

# Utjecaj hipoksije na matične stanice oralne sluznice

---

Petrović, Dražen Juraj

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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/um:nbn:hr:105:189542>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2021-06-21**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Dražen Juraj Petrović**

**Utjecaj hipoksije na matične stanice oralne  
sluznice**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2019.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof.dr.sc. Dinka Mitrečića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2018./2019.

Mentor rada: prof.dr.sc. Dinko Mitrečić

## Popis i objašnjenje kratica:

- CFE - *Colony forming efficiency* (sposobnost formiranja kolonija)
- CNF - *Ciliary neurotrophic factor* (Cilijarni neurotrofični faktor)
- COMECS - *Cultivated oral mucosal epithelial cell sheets* (kultivirane epitelne stanice oralne sluznice)
- CPD - *Complete population doublings* (totalno stanično udvostručenje)
- DM I - dijabetes melitus tip 1
- ESC - *Embryonic stem cells* (embrionalne matične stanice)
- HIF-1 $\alpha$  - hipoksijom induciran faktor-1 $\alpha$  (*Hypoxia induced factor 1 $\alpha$* )
- hOMF - *human oral mucosal fibroblasts* (ljudski fibroblasti oralne sluznice)
- hOMSC - *Human oral mucosa stem cells* (matične stanice ljudske oralne sluznice)
- ISCT - *The International Society for Cellular Therapy*
- ICM - *Inner cell mass* (unutarnja stanična masa)
- JEB - *Junctional epidermolysis bullosa*
- MMP1 - *Matrix metalloproteinase 1*
- MMP3 - *Matrix metalloproteinase 3*
- MSC - *Mesenchymal Stem/Stromal Cells* (Mezenhimske matične stanice)
- mTOR - *Mammalian target of rapamycin* (ciljna molekula rapamicina u sisavaca)
- NCC - *neural crest cells*
- NICD - *Notch intracellular domain* (Notch unutarstanična domena)
- NK stanice - *Natural killer cell* (stanica prirodna ubojica)
- OMLP - *Oral mucosa lamina propria* (lamina proprija oralne sluznice)
- OSR - *Ocular surface reconstruction* (Rekonstrukcija površine oka)
- PC - *Progenitors cells* (progenitorske stanice)
- PD - *population doubling* (udvostručenje populacije)
- PDGFR $\alpha$  - *platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$*  (faktor rasta dobiven iz trombocita alfa)
- Q-TRAP - *Quantitative telomeric amplification protocol* (protokol kvantitativnog telomernog ponavljanja)
- rMSC - *rat mesenchymal stem cells* (mezenhimalne matične stanice štakora)
- ROS - *Reactive oxygen species* (reaktivni kisikovi spojevi)
- RT-PCR - *Real time polymerase chain reaction* (reakcija lančane polimeraze u stvarnom vremenu)

## TABLICA SADRŽAJA

SAŽETAK

SUMMARY

1. UVOD .....	1
1.1. Histologija usne šupljine.....	1
1.2. Neuralni greben.....	1
1.3. Matične stanice.....	2
1.3.1. Pojmovi vezani uz matičnost.....	2
1.3.2. Podjela i raznolikost matičnih stanica.....	2
1.3.3. Matične stanice epidermisa i oralne sluznice.....	3
1.3.4. Biljezi matičnih stanica.....	4
1.3.4.1. Biljezi progenitorskih stanica.....	5
1.3.5. Terapijske primjene matičnih stanica.....	7
1.4. Hipoksija.....	9
2. HIPOTEZA.....	11
3. CILJEVI RADA.....	12
4. MATERIJALI I METODE .....	13
4.1. Izolacija matičnih stanica sluznice usne šupljine.....	13
4.2. Fiksacija stanica.....	14
4.3. Imunocitokemija.....	14
4.4. Hipoksija i deprivacija glukoze.....	15
5. REZULTATI.....	16
5.1. Postupak izolacije je doveo do uspješno dobivene populacije oralnih matičnih stanica.....	16
5.2. Matične stanice oralne sluznice izražavaju biljege OCT4, Sox2 i nestin.....	17
5.3. Hipoksija djeluje na izražaj biljega OCT4, Sox2 i nestin u populaciji oralnih matičnih stanica.....	19

6. RASPRAVA.....	21
7. ZAKLJUČCI.....	24
8. ZAHVALE.....	25
9. POPIS LITERATURE.....	26
10. ŽIVOTOPIS.....	35

## **SAŽETAK**

### **Utjecaj hipoksije na matične stanice oralne sluznice**

Dražen Juraj Petrović

Iako je klinička praksa pokazala kako opsežne ozljede oralne sluznice često zaraštavaju bez ožiljka, čak i kada zahvaćaju bazalnu laminu, razlog ove pojave nije dugo bio objašnjen. Jedan od osnovnih uzroka brze obnove bi mogla biti nedavno otkrivena populacija visoko potentnih matičnih stanica sluznice usne šupljine. Ove multipotentne stanice pokazale su veliki potencijal diferencijacije u brojna tkiva, što predstavlja značajnu osnovu za potencijalnu terapijsku primjenu. Njihovo podrijetlo iz neuralnog grebena čini ih etički vrlo prihvatljivim izvorom za matične stanice koje se mogu diferencirati u neurone. Cilj ovoga istraživanja bio je odrediti utjecaj hipoksije na matične stanice oralne sluznice. Pokazali smo kako stanice izražavaju biljege matičnosti, a izlaganje ovih stanica hipoksiji rezultiralo je smanjenom aktivnosti biljega OCT4 i Sox2. U atmosferskom kisiku nestin je bio distribuiran u citoplazmi i jezgri stanice, no prilikom hipoksije nestin pokazuje tendenciju redistribucije u jezgru.

Ključne riječi: matične stanice oralne sluznice, diferencijacija, neuralni greben, hipoksija, oksidativni stres

## **SUMMARY**

### **Influence of hypoxia on oral mucosa stem cells**

Dražen Juraj Petrović

Although clinical practice has shown that extensive oral mucosal injury often heals without scarring, even when the basal lamina is affected, the cause of this phenomenon has not been well documented. The main cause of this rapid recovery is today considered to be the existence of a recently discovered population of highly potent stem cells of the oral cavity. These multipotent cells have shown a huge potential for differentiation into numerous tissues, offering significant therapeutic potential. Their neural crest origin makes them an ethically acceptable source for stem cells that can be differentiated into neurons. The aim of this study was to determine the effect of hypoxia on stem cells of the oral mucosa. We have shown that cells express stemness markers, however, exposure of these cells to hypoxia resulted in reduced expression of OCT4 and Sox2 markers. In the atmospheric oxygen nestin was distributed in the cytoplasm and the nucleus of the cell, yet in hypoxia nestin shows tendency to redistribute in the nucleus.

Key words: oral mucosa stem cells, differentiation, neural crest, hypoxia, oxidative stress



# 1. UVOD

## 1.1. Histologija usne šupljine

Usna šupljina je obložena mnogoslojnim pločastim epitelom, koji je uglavnom neurožen, iako može biti djelomično orožen, ovisno o lokaciji (1). Poput stanica epidermisa, pločaste stanice površinskog sloja oralne sluznice se stalno ljušte i gube s površine. Za razliku od epidermisa, odljuštene stanice oralne sluznice zadržavaju svoju jezgru. Oroženi stanični slojevi otporni su na mehanička oštećenja i najbolje su razvijeni u žvačnoj sluznici gingive (desni) i na tvrdom nepcu. *Lamina propria* u ovim područjima leži izravno na periostu podležće kosti. Neuroženi pločasti epitel prevladava u sluznici koja oblaže meko nepce, obraz, dno usta i ždrijelo, testražnje područje usne šupljine koja vodi do jednjaka (1). Istraživanja su ukazala na prisutnost multipotentnih praroditeljskih (progenitor) stanica u vezivnom tkivu desni (2). Ovakve multipotentne stanice imaju sposobnost diferencijacije u osteoblaste, hondrocite i adipocite (2,3).

