. As other stem cells, they possess three unique properties that make them different from any other cell in our body. Those are: self-renewal, clonality and potency to generate several differentiated cell types. hOMSCs are multipotent and have the ability to differentiate down mesenchymal and neuronal lineages. What is more, these cells demonstrate antibacterial and immunomodulatory properties. Due to these characteristics, they hold great promises for the treatment of many pathologies.

The goal of our study was to perform *in vitro* analysis of differentiation of stem cells from oral mucosa and prove their capacity to differentiate down ectodermal and mesodermal lineage. As a result, we proved that those cells indeed have capacity to differentiate into ectodermal lineage by expressing stem cell markers (Oct4, Nestin and SOX2), as well as neuronal markers (MAP2 and β 3-tubulin). Moreover, by expressing Osterix marker we proved that those cells can differentiate into mesodermal lineage.

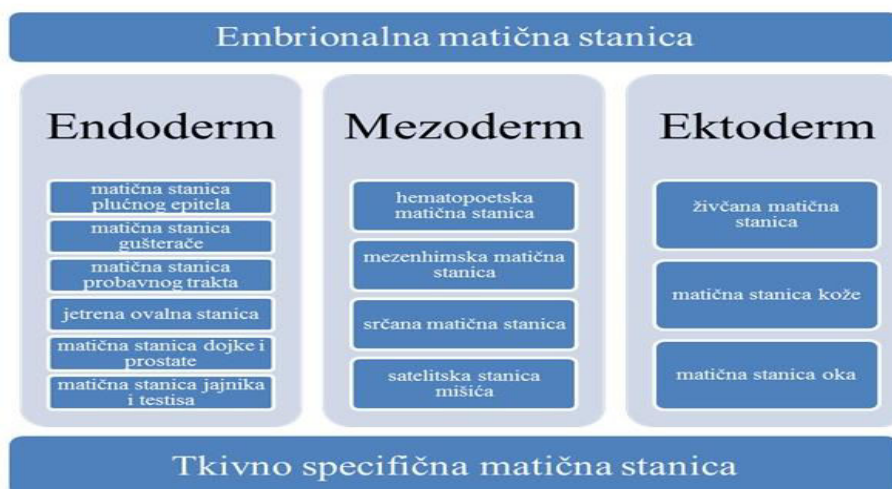
Key words: human oral mucosa stem cells, unique properties, multipotency, immunomodulation

3. UVOD

Matične stanice definiraju se kao stanice koje imaju sposobnost samoobnavljanja i generiranja diferenciranih stanica (Weissman i sur., 2001; Smith, 2001). Matične stanice imaju veoma važne uloge u razvoju organa i djeluju kao jedan interni sustav popravka, koji se je u stanju dijeliti i nadopunjavati druge stanice (Weissman, 2000; Morshead i sur., 1994). Tijekom embrionalnog razvoja, tkiva su izgrađena od pluripotentnih embrionalnih matičnih stanica (Xiao i Nasu, 2014). One mogu dugo vremena ostati u stanju mirovanja, a nakon podražaja mogu se diferencirati u matične stanice koje su specifične za određenu vrstu tkiva (Potdar i Deshpande, 2013). Embrionalne stanice diferenciraju se u multipotentne matične stanice, a interakcije između tih matičnih stanica rezultiraju nastajanjem visoko specijaliziranih funkcionalnih tkiva i organa (Vainio i sur., 1993).

Zbog svojih svojstava, matične stanice su predmet intenzivnih istraživanja, od shvaćanja osnovnih mehanizama koji potiču stvaranje tkiva, preko izrade modela ljudskih bolesti, do njihove primjene u liječenju zamjenom stanica.

Ovisno o njihovom nastanku, matične stanice dijele se u dvije kategorije: embrionalne matične stanice ili ESC (*engl.* „embryonic stem cells“) i odrasle matične stanice, koje se također nazivaju tkivno specifične matične stanice ili TSSC (*engl.* tissue-specific stem cells), podrijetlom ili od fetusa ili od nekog pojedinca nakon rođenja (Slika 1.). Druga podjela matičnih stanica je temeljena na njihovom razvojnom potencijalu, koja ih dijeli na totipotentne, pluripotentne, multipotentne i unipotentne (Tablica 1.).



Slika 1. Shematski prikaz diferencijacije matične stanice.

Tablica 1. Matične stanice prema njihovom podrijetlu i razvojnom potencijalu. EMS-embriionalna matična stanica, TSMS-tkivno specifična matična stanica.

Naziv	Vrsta stanice (lokacija)	Diferencijacijski potencijal	Podrijetlo
EMS	Stanice u stadiju morule, Stanice unutrašnjeg sloja u stadiju blastociste	Totipotentne stanice, Pluripotentne stanice	Embriionalna i ekstraembriionalna tkiva Embrio
EMS	Stanice epiblasta u stadiju gastrule	Pluripotentne stanice	Endoderm, mezoderm i ektoderm
EMS	Stanice endoderma, mezoderma i ektoderma	Pluripotentne stanice	Sve somatske stanice
TSMS	Stanice specifičnih tkiva	Multipotentne stanice	Jedna ili više vrsta stanica ovisno o tkivu u kojem se nalazi (npr. hematopoetska matična stanica)
TSMS	Stanice određenog tkiva	Unipotentne stanice	Jedna vrsta stanice (npr. satelitska stanica mišića)

3.1. Oralna sluznica: razvoj i histologija

Epitel sluznice usne šupljine nastaje od embrionalnog ektoderma, dok se epitel oko jezika razvija kako iz endoderma tako i iz ektoderma (Winning i Townsend, 2000; Rothova i sur., 2012). Mezenhimske strukture, poput većine elemenata vezivnog tkiva, proizlaze iz stanica kranijalnog neuralnog grebena (CNCC, *engl.* cranial neural crest cells) (Johnston i Bronsky, 1995). Sluznica usne šupljine može se općenito podijeliti u tri podvrste: mastikatornu, specijaliziranu i obložnu. U ljudi, mastikatorna i specijalizirana sluznica je keratizirana i sastoji se od bazalnog, trnastog, zrnatog i rožnatog sloja, dok je obložna sluznica nekeratizirana i sastoji se od bazalnog, trnastog, prijelaznog i površinskog sloja (Barrett i sur., 1998). U svih epitelnih stanica, do dijeljenja stanica dolazi samo u bazalnom sloju (Jones i Klein, 2013).

3.2. Oralne mezenhimske matične stanice

Oralne mezenhimske matične stanice uključuju matične stanice pulpe, matične stanice ispalih mliječnih zuba, matične stanice apikalne papile, matične stanice paradontnog ligamenta te mezenhimske matične stanice zubnog mesa (gingive) (Huang i sur., 2009). Međutim, novija zapažanja pružaju dokaze da lamina propria u sluznici usne šupljine odraslih ljudi služi kao jedan rezervoar mezenhimijskih matičnih stanica s jasno izraženim fenotipom nalik neuralnom grebenu (Marynka-Kalmani i sur., 2010). Te se stanice smatraju prastanicama lamine proprije sluznice usne šupljine (OMLP-PC, *engl.* oral mucosa lamina propria progenitor cells), a koje su također poznate kao matične stanice ljudske sluznice usne šupljine (hOMSC, *engl.* human oral mucosa stem cells) (Marynka-Kalmani i sur., 2010). Sve

one pokazuju potencijal multidiferencijacije (Huang i sur., 2009) i pozitivne su na biljege mezenhimskih matičnih stanica (MSC *engl.* mesenchymal stem cells) (Mao i Prockop, 2012). Pored njihove multipotentnosti, MSC stanice pokazuju imunomodulatorne i protuupalne funkcije i imaju sposobnost izbjegavanja imunološkog sustava zbog nedostatka ekspresije MHC molekula klase II, što predstavlja ogromnu potencijalnu prednost za strategije stanične terapije (Salem i Thiernemann, 2010).