## 1.2. Neuralni greben

Neuralni greben razvija se prilikom neurulacije zametka kada se neuralni nabori izdižu i zatvaraju neuralnu cijev. Neposredno prije zatvaranja neuralne cijevi, sa ovoga ruba odvaja se posebna skupina stanica nazvanih stanice neuralnog grebena (*NCC - neural crest cells*). Prilikom aktivne migracije u podležći mezoderm, ove stanice prolaze kroz epitelno-mezenhimsku tranziciju. Zatvaranjem neuralne cijevi, stanice neuralnog grebena iz područja trupa migriraju u dva smjera: 1. dorzalni put kroz dermis, gdje ulaze u ektoderm i diferenciraju se u melanocite kože i folikula dlake; te 2. ventralni put kroz prednju polovicu svakog somita nakon čega se diferenciraju u osjetne ganglije, simpatičke i crijevne neurone, Schwannove stanice i stanice srži nadbubrežne žlijezde. Stanice neuralnog grebena migriraju iz kranijalnog djela zametka neposredno prije zatvaranja neuralne cijevi. Ove stanice doprinose razvoju kraniofacijalnog kostura, a iz njih se razvijaju i neuroni za kranijalne ganglije, glija stanice, melanocite, keratinocite oralne mukoze, podležće fibroblaste i brojne druge stanice (4,5).

## 1.3. Matične stanice

### 1.3.1. Pojmovi vezani uz matičnost

**Totipotencija** (lat. *totipotencia* - sposobnost za sve [stvari]) je sposobnost jedne stanice da se dijeli i stvori sve diferencirane stanice u organizmu. Zigota, oplođena jajna stanica, predstavlja totipotentnu stanicu iz koje se može razviti cijeli organizam. Kako se razvoj odvija, stanice ranog embrija umnožavaju se i diferenciraju u prve dvije linije, pluripotentnu unutarnju staničnu masu i trofoektoderm (6). **Pluripotencija** (lat. *pluripotencia* - sposobnost za mnogo [stvari]) odnosi se na matičnu stanicu koja ima potencijal diferencirati se u bilo koji od tri zametna listića. **Multipotencija** opisuje **progenitorske stanice (PC)** koje imaju potencijal aktivacije gena za diferencijaciju u specifične tipove stanica. Inducirana pluripotencija je umjetno postignut proces kojime se diferencirana stanica dediferencira u pluripotentnu stanicu za što su Yamanaka i Gurdon 2012. dobili Nobelovu nagradu (7).

### 1.3.2. Podjela i raznolikost matičnih stanica

Matične stanice su stanice koje se mogu diferencirati u druge tipove stanica. Imaju sposobnost samoobnavljanja, proces kojim se matična stanica dijeli kako bi proizvela više matičnih stanica (8). U sisavaca postoje dvije vrste matičnih stanica: embrionalne matične stanice, koje su izolirane iz unutarnje stanične mase blastocista u ranom embrionalnom razvoju i odrasle matične stanice, koje se nalaze u različitim tkivima potpuno razvijenih sisavaca.

**Embrionalne matične stanice (ES)** su stanice koje imaju sposobnost neograničenog rasta odnosno stanične diobe i sposobnost diferencijacije u stanice svih triju zametnih listića. Mogu se izolirati iz unutarnje stanične mase (ICM - *Inner cell mass*) odnosno embrioblasta blastociste sisavaca (9,10).

Postoje brojne vrste odraslih matičnih stanica:

- Hematopoetske matične stanice iz kojih se razvijaju: crvene krvne stanice, B limfociti, T limfociti, prirodne stanice ubojice (NK stanice), neutrofili, bazofili, eozinofili, monociti i makrofazi (11).

- Neuralne (živčane) matične stanice u mozgu kao progenitori za tri glavne vrste stanica: živčane stanice (neurone) i dvije kategorije ne-neuronskih stanica - astrocite i oligodendrocite (11).
- Epitelne matične stanice u sluznici probavnog trakta, prisutne su u dnu Lieberkühnovih kripti i stanice su progenitori iz kojih se razvijaju tri vrste diferenciranih epitelnih stanica: apsorpcijski enterociti, vrčaste stanice koje izlučuju sluz i enteroendokrine stanice koje luče hormone (12).
- Matične stanice dojke pružaju izvor stanica za rast mliječne žlijezde tijekom puberteta i trudnoće i igraju važnu ulogu u karcinogenezi dojke (13).
- Matične stanice kože nalaze se u bazalnom sloju epidermisa i na dnu folikula kose. Epidermalne matične stanice izvor su za diobu keratinocita, koji migriraju na površinu kože i tvore zaštitni sloj. Iz folikularnih matičnih stanica mogu se razviti i folikul dlake i epidermis (11).
- Mezenhimske matične stanice prisutne u mnogim tkivima. U koštanoj srži prisutna su dva tipa stanica: stromalne matične stanice koštane srži i skeletne matične stanice. Iz tih progenitorskih stanica razvijaju se koštane stanice (osteoblasti i osteociti), stanice hrskavice (ondrociti), masne stanice (adipociti) i stanice strome koje podržavaju razvoj ostalih krvnih stanica.

### 1.3.3. Matične stanice epidermisa i oralne sluznice

Matične stanice epidermisa se nalaze u bazalnom sloju. U normalnim uvjetima bazalni sloj epidermisa sadrži 1-10% matičnih keratinocita, 50% tranzitornih stanica (TA - *transit amplifying*) i 40% postmitotički diferencirajućih stanica u ranoj fazi keratinizacije. Orožnjavanje ili keratinizacija je proces odvajanja bazalnih stanica od bazalne lamine nakon čega slijedi njihova migracija prema površini epidermisa (14). A. Webb i suradnici razvili su metodu kojom se pomoću protočne citometrije mogu razdvojiti i razlikovati matične stanice kože od tranzitornih potpuno diferenciranih keratinocita. Kako bi razlikovali te stanice su koristili protutijela usmjerena na markere stanične membrane integrina  $\alpha 6$  i receptora transferina (CD71) (15). Pomoću ovoga saznanja B. Calenic i suradnici ukazali su na prisutnost navedenih markera i u bazalnom sloju oralne sluznice pomoću tehnologije magnetskih mikročestica (16).

### 1.3.4. Biljezi matičnih stanica

Multipotentne mezenhimske stromalne stanice (MSC) privukle su veliki interes istraživača u brojnim biomedicinskim područjima. Međutim, istraživači objavljuju studije MSC-a koristeći različite metode izolacije i ekspanzije, te različite pristupe karakteriziranju stanica. Stoga je sve teže uspoređivati ishode studija, što ometa napredak na ovom području. S ciljem rješavanja ovakvog problema, Odbor mezenhimskih i tkivnih matičnih stanica Međunarodnog društva za staničnu terapiju (*International Society for Cellular Therapy - ISCT*) 2006. godine predložio je minimalne kriterije za definiranje ljudskih MSC. Prvo, MSC mora biti adherirana na plastičnu podlogu kada se održava u standardnim uvjetima kulture. Drugo, MSC mora izražavati površinske molekule CD73, CD90 i CD105, a ne smije izražavati CD45, CD34, CD14 ili CD11b, CD79a ili CD19 i HLA-DR. Treće, MSC se mora moći diferencirati u osteoblaste, adipocite i hondroblaste *in vitro* (17).

Fibroblasti i MSC se ne mogu razlikovati na temelju morfologije, biljega površine stanice, potencijala diferencijacije ili imunomodulatornih svojstava. R.A. Denu i suradnici testirali su fibroblaste koji su bili pozitivni na CD73, CD90 i CD105, a negativni na CD14, CD34, CD45, CD19; i HLA-DR, gotovo identično kao i MSC-ovi. Također, analizom dodatnih biljega koji su karakteristični za MSC-ove, ali nisu dio konsenzusnih kriterija ISCT-a, otkrili su da su svi fibroblasti pozitivni na CD29 i CD44, a negativni na CD31, slično kao MSC. Njihovi rezultati impliciraju da su MSC-ovi i fibroblasti vrlo slični, a vjerojatno i posve isti tip stanice (18).

Neke studije sugeriraju kako bi odentifikacija i eliminacija fibroblasta iz MSC kultura značajno poboljšala prinos MSC-a i potencijal diferencijacije te također spriječila nastanak tumora nakon transplantacije MSC-ova. S. Halfon i suradnici pokazali su da se markeri koji se trenutno koriste za definiranje MSC protočnom citometrijom, kao što su CD105, CD166, CD90, CD44, CD29, CD73 i CD9, također izražavaju na fibroblastima ljudske kože i fibroblastima pluća. Međutim, razina ekspresije CD166 bila je značajno viša, a CD9 značajno manja u MSC-ova nego u fibroblastima. CD146 specifičan je samo za MSC-ove. RT-PCR potvrdio je da je ekspresija CD106, integrina alfa 11 i inzulinu sličan faktor rasta-2 u MSC-ima bila 10 puta veća nego u fibroblasta; dok je izražavanje MMP1 i MMP3 bila je gotovo 100 puta niža u odnosu na fibroblaste (19).

#### 1.3.4.1. Biljezi progenitorskih stanica

Matične stanice odnosno stanice progenitori nalaze se u bazalnom sloju epitela (epidermis, oralna sluznica). Zbog njihovog terapijskog potencijala postojao je veliki interes da se ove bazalne stanice izoliraju.

Za izolaciju progenitorskih stanica iz epidermisa kože razvijena je posebna metoda diferencijalne adhezije na proteine ECM. Metoda diferencijalne adhezije je bazirana na tretiranju petrijevih plastičnih posudica zasebno kolagenom tipa IV, fibronektinom, lamininom ili ekstracelularnim matriksom proizvedenim od samih keratinocita. Jones i suradnici su pokazali da je maksimalno povećanje u sposobnosti formiranja kolonija (*CFE - colony forming efficiency*) 5.5 puta veće u stanica adheriranih na kolagen tipa 4 unutar 20 minuta u odnosu na kontrolu. Stanice koje su se adherirale na fibronektin unutar 5 minuta imaju tek 2 puta veću CFE, a stanice adherirane na laminin nemaju veću sposobnost formiranja kolonija. Zanimljivo je da stanice adherirane na ekstracelularni matriks keratinocita nakon 10 minuta imaju 4 puta veću sposobnost formiranja kolonija (20).

Davies i suradnici su puta prikazali izolaciju i karakterizaciju nove skupine progenitorskih stanica koje se nalaze u lamini propriji oralne sluznice (*OMLP*) (5). Progenitorske stanice (*PC*) pouzdano su izolirane iz *OMLP* diferencijalnom adhezijom na fibronektin. Izolirane kolonije koje potječu iz jedne stanice pokazale su brzu početnu fazu proliferacije, više od 50 udvostručenja populacije (*PD*) prije ulaska u stanično starenje (*senescence*). Ovi podaci su poduprijeti ekspresijom aktivne telomerase unutar razvijajuće kolonije i ekspanziranih klonova kao što je procijenjeno imunocitokemijom (*ICC*) i protokolom kvantitativnog telomernog ponavljanja (*Q-TRAP*). *FACS* analiza odnosno protočni citometar potvrdio je ekspresiju markera matičnih stanica CD44, CD90, CD105 i CD166, ali i negativitet CD34 i CD45 što isključuje hematopoetsko podrijetlo za ove progenitore. Porijeklo neuralnog grebena potvrđeno je povećanom učinkovitošću stvaranja kolonija (*CFE*) u prisutnosti Jaggeda 1 i ekspresiji neuralnih markera Nestina,  $\beta$ -III tubulina, GFAP-a i NFM. Dokazani su i markeri Schwannovih stanica S100 i MPB pomoću imunocitokemije *ICC*-a i Western blotta. Multipotentnost ove nove progenitorske populacije pokazana je diferencijacijom stanica prema mezenhimu (hondrociti, osteoblasti i adipociti) i prema neuralnom tkivu (neuroni i Schwannove stanice) (5). Ljudski fibroblasti oralne sluznice (*hOMF*) pozitivni su na biljege neuralnog grebena CD56 i PDGFR $\alpha$  (21).

Enoch i sur. pokazali su da fibroblasti dobiveni iz OMLP ostvaruju 80–115 totalnih staničnih udvostručenja (CPD) prije staničnog starenja, dok su odgovarajući upareni kožni fibroblasti istog donora ostvarili samo 40-65 CPD-a. Ovako povećani kapacitet samoobnavljanja OMLP-fibroblasta neovisan je o telomerazi (upitno zbog neobjavljenih podataka i u sukobu s naknadno objavljenim rezultatima), ali je bio povezan s povećanom duljinom telomera u odnosu na kožne fibroblaste. Navedeni rezultati sugeriraju da OMLP fibroblasti posjeduju inherentni mehanizmima koji održava duljinu telomera (22).

B. Calenic i suradnici razvili su metodu za međusobno razlikovanje matičnih bazalnih stanica od tranzitornih stanica od diferenciranih keratinocita u ljudskoj oralnoj sluznici (tri različite subpopulacije stanica). Za to je korištena tehnologija magnetskih mikročestica vezanih na protutijela. Stanice su razdvojene upotrebom markera povezanog s proliferacijom, CD71 i  $\alpha6\beta4$  integrina. Tri različite subpopulacije oralnih keratinocita dobivene su nakon magnetske separacije:  $\alpha6\beta4$  pozitivno CD71 negativno,  $\alpha6\beta4$  pozitivno CD71 pozitivno i  $\alpha6\beta4$  negativno (16). Frakcija matičnih stanica pozitivnih na  $\alpha6\beta4$ , ali negativnih na CD71 bila je pozitivna za Oct 3/4, CD44H i citokeratin 19 dok je uočen izostanak ekspresije Nanog, Nestina i CD117. Druge dvije frakcije stanica  $\alpha6\beta4$ pos CD71pos i  $\alpha6\beta4$ neg bile su negativne za sve markere matičnih stanica. Također,  $\alpha6\beta4$  pozitivna CD71 negativna frakcija bila je u stanju regenerirati dobro stratificiran i organizirani ekvivalent oralnog epitela. Distribucija citokeratina 19 i involucrina u ekvivalentu oralnog epitela odražava stanje *in vivo* oralnog gingivalnog epitela (23).  $\alpha6\beta4$  integrin kao sastavni dio hemidesmosoma ima ključnu ulogu u vezanju laminina-5 (laminin-332) u bazalnoj lamini, a eksprimiran je isključivo na površini bazalnih keratinocita (24).