3.2.1. Imunosna svojstva matičnih stanica sluznice usne šupljine

Matične stanice ljudske sluznice usne šupljine OMSC pokazuju sličan imunofenotip kao mezenhimске matične stanice koštane srži (BMMSC, *engl.* bone marrow mesenchymal stem cells), konstitutivno izražavajući HLA I, ali su HLA II negativne, što ih čini imunosno privilegiranim (De Miguel i sur., 2012; Klyushnenkova i sur., 2005).

Meka tkiva usne šupljine stalno su izložena vanjskom okolišu pa stoga predstavljaju kritičnu točku za ulazak potencijalno štetnih bakterija. Međutim, kronične infekcije su rijetke, potencijalno zbog antimikrobnih čimbenika koje izlučuju rezidentne stanice unutar tkiva, kao što je žlijezda slinovnica. Matične stanice sluznice usne šupljine izlučuju osteoprotegerin (OPG) i haptoglobin (Hp) u koncentracijama koje su dovoljno visoke za ostvarivanje antibakterijskog djelovanja (Board-Davies i sur., 2015). Osteoprotegrin sputava rast Gram-pozitivnih bakterija, dok haptoglobin djeluje samo protiv Gram-negativnih mikroorganizama. Nadalje, sposobnost matičnih stanica hOMSC da sputavaju limfocitnu proliferaciju, čini ih prikladnima za primjenu u tehnikama alogeničnih transplantacija tkiva, kao i njihov očiti potencijal u izravnom liječenju poremećaja vezanih uz imunitet (Davies i sur., 2012). Stupanj supresije uočen unutar MSC matičnih stanica ovisi o dozi, pri čemu se stupanj imunosupresije smanjuje sa smanjivanjem broja prisutnih MSC matičnih stanica (Le Blanc i sur., 2003). Nasuprot tome, stanice OMLP PC djeluju neovisno o kontaktu i neovisno o dozi prilikom supresije alogenički induciranog imunogognog odgovora (Davies i sur., 2012). Ovaj supresivni učinak može biti krajnje važna odlika naših OMLP PC matičnih stanica, jer smrtnost, kao izravna posljedica teške reakcije transplantata protiv primatelja (GVHD, *engl.* Graft-Versus-Host-Disease), ostaje jedna od značajnih prepreka u alogeničkoj transplantaciji hematopoetskih matičnih stanica (HSC).

3.2.2. Diferencijacija matičnih stanica sluznice usne šupljine

Mezenhimske matične stanice predstavljaju jednu heterogenu populaciju prastanica koje su prvo bile okarakterizirane iz koštane srži (Luria i sur., 1971), a kasnije identificirane iz raznih odraslih tkiva, uključujući tkiva usne šupljine (Miura i sur., 2001; Zhang i sur., 2009). Poput mezenhimskih matičnih stanica koštane srži, matične stanice sluznice usne šupljine mogu se potaknuti na diferencijaciju u osteoblaste, adipocite i hondrocite pod specifičnim *in vitro* uvjetima (Wang i sur., 2011; Tomar i sur., 2010; Marynka-Kalmani i sur., 2010). Pored toga, one se mogu diferencirati u endodermalne i ektodermalne stanične loze, uključujući razne tipove neuralnih stanica (Zhang i sur., 2009; Marynka-Kalmani i sur., 2010). Povrh toga, rezultati *in vivo*, nakon transplantacije u imunokompromitirane miševe, pokazali su stvaranje kostima sličnog tkiva (Wang i sur., 2011), struktura nalik vezivnom tkivu (Zhang i sur., 2009; Tang i sur., 2011), pa čak i tkiva nalik teratomu (Marynka-Kalmani i sur., 2010).

3.2.3. Identifikacija matičnih stanica sluznice usne šupljine

Za sada ne postoji nikakav definitivni marker za identifikaciju mezenhimskih matičnih stanica (Nombela- Arrieta i sur., 2011). Međutim, Međunarodno društvo za staničnu terapiju (International Society for Cellular Therapy) predložilo je minimalne kriterije za definiranje MSC stanica (Dominici i sur., 2006). Prvo, one moraju biti prionjive uz plastiku kad se održavaju u standardnim uvjetima kulture. Drugo, one moraju izražavati površinske stanične biljege CD73, CD90 i CD105, ali ne CD45, CD34, CD14 ili CD11b, CD79a ili CD19 i molekule klase II glavnog kompleksa histokompatibilnosti. Treće, one moraju zadržati svojstvo da se u *in vitro* uvjetima diferenciraju u osteoblaste, hondroblaste i adipocite. Isto tako, ove stanice izražavaju široki raspon površinskih staničnih biljega, uključujući CD 44, CD90, CD105, CD166, CD73, i CD29, ali su negativne za CD 34 i CD45, što sugerira da ove populacije stanica nisu hematopoetskog ili fibrocitnog podrijetla (Deans i Moseley, 2000). Nadalje, nekih od ovih stanica podrijetlom su iz neuralnog grebena, jer izražavaju transkripcijske čimbenike specifične za neuralni greben, kao što su Slug, Snail, Twist, Sox10, i p75 (Davies i sur., 2010; Widera i sur., 2009; Marynka-Kalmani i sur., 2010).

3.2.4. Izolacija matičnih stanica sluznice usne šupljine

Matične stanice sluznice usne šupljine imaju nekoliko prednosti u odnosu na korištenje drugih izvora odraslih matičnih stanica. One se mogu jednostavno izolirati iz nekog lako pristupačnog mjesta biopsije sluznice usne šupljine, u usporedbi s invazivnim kirurškim zahvatom kao što je usisavanje koštane srži radi izoliranja MSC-a koštane srži. Nadalje, sluznica usne šupljine pokazuje brzo zacjeljivanje rana i minimalno stvaranje ožiljaka (Larjava i sur., 2011; Hallock, 1985). Premda postoje razlike u izolaciji i ekspanziji ovih stanica, klonalni pristup (*engl.* clonal approach) pruža jasne prednosti u odnosu na heterogene populacije matičnih stanica za terapiju matičnim stanicama, jer se te stanice mogu jasnije okarakterizirati, što daje ponovljive rezultate i daleko preciznije indikacije kako će te stanice reagirati i diferencirati se nakon, na primjer, transplantacije (Kotobuki i sur., 2004). U usporedbi s MSC stanicama iz drugih izvora, čini se da hOMSC stanice imaju relativno visoku sposobnost samoobnavljanja i učinkovitost kloniranja te da proizvode čimbenike rasta koji vjerojatno podupiru tu sposobnost (DiPietro, 2014). Kod nekih je stanica ta sposobnost povezana s njihovom ekspresijom i aktivacijom ljudske telomerase (Davies i sur., 2010).

3.2.5. Matične stanice sluznice usne šupljine kao izvor induciranih pluripotentnih matičnih stanica

Kao što je slučaj s drugim izvorima odraslih matičnih stanica, proliferativna sposobnost matičnih stanica usne šupljine ima svoje granice. Međutim, novija dostignuća u tehnologiji generiranja induciranih matičnih stanica (*engl.* Induced Pluripotent Stem Cells, iPSC), mogla bi prevladati ta ograničenja (Takahashi i Yamanaka, 2006). Nedavno je opisano generiranje takvih iPSC matičnih stanica iz staničnih populacija sluznice usne šupljine, uključujući fibroblaste ljudske dentalne pulpe, bukalne sluznice, apikalne papile i paradontnog ligamenta (Egusa i sur., 2010; Miyoshi i sur., 2010; Tamaoki i sur., 2010; Yan i sur., 2010; Wada i sur., 2011; Nomura i sur., 2012; Kerkis i Caplan, 2012; Zou i sur., 2012). Takve iPSC matične stanice su pluripotentne, sa sposobnošću diferenciranja u stanične tipove sva tri germinativna sloja.