S. Pitaru i suradnici jednostavno su i reproducibilno izolirali velik broj stanica iz uzorka oralne sluznice veličine 3–4x2x1 mm<sup>3</sup> i nazvali ih matične stanice ljudske oralne sluznice (*hOMSC*) (25). Većina ovih stanica izražava mezenhimalne markere stromalnih stanica (CD29, CD73, CD90, CD105, CD166). Ove stanice imaju sposobnost diferencijacije prema svim trima zametnim listićima: mezodermu (osteoblasti, hondroblasti i adipocitni), definitivni endoderm i ektoderm (neuroni). Stanice pozitivne na markere matičnosti odnosno transkripcijske faktore Oct4 i Sox2 i za p75 formiraju strukturu nalik na vrpču (*cord-like*) u tkivu izoliranom iz oralne sluznice. Budući da Nanog i nestin nisu identificirani u stanicama koje formiraju ove

strukture, moguće objašnjenje je da se njihova ekspresija pokreće ili u eksplantatu ili u stanicama koje napuštaju ovu strukturu i migriraju u podlogu za kulturu (25).

### 1.3.5. Terapijske primjene matičnih stanica

Ljudske ES stanice imaju značajan terapijski potencijali za brojne bolesti, kao što je Parkinsonova bolest, ozljeda kralježnične moždine te Šećerna bolesti tipa 1 (26). Međutim, postoje etičke poteškoće korištenja ljudskih zametaka, kao i problem odbacivanja tkiva nakon transplantacije u bolesnika. Jedan od načina zaobilazanja ovih problema je stvaranje pluripotentnih stanica izravno iz stanica pacijenata (7).

Mezenhimske matične stanice (MSC) se mogu samoobnavljati i diferencirati u više staničnih linija. Trenutno se koštana srž smatra glavnim izvorom MSC-a. Međutim, postoje određeni nedostaci i ograničenja kod uporabe ovih stanica za staničnu terapiju. Ljudski MSC-ovi dobiveni iz tkiva gingive imaju nekoliko prednosti u odnosu na MSC-ove dobivene iz koštane srži. Gingivalni MSC-i lako se izoliraju, homogeni su i proliferiraju brže od MSC-a koštane srži bez ikakvog faktora rasta. Važno je i da gingivalni MSC-ovi pokazuju stabilnu morfologiju i ne gube karakteristiku MSC-a kod viših pasaža. Osim toga, MSC-ovi gingive održavaju normalni kariotip i stabilnu aktivnost telomeraze u dugoročnim kulturama, a nisu tumorigeni. Ljudska gingiva bolji je izvor MSC-a od koštane srži jer se veliki broj funkcionalno i klinički kompetentnih MSC-a može generirati u kratkom vremenu za staničnu terapiju u regenerativnoj medicini i tkivnom inženjerstvu (27).

Ljudski fibroblasti oralne sluznice (hOMF) su potencijalni stanični izvor za autolognu regeneraciju tkiva dobivenih iz mezenhima ili neuralnog grebena (21).

S. Pitaru i sur. inducirali su diferencijaciju hOMSC u stanice koje pokazuju morfologiju sličnu astrocitima koje izražavaju karakteristične astrocitne markere. Navedeni markeri su glijalni fibrilarni kiseli protein (GFAP), S100b, transporter ekscitatorne aminokiseline 1 (EAAT1) i izlučeni neurotrofni faktori (*NTF*), kao što je neurotrofni faktor iz mozga (*BDNF*), faktor rasta vaskularnog endotela (*VEGF*), neurotrofni faktor dobiven glijalnom staničnom linijom (*GDNF*) i inzulinu sličan faktor rasta 1 (*IGF-1*). Kondicionirani medij induciranih stanica spašava motorne neurone od hipoksije ili oksidativnog stresa *in vitro*, što upućuje na neuroprotektivni učinak posredovan izlučenim faktorima. Štakorima podvrgnutim ozljedama ishijadičnog živca, transplantirani su diferencirani hOMSC-ovi. Štakori modeli pokazali su

poboljšanu motoričku funkciju nakon transplantacije. Na mjestu presađivanja pronađene su transplantirane stanice, povišene razine NTF-a, te značajno očuvanje funkcionalnog neuromuskularnog spoja, što je dokazano kolokalizacijom  $\alpha$ -bungarotoksina ( $\alpha$ -BTX) i sinaptofizina (SYP) (28).

S. Pitaru i suradnici 2014. godine prvi put opisuju diferencijaciju hOMSC u stanice koje izlučuju dopamin. Ovako diferencirane stanice pozitivne su na neuronalne markere  $\beta$ -III tubulin (TUJ1), MAP2 i sinapsin s karakteristikama dopaminergičkih neurona (transkripcijski faktori FoxA2, Lmx1A i Nurr1). Nakon usađivanja u striatum štakora modela za Parkinsonovu bolest dolazi do poboljšanje simptoma(29).

hOMSC pokazuju veliki potencijal u liječenju totalne transekcije kralježnične moždine. Stanice nasađene na 3D dizajnirani biorazgradivi konstrukt izgrađen od poli-l-mliječne kiseline (PLLA) i polilaktične-glikolne kiseline (PLGA) potaknute su da izlučuju faktore povezane s neuroprotekcijom, imunomodulacijom i aksonalnim produljenjem. Štakori sa implantiranim konstruktom tkivnog inženjeringa povratile su finu motoričku kontrolu, koordinaciju i hod (30).

Stromalne stanice koštane srži (MSCs) pokazuju sposobnost visoko učinkovite i specifične indukcije u stanice s neuronskim karakteristikama, bez diferencijacije u glija stanice. Indukcija MSC-ova štakora i čovjeka izvedena je pomoću transfekcije gena s Notch unutarstaničnom domenom (NICD) i naknadnim tretiranjem bFGF-om, forskolinom i cilijarnim neurotrofnim faktorom (CNF) (31). Ovako dobivene stanice nazvane su SB623 i trenutno su u kliničkim ispitivanjima. Radi se o otvorenoj studiji s jednom rukom (NCT01287936) koja je dizajnirana za procjenu sigurnosti i kliničkih ishoda. SB623 stanice stereotaktički su usađene na rub oštećenja nastalog usred moždanog udara u bolesnika s kroničnim motoričkim deficitom >6 mjeseci nakon početnog moždanog udara. Preliminarni 12-mjesečni privremeni podaci iz ove dvogodišnje studije pokazuju da su stanice SB623 bile sigurne i povezane s poboljšanjem kliničkog ishoda, ali nedostatak studije je izostanak randomizacije i nedostatak kontrolne skupine (32). Faza 2b ove studije zvana *Actissima*, u kojoj se ispitala učinkovitost i sigurnost SB623 u 163 bolesnika s motoričkim deficitom povezan s kroničnim ishemijskim moždanim udarom, nije zadovoljila svoju primarnu završnu točku što znači da nema statistčki značajne razlike prema kontroli (33).