3.3. Potencijalna primjena matičnih stanica sluznice usne šupljine

Matične stanice sluznice usne šupljine imaju odličnu sposobnost regeneracije, koja se može primijeniti ne samo u stomatologiji, već i u raznim područjima regenerativne medicine. Mezenhimske matične stanice dobivene iz dentalnih i nedentalnih izvora, efektivno se koriste za regeneraciju u maksilofacijalnom području, kao što je regeneracija zuba, zubne pulpe,

paradontnog ligamenta, proizvodnja cakline i dentina, regeneracija žlijezda slinovnica te popravak rascjepa usne i nepca (Wu i sur., 2014; Janebodin i Reyes, 2012; Bueno i sur., 2011). Međutim, za regeneraciju raznih vrsta tkiva treba odabrati odgovarajuće stanice, jer se ponašanje dentalnih i nedentalnih MSC stanica razlikuje kad se transplantiraju u imunokompromitirane životinje (Xiao i Nasu, 2014).

Čini se da su mezenhimske matične stanice sluznice usne šupljine idealni kandidat za regeneraciju kosti (Graziano i sur., 2008). Jedna (d'Aquino i sur., 2007) *in vivo* studija pokazala je da su ljudske DPSC stanice generirale i osteoblaste i endoteliocite te u konačnici stvorile jednu kostima nalik strukturu kod imunokompromotiranih štakora. U kliničkoj studiji (d'Aquino i sur., 2009) DPSC matične stanice i potpora od kolagenske spužve stvorili su jedan biokompleks koji je kod pacijenata mogao u cijelosti obnoviti nedostatke donje čeljusne kosti. Isto tako, grupa istraživača je u jednom primjeru na miševima dokazala da su se DPSC matične stanice bile u stanju diferencirati u mišićne stanice koje proizvode distrofin u mišićima paraliziranim kardiotoksinom, što ima implikacije za proučavanje i liječenje mišićne distrofije (Yang i sur., 2010).

Pošto oralne MSC stanice uglavnom proizlaze iz matičnih stanica neuralnog grebena, neke od njih poboljšavale su neuronalnu obnovu u životinja nakon što su implantirane u oštećeno mjesto središnjeg živčanog sustava (Yang i sur., 2009; Yamagata i sur., 2013). Štoviše, te su stanice pokazale potencijal za regeneraciju stanica gušterače (Govindasamy i sur., 2011) i hepatocita (Ishkitiev i sur., 2012; Ishkietev i sur., 2010).

Nadalje, protuupalna i imunomodulatorna svojstva hOMSC matičnih stanica ilustriraju potencijal hOMSC stanica u razvijanju novih terapija na bazi antibakterijskih stanica ili topivih čimbenika za stanja kao što su upala pluća ili kronične rane koje ne zacjeljuju (Board-Davies i sur., 2015).

Do sada je u tijeku samo nekoliko kliničkih pokusa na ljudima. Nedavno (Burillon i sur., 2012) su transplantirani oralni keratinociti, koji su uspješno nadomjestili oštećeni epitel rožnice i osigurali dugoročno poboljšanje oštine vida. Stoga je, u svrhu potvrde njihove istinske regenerativne moći, potrebno obaviti dvostruko slijepe randomizirane kontrolirane pokuse.

4. HIPOTEZA

Matične stanice izolirane iz sluznice usne šupljine mogu se tijekom diferencijacije *in vitro* usmjeriti prema stanicama ektodermalne i mezodermalne loze.

5. CILJEVI RADA

Kako bi se testirala hipoteza postavljeni su sljedeći ciljevi rada:

1. Napraviti *in vitro* analizu diferencijacije matičnih stanica sluznice usne šupljine
2. Dokazati sposobnost diferencijacije prema ektodermalnoj lozi
3. Dokazati sposobnost diferencijacije prema mezodermalnoj lozi

6. MATERIJALI I METODE

6.1. Izolacija matičnih stanica sluznice usne šupljine

Matične stanice usne šupljine izolirane su od odraslih donora u starosti od 20 do 44 godine. Uzorak tkiva sluznice usne šupljine izrezan je nakon lokalne aplikacije lidokaina. Izolirani uzorak tkiva veličine je 2x2 mm. Nakon, uzimanja uzorka komadić tkiva premješten je u sterilnu petrijevu posudicu gdje je ispran medijem (DMEM). Tkivo je mehanički usitnjeno kirurškim škalicama te su komadići premješteni u sterilnu tubu od 50 mL. Na usitnjeno tkivo dodano je 5 mL akutaze (StemPro®Acutase® Cell Dissociation Reagent, Gibco by life Technologies, A11105-01) kako bi se tkivo proteolitički razgradilo i dobila suspenzija stanica. Usitnjeno tkivo bilo je pod djelovanjem akutaze 20 minuta, na temperaturi od 37 °C. Tijekom tih 20 minuta, tkivo je dodatno usitnjeno mehaničkim provlačenjem kroz nastavak za pipetu. Nakon 20 minuta stanična suspenzija je prebačena u novu tubu i na nju je dodano isto toliko medija kako bi se deaktivirala akutaza te je stavljeno 6 minuta na centrifugu pri brzini od 300 g i temperaturi 21 °C. Nakon centrifugiranja tekući dio je uklonjen, a na talog je dodano 2 mL medija kako bi se stanice međusobno odvojile i oslobodile komadića tkiva koje je zaostalo. U međuvremenu pripremljen je proliferacijski medij u kojem se stanice uzgajaju. Na 50 mL DMEM medija ide 5 mL fetalnog govedeg seruma (Fetal Bovine Serum, Gibco by life Technologies, 10270106), 500 µL antibiotika i antimikotika (Anti-anti, Gibco by life Technologies, 15240062), 500 µL neesencijalnih aminokiselina (MEM NON-ESSENTIAL AMINO ACID SOLUTION 100X, SIGMA, M7145), 50 µL FGFb (Recombinant Mouse Fibroblast Growth Factor-basic, PMG0035) i 50 µL EGF (Recombinant Mouse Epidermal Growth Factor, PMG8041). Stanice u flaskama od 25cm² (BD Falcon, 353108) uzgajane su u inkubatoru na 37 °C i 5% CO₂.

6.2. Uzgoj i proliferacija matičnih stanica usne šupljine

Izolirane stanice su nakon dva dana uzgoja centrifugirane i pasažirane. Budući da se nalaze u proliferacijskom mediju i intenzivno se dijele, potrebno ih je razdijeliti u nove flaske i pripremiti svježi medij. Stanice su pasažirane samo jednom, te su dva dana nakon pasaže spremne za nasađivanje na podloge.

6.3. Priprema podloga za diferencijaciju stanica

Priprema podloga uključuje pripremu stakala (*engl.* cover slips) promjera 12 mm za diferencijaciju stanica. Stakla su preko noći ostavljena u dušičnoj kiselini, nakon toga su ispirana dva sata sterilnom vodom te su opet preko noći ostavljena u 70% alkoholu. Sljedeći dan su stavljena u sterilizator 12 sati na temperaturi od 250 °C. Na očišćena stakla stavljeno je 400 µL fibronectina (Human Plasma Fibronectin, Gibco by life Technologies, 33016-015) u koncentraciji 10 µg/mL. Otopina fibronectina držana sat vremena na staklima u inkubatoru nakon čega je isprana medijem te su na taj način podloge pripremljene za nasađivanje stanica.

6.4. Diferencijacija stanica

Na prethodno pripremljene podloge stanice su nasađene u proliferacijskom mediju u kojem su uzgajane dva dana. Nakon dva dana stanicama je promijenjen medij kako bi se usmjerile prema ektodermalnoj odnosno mezodermalnoj lozi.

Stanice koje su usmjerene prema ektodermu uzgajane su u mediju (DMEM W/GLUTAMAX-I PYR-IG/L-GLU, Gibco by life Technologies, 21885-108), u koji je dodano: antibiotik (Anti-anti), 10 ng/mL Human β -NGF Gibco by life Technologies, PHG0126), 50 ng/mL BDNF (Gibco by life Technologies, 10908010), N-2 i B-27.

Stanice koje su usmjerene prema mezodermu uzgajane su u mediju (MEM ALPHA W/O RIBOS W/GLUMAX-I, Gibco by life Technologies, 32561-094), antibiotik (Anti-anti), 12% fetalnog goveđeg seruma, 50 µg/mL vitamina C (L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate, Sigma, A8960-5G), 10⁻⁷ dexametazona (Dexamethasone-Water Soluble, Sigma D2915-100MG) i 10mM glicerol-2-fosfat (β Glycerophosphate disodium salt hydrate, Sigma, G9422-50G).

6.5. Fiksacija stanica

Po završetku postupka diferencijacije stanice su fiksirane 4% otopinom paraformaldehida kroz 15 minuta. Nakon toga stanice su isprane tri puta po 5 minuta sa PBS-om (engl. phosphate buffer saline, pH 7,4). Nakon ispiranja stanice su pohranjene u frižideru na +4°C sve do izvođenja imunocitokemije.

6.6. Imunocitokemija

Fiksirane stanice isprane su tri puta po pet minuta PBS-om te im je dodano 500 µL otopine za permeabilizaciju i blokiranje nespecifičnog vezanja sekundarnog protutijela (0,2% triton X-100 (Sigma, T8787-100ML) u PBS-u + 3% kozjeg seruma). Blokiranje sekundarnog protutijela trajalo je 60 minuta, nakon čega je stanicama dodano 85 µL otopine primarnog protutijela (0,2% triton X-100 u PBS-u + 1% kozjeg seruma + primarno protutijelo) te je ostavljeno u frižideru na +4 °C preko noći. Primarna protutijela, podrijetlo, razrjeđenje i proizvođač, upotrijebljena u ovom istraživanju prikazana su u Tablici 2.

Drugi dan su primarna protutijela isprana PBS-om tri puta po pet minuta. Nakon ispiranja primarnih protutijela na stanice je stavljena otopina sekundarnih protutijela (0,2% triton X-100 u PBS-u + sekundarno protutijelo) te su tako stanice inkubirane dva sata na sobnoj temperaturi u zamračenoj prostoriji. Sekundarna protutijela, podrijetlo, razrjeđenje i proizvođač, upotrijebljena u ovom istraživanju prikazana su u Tablici 3. Nakon dva sata, isprana su sekundarna protutijela, također tri puta po pet minuta te je na stanice stavljena fluorescentna boja za jezgre, DAPI u koncentraciji 1:8000. Nakon deset minuta, DAPI je isprana, također tri puta po pet minuta te su stanice poklopljene medijem za fluorescentno poklapanje (Dako Fluorescent Mounting Medium, S3023). Poklopljeni preparati, ostavljeni su u frižideru +4 °C na sušenju do mikroskopiranja na konfokalnom mikroskopu (Zeiss, LSM 510 Meta).

Tablica 2. Primarna protutijela upotrijebljena za imunocitokemiju.

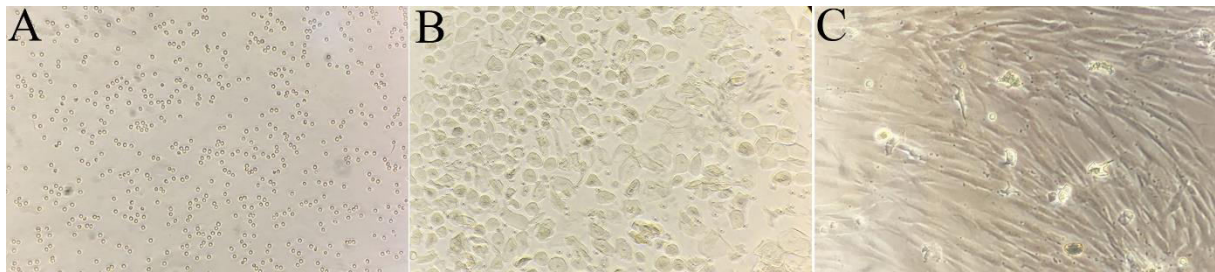
Protutijelo	Podrijetlo	Razrjeđenje	Proizvođač
MAP2	pile	1:1000	Abcam (ab5392)
Oct4	miš	1:200	Cell Signaling (#23064)
Osterix	kunić	1:200	Abcam (ab22552)
Nestin	miš	1:200	Millipore (MAB353)
Sox2	kunić	1:200	Novus Biologicals (NB110-37235)
β 3-tubulin	kunić	1:200	Cell Signaling (D71G9)

Tablica 3. Sekundarna protutijela upotrijebljena za imunohistokemiju i imunocitokemiju.

Protutijelo	Razrjeđenje	Proizvođač
Alexa Fluor 488 koza anti - miš IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A11001)
Alexa Fluor 546 koza anti - pile IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A11040)
Alexa Fluor 546 koza anti - kunić IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A11010)
Alexa Fluor 633 koza anti - kunić IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A21070)

7. REZULTATI

Kako bismo odredili diferencijski potencijal matičnih stanica izoliranih iz sluznice usne šupljine, stanice su stavljene na diferencijaciju u tri različita uvjeta. Stanice su nasadene sa fibronectinom obložene podloge. Prva skupina stanica ostavljena je spontanoj diferencijaciji u mediju bez seruma. Drugoj skupini stanica proliferacijski medij je promijenjen u medij za ektodermalne stanice, a trećoj skupini stanica za mezodermalne stanice. Stanice su takvim uvjetima uzgajane tri tjedna, nakon čega su fiksirane te je na njima napravljena imunocitokemija. Tijekom proliferacije i diferencijacije stanica jasno je vidljivo da se radi o heterogenoj populaciji stanica koja se u različitim uvjetima može usmjeriti prema određenoj vrsti stanica (Slika 2).