Vrhunski uspjeh terapije provedene matičnim stanicama postigao je talijanski tim pod vodstvom M. De Luca. Radilo se o sedmogodišnjem dječaku koji je bolovao od bulozne epidermolize (*JEB*) u kojeg je došlo do oštećenja preko 60% površine kože. Bolest je uzrokovana mutacijom gena *LAMB3* što je ovaj tim uspio ispraviti. Sam proces bazirao se na biopsiji malog djela zdrave kože dječaka. Nakon uzgajanja autolognih holoklonova (progenitorske stanice) keratinocita, transfecirali su ih vektorom sa zdravim tipom *LAMB3*. Tako priređeni keratinociti presađeni su na dječaka koji se danas smatra prvom osobom izlječenom od tako teške genetske bolesti (34).

Rekonstrukcija okularne površine (*OSR*) uz korištenje kultiviranih slojeva epitelnih stanica oralne sluznice tkivnim inženjeringom (*COMECS*) obećavajući je novo razvijeni tretman za pacijente s teškim oštećenjem površine oka raznim bolestima (35).

#### **1.4. Hipoksija**

Hipoksija (*hypo-* ("ispod") + *oxygen* + *-ia*) je pojam koji u doslovnom prijevodu znači smanjen kisik. Hipoksija se definira kao neuspjeh oksigenacije tkiva (36). Fiziološka koncentracija kisika u tkivu moždane kore štakora normalno iznosi od 2.5 do 5.2% (19–40mmHg) (37). Ovakva koncentracija predstavlja hipoksiju za standardizirane uvjete uzgajanja stanica u kulturi atmosfere (kisik od oko 21%) sa 5%  $\text{CO}_2$ .

Mezenhimalne matične stanice štakora (rMSC) uzgajane u uvjetima niskog kisika (5%  $\text{O}_2$ ), pokazuju veću sposobnost proliferacije i diferencijacije u odnosu na kontrolne stanice u atmosferskom kisiku (20%  $\text{O}_2$ ) (38).

Inkubacija ljudskih mezencefalnih prekursorskih stanica u 3% atmosferskom kisiku rezultirala je brojnijim staničnim diobama u odnosu na kisik prisutan u zraku (39).

X. Hu i suradnici kultivirali su mezenhimalne matične stanice iz transgeničnih miševa (sa zelenim fluorescentnim proteinom) u uvjetima normoksije ili hipoksije (0,5% kisika tijekom 24 sata). Prekondicioniranje u hipoksičnim uvjetima povećava ekspresiju faktora vezanih uz preživljenje i angiogenezu. Navedeni faktori su: faktor 1

induciran hipoksijom (HIF-1 $\alpha$ ), angiopoetin-1 (Ang-1), vaskularni endotel faktor rasta (VEGF) i njegov receptor, Flk-1, eritropoetin (EPO), Bcl-2 i Bcl-xL. Ovako prekondicionirane stanice pogodnije su za transplantaciju u ishemični miokard (40).

Izumi i sur. istražili su učinak hipoksije na potencijal proliferacije i fenotip primarne kulture ljudskih oralnih keratinocita uzgojenih pri parcijalnom tlaku atmosferskog kisika (20%) i u uvjetima hipoksije (2 i 0,5% O<sub>2</sub>). Smanjenje ekspresije p21<sup>WAF1 / CIP1</sup>, p16<sup>INK4A</sup> te smanjen broj  $\beta$ -galaktozidaza pozitivnih stanica ukazalo je na miran (*quiescent*) fenotip, a ne na starenje (*senescence*) u hipoksičnim stanicama. U usporedbi s normoksičnim stanicama, hipoksične stanice stvaraju značajno manje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS). U hipoksičnim stanicama suprimirana je aktivnost ciljne molekule rapamicina u sisavaca (mTOR), a povećana ekspresija hipoksijom induciranog faktor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) što upućuje na fenotip bazalnih stanica. Dakle, hipoksični uvjeti mogu održavati oralne keratinocite u nediferenciranom i mirnom stanju *in vitro* (41).

## **2. HIPOTEZA**

Hipoksija mijenja izražaj biljega matičnosti stanica izoliranih iz sluznice usne šupljine.

### **3. CILJEVI RADA**

Kako bi se testirala hipoteza postavljeni su sljedeći ciljevi rada:

1. Izolirati stanice iz lamine proprije oralne sluznice.
2. Istražiti matičnost izoliranih stanica.
3. Istražiti promjenu izražaja biljega matičnosti u hipoksičnim uvjetima.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Izolacija matičnih stanica sluznice usne šupljine

Matične stanice usne šupljine izolirane su od odraslih donora u starosti od 20 do 44 godine prilikom operacije ostranjivanja umnjaka. Uzorak tkiva sluznice usne šupljine izrezan je nakon lokalne aplikacije lidokaina. Izolirani uzorak tkiva veličine je  $4 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$ . Nakon, uzimanja uzorka komadić tkiva premješten je u sterilnu petrijevu posudicu gdje je ispran medijem (DMEM). Komadići sluznice usne šupljine stavljeni su u otopinu dispaze (Dispase I, Sigma-Aldrich, D4818-2MG) (10  $\mu\text{l}$  dispaze I 990  $\mu\text{l}$  medija), na 4 °C u tubici od 1,5 ml. Drugi dan se od tkiva sluznice usne šupljine odvojio epitel, a ostatak tkiva, odnosno lamina propria se mehanički usitnila kirurškim škalicama te su se komadići premjestili u malu Petrijevu zdjelicu u medij sastavljen od: 2 ml *low glucose* DMEM (1mg/l of glucose), 1% Penicilin/Streptomycin, 1% L-glutamin i 10% od FBS. Medij se mijenjao svakih 2-3 dana. Nakon 7-10 dana tkivo se zalijepilo za podlogu i stanice su počele izlaziti iz tkiva. Željene stanice smo odlijepili akutazom (StemPro®Acutase® Cell Dissociation Reagent, Gibco by life Technologies, A11105-01). Radi se o adheriranim stanicama koje se najprije isperu jednom s DPBS-om (2 ml), nakon toga smo dodali akutazu 8 min u inkubatoru (2 ml). Nakon 8 min stanice s akutazom se pokupe, te se stave neutralizirati u medij za neutralizaciju (*low glucose* DMEM koji mora biti minimalno duplo većeg volumena od same akutaze). Nakon toga slijedi centrifugiranje pri 200 g tokom 6 minuta. Supernatant se odstranjuje, precipitat se resuspendira nakon čega se broje stanice i nasađuju u flasku (tretirana) u gustoći od 200 000 st po flasci u 15 ml medija. Pasaža se provodi kada stanice postignu konfluentnost od oko 80%. Pasažiranje se provodi većim volumenom akutaze (5 ml), a ispire se s 5 ml DPBS-a. Prvo se stanice isperu jednom s DPBS-om (5 ml), nakon toga doda se akutaza 8 min u inkubatoru (5 ml). Nakon 8 min stanice s akutazom se pokupe, te se stave neutralizirati u medij za neutralizaciju (*low glucose* DMEM koji mora biti minimalno duplo većeg volumena od same akutaze). Nakon toga slijedi centrifugiranje pri 200 g tokom 6 minuta. Supernatant se odstranjuje, precipitat se resuspendira nakon čega se broje stanice i nasađuju u flasku (tretirana) u gustoći od 200 000 st po boci u 15 ml medija.