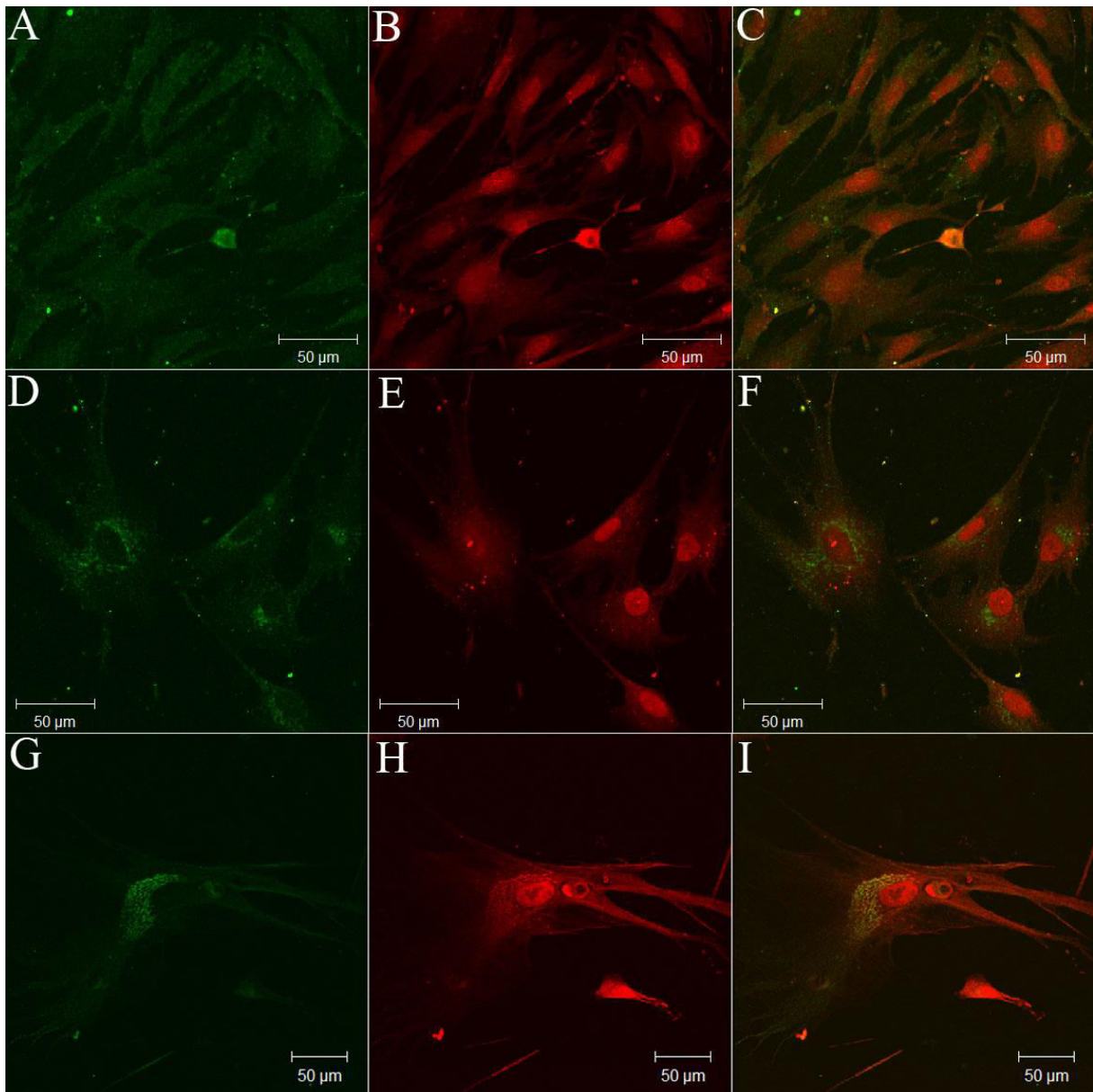


Slika 1. Matične stanice podrijetlom iz sluznice usne šupljine u tri različita stadija diferencijacije. Matične stanice u proliferacijskom mediju (A), matične stanice nakon nasađivanja na podloge za diferencijaciju (B) i stanice nakon tri tjedna diferencijacije. Slikano invertnim mikroskopom, povećanje 20x.

7.1. Spontana diferencijacija stanica

Tijekom spontane diferencijacije, odnosno u mediju bez seruma, stanice su se diferencirale i pozitivne su za biljege matičnih stanica (Oct4, Nestin i SOX2) kao i za biljege neurona (MAP2 i β 3-tubulin). Stanice su Oct4 pozitivne, izražavaju citoplazmatsku pozitivnost ovoga biljega tijekom čitavog razdoblja diferencijacije. Iako su stanice slabo Oct4 pozitivne, u usporedbi s negativnim kontrolama jasno se očituje citoplazmatska pozitivnost (Slika 2A-C). Drugi biljeg matičnih stanica, SOX2 (Slika 2A-C i G-I), također je pozitivan u ovih stanica. Pozitivnost i jačina signala gotovo je identična pozitivnosti u neurona. Iako je ovaj biljeg poznat kao biljeg matičnih stanica, zadržava svoju pozitivnost i u diferenciranih stanica. Zanimljiva je pozitivnost nestina u ovih stanica, iako je citoplazmatski biljeg, u ovih stanica pozitivnost nestina se očituje kao u obliku perinuklearnih granula, dok u ostatku citoplazme takve granule nisu vidljive (Slika 2D-I). Tijekom razdoblja diferencijacije, stanice

su MAP2 pozitivne. Stanice su MAP2 pozitivne u jezgri i znatno manje u citoplazmi (Slika 2 D-F).

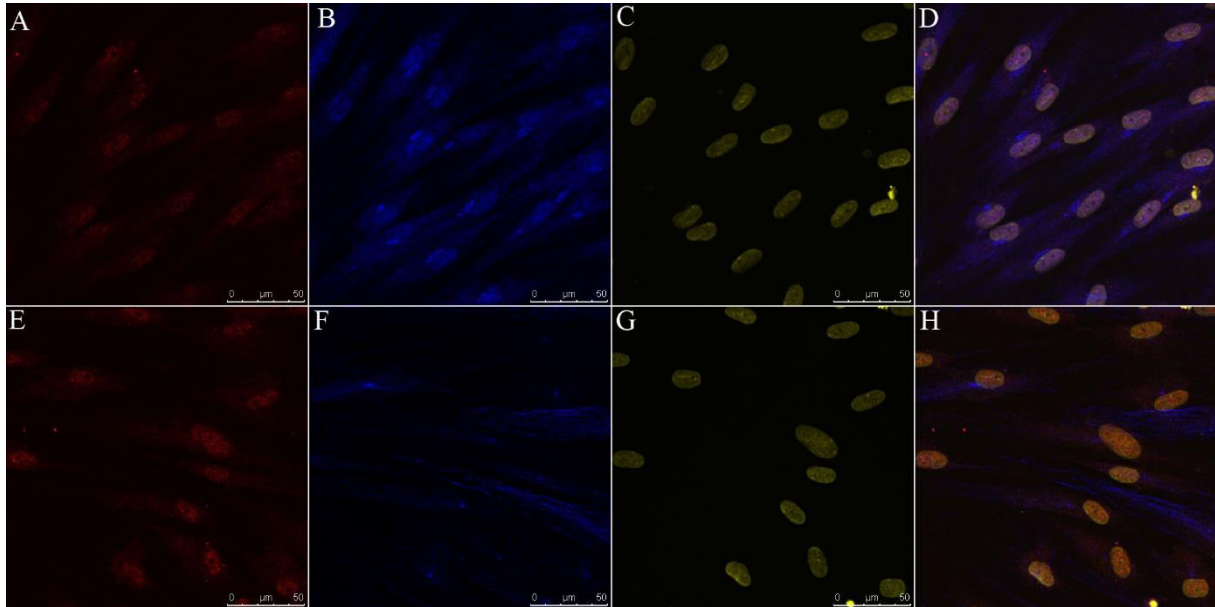


Slika 2. Spontana diferencijacija stanica u *in vitro* uvjetima. Imunobojanje s Oct4 (zeleno) (A) i SOX2 (crveno) (B), te stopljena slika (C). Imunobojanje s nestinom (zeleno) (D), MAP2 (crveno) (E) te stopljena slika (F). Imunobojanje s nestinom (zeleno) (G), SOX2 (crveno) (H) te stopljena slika (I).

7.2. Diferencijacija usmjerena prema ektodermalnim stanicama

Usmjeravanjem stanica prema ektodermalnoj lozi stanica dolazi do nestajanja signala Oct4 u diferenciranim stanicama (nije prikazano). Stanice su MAP2 (Slika 3A) pozitivne, na istoj razini i intenzitetu kao i stanice na spontanoj diferencijaciji. Zanimljivo je da β 3-tubulin

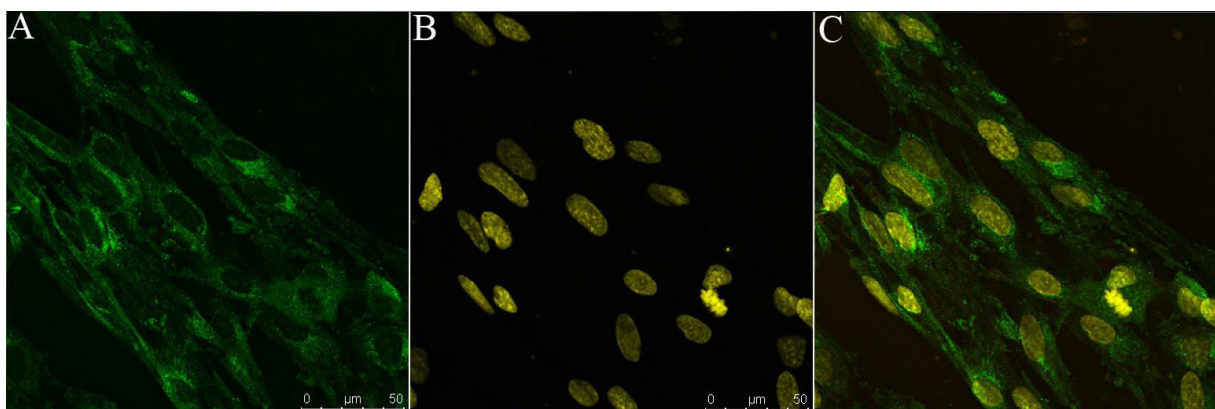
(Slika 3F), koji je citoplazmatski biljeg neurona, slično kao MAP2, ne boji jezgre već samo citoplazmu. SOX2 (Slika 3 B i E) je također jako pozitivan i nema razlike u odnosu na spontano diferencirane stanice.



Slika 3. Diferencijacija stanica prema ektodermalnoj lozi. Imunobojanje s MAP2 (A), SOX2 (B), DAPI (C) i stopljeno (D). Imunobojanje sa SOX2 (E), β 3-tubulinom (F), DAPI (G) i stopljeno (H).

7.3. Diferencijacija usmjerena prema mezodermalnim stanicama

Osim prema mezodermu, ove stanice se diferenciraju i izražavaju biljege karakteristične za stanice mezodermalne loze. U ovom istraživanju stanice izražavaju citoplazmatsku pozitivnost na Osterix (Slika 4A-C) koji je važan transkripcijski čimbenik u diferencijaciji osteoblasta. Osim ovog biljega stanice su bojane na kolagen 1 i CD44, ali na njih nisu bile pozitivne (nije prikazano).



Slika 4. Diferencijacija stanica prema mezodermalnoj lozi. Imunobojanje s Osterix (A), DAPI (B) i stopljena slika (C).

8. RASPRAVA

Većina tkiva usne šupljine, uključujući zubnu pulpu, parodontalni ligament, sluznicu obraza i gingivu, sadrži tkivno specifične matične stanice koje se mogu samoobnavljati te posjeduju multidiferencijacijski potencijal (Zhang i sur., 2009; Fournier i sur., 2010; Fournier i sur., 2013). Matične stanice sluznice usne šupljine (hOMSC) predstavljaju novu populaciju matičnih stanica jedinstvenih karakteristika. Izražaj biljega poput Slug, Snail, Sox10 i Twist upućuje na to da te stanice potječu od neuralnog grebena, što ih značajno razlikuje od mezenhimskih stanica koštane srži (BMMSCs) (Davies i sur., 2010; Marynka-Kalmani i sur., 2010). Također, istraživanje Davies i sur. (2012) po prvi puta pokazuje da se imunomodulacijske uloge ovih stanica odvijaju o dozi i HLA-II negativnom mehanizmu putem lučenja imunosupresivnih topivih čimbenika, što nije karakteristika mezenhimskih matičnih stanica, a to bi pak moglo imati značajnu ulogu u terapijskoj primjeni.

Jedan od ciljeva ovog istraživanja jest odrediti diferencijacijski potencijal matičnih stanica sluznice usne šupljine te dokazati kako se one mogu diferencirati prema ektodermalnoj i mezodermalnoj staničnoj lozi, što smo u konačnici i uspjeli dokazati. Tijekom spontane diferencijacije, bez govedeg seruma, stanice su bile pozitivne na biljege matičnih stanica (Oct4, Nestin i Sox2) kao i na biljege neurona (MAP2 i β 3-tubulin). Osim tijekom spontane diferencijacije, stanice su pozitivne na iste biljege neurona i tijekom diferencijacije u mediju usmjerenom prema ektodermalnoj lozi stanica što je u skladu s ranije provedenim istraživanjima (Marynka-Kalmani i sur., 2010).

Budući da matične stanice sluznice usne šupljine uglavnom proizlaze iz matičnih stanica neuralnog grebena, neke od njih poboljšavale su obnovu neruona u životinja nakon što su implantirane u oštećeno mjesto središnjeg živčanog sustava (Yang i sur., 2009; Yamagata i sur., 2013). Cho i sur., 2014 su dokazali da transplantacija matičnih stanica sluznice usne šupljine poboljšava simptome neurogenog mokraćnog mjehura inducirano ozljedom kralježnične moždine tako što te stanice inhibiraju apoptozu i potiču staničnu proliferaciju. Osim toga, provedeno je istraživanje u kojem su Ganz i sur. (2014) po prvi puta dokazali da se diferencijacijom matičnih stanica sluznice usne šupljine mogu dobiti stanice nalik astrocitima koje imaju jake neuroprotektivne sposobnosti te su se tako hOMSC pojavile kao nova populacija matičnih stanica za autolognu terapiju ozljeda perifernog živčanog sustava i moguće drugih neuropatija.

Nadalje, već su ranija istraživanja (Graziano i sur., 2008; Chadipiralla i sur., 2010; Mori i sur., 2011; Yamada i sur., 2011) pokazala kako su se mezenhimske matične stanice usne šupljine pod specifičnim *in vitro* uvjetima sposobne diferencirati u hondroblaste i osteoblaste. U ovom istraživanju diferencijacija matičnih stanica sluznice usne šupljine prema mezodermalnoj lozi, nakon što su tretirane deksametazonom kao induktorom diferencijacije prema mezodermu, pokazala da su ove stanice pozitivne na Osterix koji predstavlja važan transkripcijski čimbenik u diferencijaciji osteoblasta što bi moglo imati važnu ulogu u liječenju bolesti skeletnog sustava. Istraživanje Marynke-Kalmani i sur. (2010) pokazalo je da su te stanice uz Osterix, bile pozitivne i na druge biljege osteogene diferencijacije, uključujući Runx2, kolagen tipa 1 i ALP. Od navedenih, u ovom istraživanju korišten je kolagen 1 za kojeg je poznato da se nalazi u međustaničnoj tvari, ali ove stanice tijekom tri tjedna diferencijacije usmjerene prema mezodermalnoj lozi nisu bile pozitivne za ova biljeg. Osim osteogene diferencijacije, Marynka-Kalmani i sur. (2010) su dokazali sposobnost diferencijacije hOMSC prema adipocitima i hondrocitima.