## 4.2. Fiksacija stanica

Stakalca za fiksaciju su naprije bila potopljena u 70% etanolu 20 minuta, a nakon toga su bile pod UV svjetlom sat vremena. Nakon toga stakalca nisu posebno tretirana jer se zbog seruma u mediju stanica koji omogućava adheriranje hOMSC za stakalca. Nakon toga stanice su bile fiksirane 4% otopinom paraformaldehida kroz 10 minuta. Nakon toga stanice su isprane tri puta sa DPBSom (engl. *Dulbecco's phosphate buffer saline*, pH 7,4). Stanice ostaju u DPBS-u do provođenja imunocitokemije.

## 4.3. Imunocitokemija

Fiksirane stanice isprane su četiri puta po 10 minuta PBS-om te im je dodano 500 µL otopine za permeabilizaciju 10-15 minuta (0,2% triton X-100 (Sigma, T8787-100ML) u PBS-u). Nakon permeabilizacije ponovno je provedeno ispiranje stanica PBSom po 10 minuta. Blokiranje sa svrhom da se prekriju nespeifični epitopi provedeno je 3% magarećim serumom u PBS-u tokom jednog sata. Primarna protutijela u 3% magarećem serumu i PBS-u dodana su na stanice te je ostavljeno u frižideru na +4 °C preko noći°. Kao kontrola korišten je serum magarca bez primarnih protutijela. Primarna protutijela, podrijetlo, razrjeđenje i proizvođač, upotrijebljena u ovom istraživanju prikazana su u Tablici 1.

Drugi dan su primarna protutijela isprana PBS-om tri puta po 10 minuta. Nakon ispiranja primarnih protutijela na stanice je stavljena otopina sekundarnih protutijela u PBS-u te su tako stanice inkubirane jedan sat na sobnoj temperaturi u zamračenoj prostoriji. Sekundarna protutijela, podrijetlo, razrjeđenje i proizvođač, upotrijebljena u ovom istraživanju prikazana su u Tablici 2. Nakon jednog sata, isprana su sekundarna protutijela, također tri puta po 10 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 10 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 EVOS FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific).

**Tablica 1.** *Primarna protutijela upotrijebljena za imunocitokemiju.*

Protutijelo	Podrijetlo	Razrjeđenje	Proizvođač
Cleaved Caspase 3	Zec	1:400	Cell Signaling (#9661S)
Sox2(D9b8N)	Zec	1:400	Cell Signaling (#23064S)
Oct-4 (D705Z)	Miš	1:200	Cell Signaling (#75463S)
Nestin (G-20)	Koza	1:200	Santa Cruz (sc-21248)

**Tablica 2.** *Sekundarna protutijela upotrijebljena za imunohistokemiju i imunocitokemiju.*

Protutijelo	Razrjeđenje	Proizvođač
Alexa Fluor 647 magarac anti-zec IgG	1:500	LifeTechnologies (A31573)
Alexa Fluor 647 magarac anti-miš IgG	1:500	LifeTechnologies (A31571)
Alexa Fluor 633 magarac anti-koza IgG	1:500	LifeTechnologies (A21082)

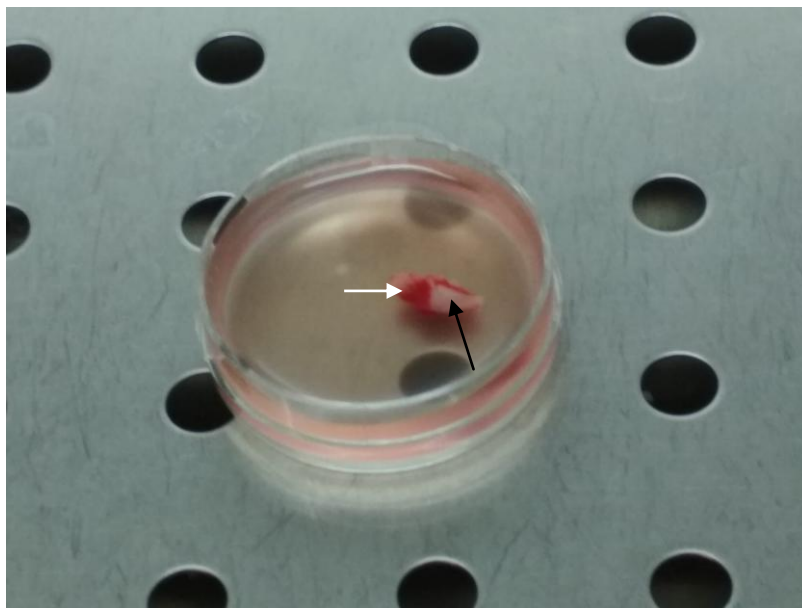
#### **4.4. Hipoksija i deprivacija glukoze**

Stanice su isprane DMEMom bez glukoze a zatim je isti medij staljen na njih. Nakon toga stanice su stavljene 3 sata na 0% kisika u na EVOS FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific). Nakon provedene hipoksije, stanicama je vraćen normalni medij.

## 5. REZULTATI

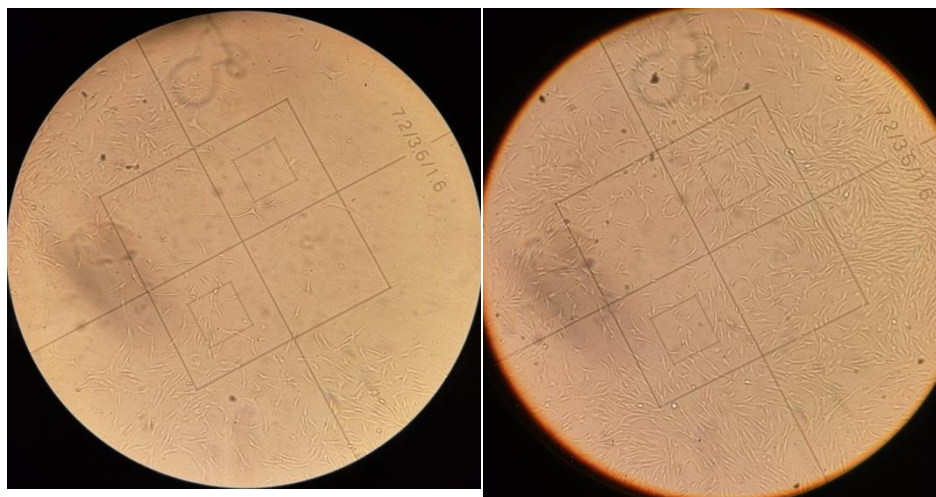
### 5.1. Postupak izolacije je doveo do uspješno dobivene populacije oralnih matičnih stanica

Prvi rezultat ovog diplomskog rada bila je uspješna izolacija matičnih stanica oralne sluznice. Tkivo oralne sluznice (slika 1.) tretirali smo dispazom preko noći. Dispaza cijepa fibronektin i tip IV kolagena što ju čini idealnim enzimom za razgradnju bazalne lamine (42). Ovaj postupak omogućio je jednostavno odvajanje epitela od podležće *lamine propriae*. Izdvojenu *laminu propriu* smo usitnili kirurškim škalicama i koristili kao izvor matičnih stanica oralne sluznice. Komadići tkiva adherirali su na podlogu nakon 7-10 dana nakon čega su stanice počele migrirati iz tkiva na površinu Petrijeve zdjelice. Nakon otprilike 2 tjedna stanice su migrirale (slika 2.) nakon čega smo ih odlijepili akutazom i koristili za daljnje pasažiranje i imunocitokemiju.