Osim prema ektodermu i mezodermu opisana je i sposobnost diferencijacije prema stanicama endodermalne loze pri čemu su ove stanice pozitivne na biljege Foxa2, Sox17 i CXCR4 koje su opisali Marynka-Kalmani i sur. (2010), što nije rađeno u ovom istraživanju.

Na temelju svega prikazanoga očita je velika heterogenost ove populacije matičnih stanica. Budući da je opisana njihova multipotentnost, odnosno sposobnost diferencijacije prema stanicama sva tri zametna listića (ektoderm, mezoderm i endoderm) ove stanice predstavljaju vrlo zanimljivu i lako dostupnu populaciju stanica za različita istraživanja. Osim za *in vitro* istraživanja, ove stanice mogu se koristiti i u brojnim transplantacijskim istraživanjima te se uz razmjerno jednostavnu manipulaciju mogu izolirati iz pacijenta i vratiti nakon usmjeravanja prema određenoj populaciji stanica u oštećeno tkivo pacijenta. Velika prednost ovih stanica je da ne podliježu etičkim pitanjima i dilemama, pa se istraživanja mogu nastaviti bez tih prepreka.

Dosadašnja istraživanja Laboratorija za matične stanice baziraju na terapiji živčanim matičnim stanicama bolesti kao što su ALS i moždani udar na animalnim modelima. Budući da su ove stanice ektodermalnog podrijetla i da se jednostavno mogu usmjeriti prema ektodermu predstavljaju interesantnu populaciju stanica u terapiji bolesti živčanog sustava, te će se koristiti u budućim istraživanjima.

9. ZAKLJUČCI

1. Matične stanice izolirane iz sluznice usne šupljine su heterogena skupina stanica koja se različitim uvjetima uzgoja može usmjeriti u različite vrste stanica.
2. Stanice u spontanoj diferencijaciji kako i stanice usmjerene prema ektodermalnoj lozi stanica, izražavaju biljege karakteristične za neurone. Zahvaljujući ovom nalazu stanice podrijetlom iz sluznice usne šupljine mogle bi se upotrijebiti u liječenju bolesti živčanog sustava.
3. Matične stanice tijekom diferencijacije prema mezodermalnoj lozi stanica, pozitivne su na Osterix, neophodan transkripcijski čimbenik u diferencijaciji osteoblasta, što upućuje na mogućnost upotrebe u liječenju bolesti skeletnog sustava.

10. ZAHVALE

Zahvaljujem se svojoj obitelji na iznimnoj potpori, razumijevanju i savjetima koje su mi pružili tijekom cijelog školovanja. Zahvaljujem se svim profesorima koji su dali doprinos mom znanju i vještinama te posebno svom mentoru, doc. dr. sc. Dinku Mitrečiću te dr. sc. Ivanu Aliću, na suradnji, strpljivosti i volji u pisanju mog diplomskog rada.

11. POPIS LITERATURE

1. Barrett AW, Selvarajah S, Franey S, et al. Interspecies variations in oral epithelial cytokeratin expression. *J Anat.* 1998;193 Pt 2:185–193.
2. Board-Davies E, Moses R, Sloan A, Stephens P, Davies LC. Oral mucosal Lamina Propria-Progenitor Cells Exert Antibacterial Properties via the Secretion of Osteoprotegerin and Haptoglobin. *Stem Cells Transl Med.* 2015 Nov 4 (11):1283-1293.
3. Bueno DF, Sunaga DY, Kobayashi GS, Aguená M, Raposo-Amaral CE, Masotti C, et al. Human stem cell cultures from cleft lip/palate patients show enrichment of transcripts involved in extracellular matrix modeling by comparison to controls. *Stem Cell Rev.* 2011;7:446–57.
4. Burillon C, Huot L, Justin V, et al. Cultured autologous oral mucosal epithelial cell sheet (CAOMECS) transplantation for the treatment of corneal limbal epithelial stem cell deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(3):1325–1331.
5. Chadipiralla K, Yochim JM, Bahuleyan B, et al. Osteogenic differentiation of stem cells derived from human periodontal ligaments and pulp of human exfoliated deciduous teeth. *Cell Tissue Res.* 2010;340(2):323–333.
6. Cho YS, Ko IG, Kim SE, Lee SM, Shin MS, Kim CJ, Kim SH, Jin JJ, Kim KH. Oral mucosa stem cells alleviates spinal cord injury-induced neurogenic bladder symptoms in rats. *J Biomed Sci.* 2014 May 13;21:43. doi: 10.1186/1423-0127-21-43.
7. d’Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, et al. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ.* 2007;14(6):1162–1171.
8. d’Aquino R, De Rosa A, Lanza V, et al. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cell Mater.* 2009;18:75–83.
9. Davies LC, Locke M, Webb RD, Roberts JT, Langley M, Thomas DW, Archer CW, Stephens P. A multipotent neural crest-derived progenitor cell population is resident within oral mucosa lamina propria. *Stem Cell Dev.* 2010 Jun;19(6):819-30
10. Davies LC, Lönnies H, Locke M, Sundberg B, Rosendahl K, Götherström C, Le Blanc K, Stephens P. Oral Mucosal Progenitor Cells Are Potently Immunosuppressive in a Dose-Independent Manner. *Stem Cells Dev.* 2012 Jun 10; 21(9): 1478–1487.
11. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol.* 2000 Aug; 28(8):875-84
12. De Miguel MP, Fuentes-Julian S, Blazquez-Martinez A, Pascual CY, Aller MA, Arias J, et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med* 2012;12(5):574-92
13. DiPietro AL. Oral Stem Cells: The Fountain of Youth for Epithelialization and Wound Therapy? *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2014 Jul 1; 3(7): 465–467.
14. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315–317.
15. Egusa H, Okita K, Kayashima H, Yu G, Fukuyasu S, Saeky M, et al. Gingival fibroblasts as a promising source of induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 2010;5(9):e12743
16. Fournier BP, Ferre FC, Couty L, Lataillade JJ, Gourven M, Naveau A, Coulomb B, Lafont A, Gogly B (2010) Multipotent progenitor cells in gingival connective tissue. *Tissue Eng Part A* 16: 2891-2899.