**Slika 1.** Tkivo oralne sluznice. Bijela strelica pokazuje crveno tkivo lamine propriae korištene u pokusu. Crna strelica označava blijedo tkivo koje predstavlja epitel oralne sluznice.



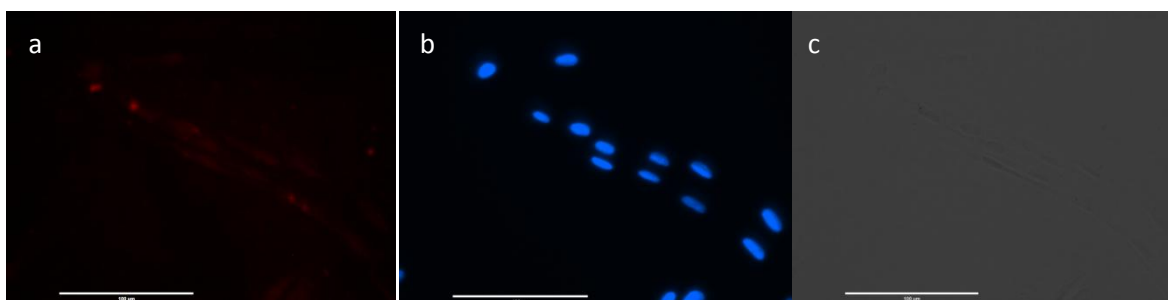


**Slika 2.** *Morfologija stanica koje su migrirale iz tkiva lamine proprije oralne sluznice. Stanice su adherirane uz brojne stanične izdanke.*

## **5.2. Matične stanice oralne sluznice izražavaju biljegy OCT4, Sox2 i nestin**

U drugom dijelu diplomskog rada testirali smo odabrane markere Oct4, Sox2, nestin i Ccasp3, te smo promatrali je li hipoksija utječe na njihov izražaj.

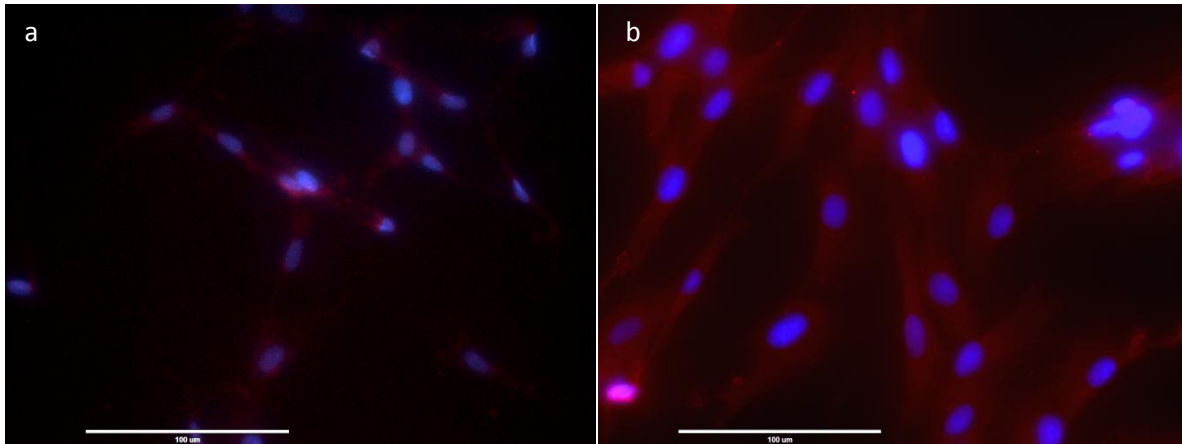
Bojanje na OCT4 u uvjetima normoksije je pokazalo umjereno slab signal (slika 3).



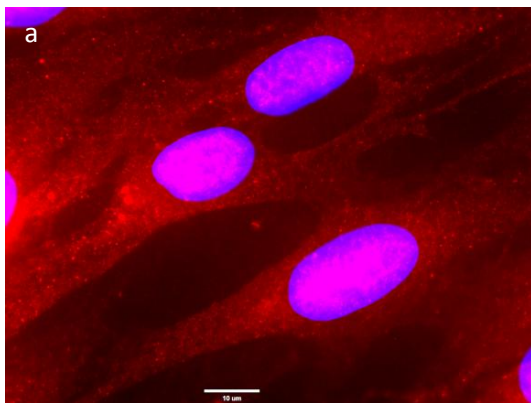
**Slika 3.** *Imunobojenje stanica u atmosferskom kisiku na OCT4. Pokazuje prisutnost slabog signala. Imunobojenje sa OCT4 (crveno) (a) i protuboja s DAPI (b). Fazna slika istih stanica (c). Skala 100  $\mu$ m.*

Bojanje na SOX2 u uvjetima normoksije pokazuje umjereno slab signal (slika 4).

Bojanje na nestin, biljegy neuralnih matičnih stanica (43), pokazuje pozitivitet u citoplazmi kao i u jezgri svih stanica (slika 4 i 5).

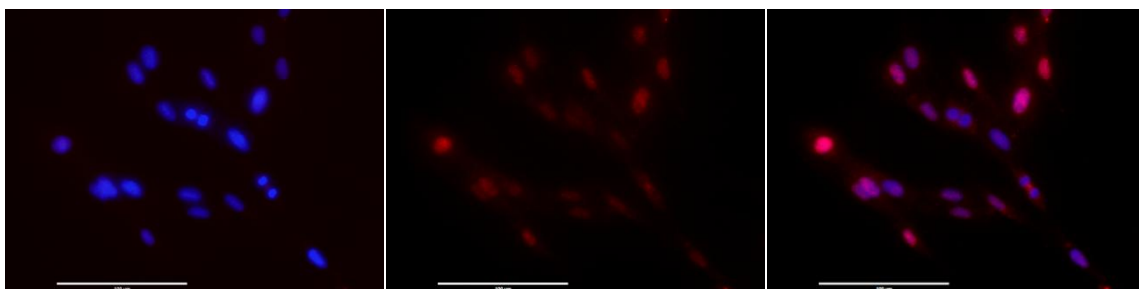


**Slika 4.** Imunoobojenje stanica u atmosferskom kisiku. Prisutan je slab signal SOX2 (a, crveno) i jači signal nestina (b, crveno) u svim stanicama. DAPI plavom bojom obojane su jezgre Skala 100 $\mu$ m.



**Slika 5.** Imunoobojenje stanica u atmosferskom kisiku. Imunoobojenje na Nestin (crveno) i protuboja DAPI (plavo)(b). Skala 10  $\mu$ m.

Bojanje na pocijepanu kaspazu 3 (CCasp3) kao biljeg programirane stanične smrti apoptoze (44), pokazuje umjereno jak nuklearni signal te slabije obojenje citoplazme (slika 6).



**Slika 6.** Imunoobojenje na CCasp3 pokazuje umjereno jak nuklearni te slabiji citoplazmatski signal. Imuno obojenje na DAPI (plavo)(a). Imuno obojenje na pocijepanu kaspazu 3 CCasp3 (crveno)(b). Skala 100  $\mu$ m.