17. Fournier BP, Larjava H, Häkkinen L (2013) Gingiva as a source of stem cells with therapeutic potential. *Stem Cells Dev* 22: 3157-3177.
18. Ganz J, Arie I, Ben-Zur T, Dadon-Nachum M, Pour S, Araidy S, Pitaru S, Offen D. Astrocyte-like cells derived from human oral mucosa stem cells provide neuroprotection in vitro and in vivo. *Stem Cells Transl Med*. 2014 Mar;3(3):375-86. doi: 10.5966/sctm.2013-0074. Epub 2014 Jan 29.
19. Govindasamy V, Ronald VS, Abdullah AN, et al. Differentiation of dental pulp stem cells into islet-like aggregates. *J Dent Res*. 2011;90(5):646–652.
20. Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev*. 2008;4(1):21–26.
21. Hallock G. Wound healing in the oral mucosa without scar and no inflammation. *Plastic Reconstruct Surg* 1985; 75: 785–788.
22. Huang GT., Gronthos S., and Shi S.: Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dental Res* 2009; 88:792
23. Ishkitiev N, Calenic B, Aoyama I, Ii H, Yaegaki K, Imai T. Hydrogen sulfide increases hepatic differentiation in tooth-pulp stem cells. *J Breath Res*. 2012;6(1):017103.
24. Ishkitiev N, Yaegaki K, Calenic B, et al. Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional features in vitro. *J Endod*. 2010;36(3):469–474.
25. Janebodin K, Reyes M. Neural crest-derived dental pulp stem cells function as ectomesenchyme to support salivary gland tissue formation. *Dentistry S13*: 001. doi: 10.4172/2161-1122S13-001.
26. Johnston MC, Bronsky PT. Prenatal craniofacial development: new insights on normal and abnormal mechanisms. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1995;6 4:368–422.
27. Jones B Kyle, Klein D Ophir. Oral epithelial stem cells in tissue maintenance and disease: the first steps in a long journey. *Int J Oral Sci*. 2013 Sep; 5(3): 121–129. doi: 10.1038/ijos.2013.46
28. Kerkis I, Caplan AI. Stem cells in dental pulp deciduous teeth. *Tissue Eng Part B Rev* 2012;18(2):129-38
29. Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, Majumdar MK, Beggs KJ, Simonetti DW, et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci* 2005;12(1):47-57
30. Kotobuki N, Hirose M, Funaoka H, Ohgushi H. Enhancement of in vitro osteoblastic potential after selective sorting of osteoblasts with high alkaline phosphatase activity from human osteoblast-like cells. *Cell Transplant*. 2004;13:377–383.
31. Larjava H, Wiebe C, GallanBehm C, Hart DA, Heino J, Hakkinen L. Exploring scarless healing of oral soft tissues. *J Can Dent Assoc* 2011;77:b18.
32. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2003;31:890–896.
33. Luria EA, Panasyuk AF, Friedensteyn AY. (1971). Fibroblast colony formation from monolayer cultures of blood cells. *Transfusion* 11:345-349.
34. Mao JJ, Prockop DJ. Stem cells in the face: tooth regeneration and beyond. *Cell Stem Cell*. 2012;11(3):291–301.
35. Marynka-Kalmani K., Treves S., Yafee M., Rachima H., Gafni Y., Cohen MA., and Pitaru S.: The lamina propria of adult human oral mucosa harbors a novel stem cell population. *Stem Cells* 2010; 28:984.

36. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:5807-5812. doi: 10.1073/pnas.0937635100
37. Miyoshi K, Tsuji D, Kudoh K, Satomura K, Muto T, Itoh K, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from oral mucosa. *J Biosci Bioeng* 2010;110(3):345-50
38. Mori G, Brunetti G, Oranger A, et al. Dental pulp stem cells: osteogenic differentiation and gene expression. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1237:47–52.
39. Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, et al. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13: pp. 1071–82, 1994.
40. Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. (2011). The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:126-131.
41. Nomura Y, Ishikawa M, Yashiro Sanggarnjanavanich S, Yamaguchi T, Arai C, et al. Human periodontal ligament fibroblasts are the optimal cell source for induced pluripotent stem cells. *Histochem Cell Biol* 2012;137(6):719-32
42. Potdar PD, Lotey NK (2014) Stem Cells – A Promise to Elixir. *Enliven:J Stem Cells Regen Med* 1(1):003.
43. Rothova M, Thompson H, Lickert H, et al. Lineage tracing of the endoderm during oral development. *Dev Dyn.* 2012;241 7:1183–1191.
44. Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells* 2010 Mar 31;28(3):585-596.
45. Smith, A.G., 2001. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 435-462.
46. Stephens P, Genever P. Non-epithelial oral mucosal progenitor cell populations. *Oral Diseases* (2007) 13, 1–10. doi:10.1111/j.1601-0825.2006.01314.x
47. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126(4):663-76
48. Tamaoki N, Takahashi K, Tanaka T, Ichisaka T, Aoki H, Takeda-Kawaguchi T, et al. Dental pulp cells for induced pluripotent stem cell banking. *J Dent Res* 2010;89(8):773-8.
49. Tang L, Li N, Xie H, Jin Y. (2011). Characterization of mesenchymal stem cells from human normal and hyperplastic gingiva. *J Cell Physiol* 226:832-842.
50. Tomar GB, Srivastava RK, Gupta N, Barhanpurkar AP, Pote ST, Jhaveri HM, et al. (2010). Human gingiva-derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine. *Biochem Biophys Res Commun* 393:377-383.
51. Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I. Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell.* 1993;75(1):45–58.
52. Vishwakarma A, Sharpe P, Shi S, Ramalingam M (2015). *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*. London: Elsevier Inc.
53. Wada N, Wang B, Lin NH, Laslett AL, Gronthos S, Bartold PM. Induced pluripotent stem cell lines derived from human gingival fibroblast and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res* 2011;46(4):438-47
54. Wang F, Yu M, Yan X, Wen Y, Zeng Q, Yue W, et al. (2011). Gingiva-derived mesenchymal stem cell-mediated therapeutic approach for bone tissue regeneration. *Stem Cells Dev* 20:2093-2102.

55. Weissman, I.L., Anderson, D.J., Gage, F., 2001. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 387-403.
56. Weissman, I.L., 2000. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100, 157-168.
57. Widera D, Zander C, Heidbreder M, Kasperek Y, Noll T, Seitz O, et al. Adult palatum as a novel source of neural crest-related stem cells. *Stem Cells* 2009;27(8):1899–910.
58. Winning TA, Townsend GC. Oral mucosal embryology and histology. *Clin Dermatol.* 2000;18 5:499–511.
59. Wu SM, Chiu HC, Chin YT, Lin HY, Chiang CY, Tu HP, et al. Effects of enamel matrix derivative on the proliferation and osteogenic differentiation of human gingival mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2014;5:52.
60. Xiao L, Nasu M. From regenerative dentistry to regenerative medicine: progress, challenges, and potential applications of oral stem cells. *Stem Cells Cloning.* 2014; 7: 89–99. doi: 10.2147/SCCAA.S51009
61. Yamada Y, Ito K, Nakamura S, Ueda M, Nagasaka T. Promising cell-based therapy for bone regeneration using stem cells from deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow. *Cell Transplant.*2011;20(7):1003–1013.
62. Yamagata M, Yamamoto A, Kako E, et al. Human dental pulp-derived stem cells protect against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice. *Stroke.* 2013;44(2):551–554.
63. Yan X, Qin H, Qu C, Tuan RS, Shi S, Huang GT. iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin. *Stem Cells Dev* 2010;19(4):469–80.
64. Yang R, Chen M, Lee CH, Yoon R, Lal S, Mao JJ. Clones of ectopic stem cells in the regeneration of muscle defects in vivo. *PLoS One.* 2010;5(10):e13547.
65. Yang KL, Chen MF, Liao CH, Pang CY, Lin PY. A simple and efficient method for generating Nurr1-positive neuronal stem cells from human wisdom teeth (tNSC) and the potential of tNSC for stroke therapy. *Cytotherapy.* 2009;11(5):606–617.
66. Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, et al. (2009). Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol* 183:7787-7798.
67. Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, Le AD (2009) Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol* 183: 7787-7798.
68. Zou XY, Yang HY, Yu Z, Tan XB, Yan X, Huang GT. Establishment of transgene-free induced pluripotent stem cells reprogrammed from human stem cells of apical papilla for neural differentiation. *Stem Cell Res Ther* 2012;3(5):43.

12. ŽIVOTOPIS

Filip Keršić rođen je 27.03.1992. godine u Splitu te je do svoje 18-te godine živio na Hvaru sa roditeljima i bratom. Na Hvaru pohađa i završava Osnovnu školu Jelsa, te upisuje Opću gimnaziju u Jelsi 2006. godine, koju uspješno završava 2010. godine. Iste godine upisuje Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci koji pohađa do 2012. godine, kada se prebacuje na Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Aktivno se služi engleskim i nizozemskim, dok pasivno talijanskim i njemačkim jezikom.