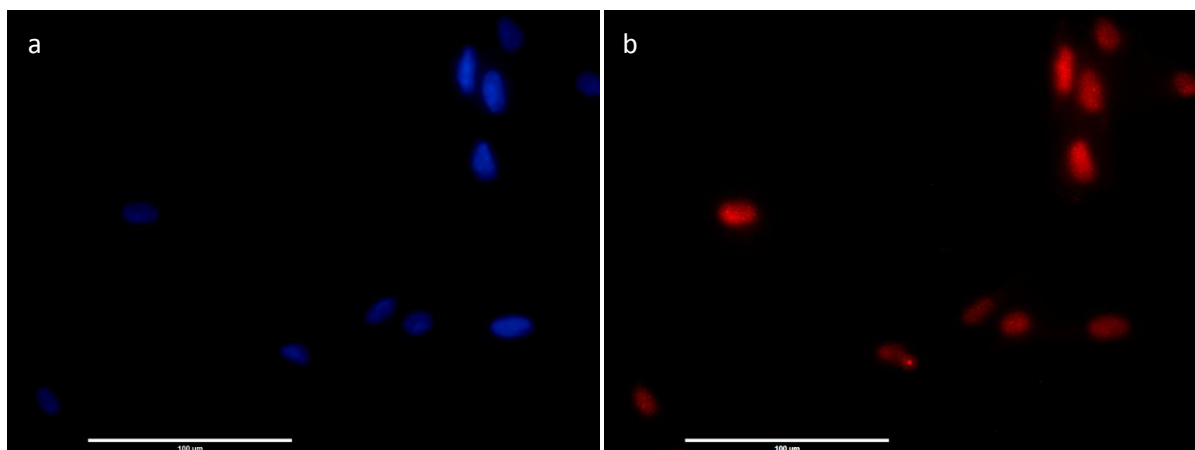
### 5.3. Hipoksija djeluje na izražaj biljega OCT4, Sox2 i nestin u populaciji oralnih matičnih stanica

Kako bismo istražili kako hipoksija utječe na izražaj odabranih markera, stanice su izložene hipoksičnim uvjetima od 0% kisika bez glukoze u mediju.

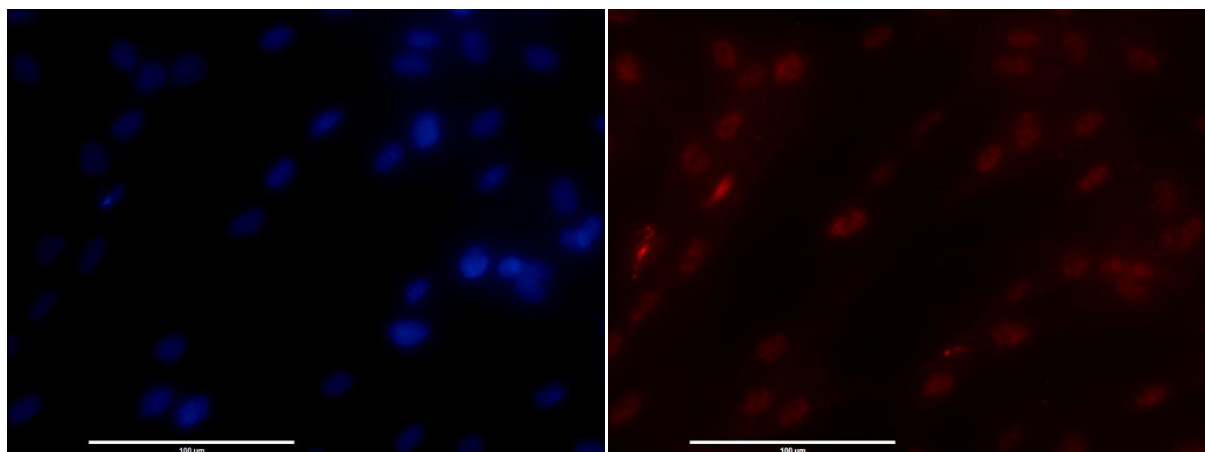
U usporedbi s normoksijskim uvjetima, biljezi matičnosti OCT4 i SOX2 su pokazali potpun nedostatak signala.

U usporedbi s normoksijskim uvjetima, bojanje na nestin pokazuje signal prisutan gotovo isključivo u jezgri stanica (slika 7), dok je signal u citoplazmi mnogo slabiji nego je to bio slučaj kada smo stanice uzgajali u normoksijskim uvjetima.

U usporedbi s normoksijskim uvjetima, bojanje na pocijepanu kaspazu 3 (CCasp3) pokazuje umjereno slab signal u jezgri stanica, te gotovo potpun nedostatak signala u citoplazmi (slika 8)



**Slika 7.** *Imunoobojenje stanica depriviranih glukozom u hipoksiji pokazuje primarno nuklearni signal nestina (crveno) . Skala 100 µm.*



**Slika 8.** *Imunoobojenje stanica depriviranih glukozom u anoksiji na DAPI i CCasp3 . Imuno obojenje na DAPI (plavo)(a). Imuno obojenje na pocijepanu kaspazu 3 CCasp3 (crveno)(b). Skala 100  $\mu$ m.*

## 6. RASPRAVA

Osnovni cilj ove studije bio je utvrditi ima li razlike u izražaju biljega matičnosti OCT4 i Sox2 te nestina i CCasp3 u hipoksiji u odnosu na normoksiju. Kako bismo to ostvarili, dizajnirali smo pokus koji se sastojao od izolacije matičnih stanica iz *laminae propriae* oralne sluznice te izlaganje navedenih stanica hipoksiji i normoksiji.

Korištenjem protokola koji je uključivao tretiranje tkiva oralne sluznice dispazom te izdvajanjem tkiva *laminae propriae* s mogućnosti priljepljivanja istoga na podlogu, uspjeli smo izolirati matične stancie iz tkiva *laminae propriae*. Iako je postupak dugotrajan i zahtjeva period u kojem stanice spontano izlaze iz eksplantata, uspješnost je u našim rukama bila vrlo dobra.

Budući da smo htjeli istražiti kako hipoksija utječe na neke od glavnih gena koji reguliraju matičnost, odabrali smo OCT4 i Sox2. OCT4 je biljeg embriogeneze u čovjeka (45), ali i matičnih stanica odraslog čovjeka (46). Sox2 gen je neophodan za regulaciju pluripotencije i samoobnavljanja embrionalnih matičnih stanica u čovjeka (47). OCT4 i Sox2 formiraju heterodimer i vežu DNA te njihov relativni odnos koncentracija ima ključan utjecaj na usmjerenje ESC prema samoobnavljanju ili diferencijaciji (48,49).

Geni matičnosti OCT4 i Sox2 pokazuju slab intenzitet bojenja u normoksiji, a bojenje u hipoksiji je negativno. Analiza rezultata iz literature pokazuje veliku raznolikost definiranja razina kisika koja se smatra hipoksijom. Ipak sve više je prihvaćeno mišljenje kako za matične stanice treba koristiti koncentracije niže od 2%, budući da matične stanice prirodno rastu na nižim koncentracijama kisika. Što se tiče OCT4 za kojega smo u ovome radu pokazali da hipoksija smanjuje njegov izražaj, slično su opisali H. Ren i suradnici. Oni su pokazali da hipoksija ubrzava proliferaciju i diferencijaciju MSC, što dovodi do zaustavljanja transkripcije OCT4 (50).

Pocijepana kaspaza 3 (CCasp3) u normoksiji pozitivna je u jezgri stanica, a u hipoksiji lokalizacija je ista i intenzitet bojenja je podjednak. Kaspaza 3 je cistein proteaza i igra kritičnu ulogu u regulaciji programirane stanične smrti (apoptoza) (44). Kaspaza 3 osim apoptoze ima značajnu ulogu u diferencijaciji ESC cijepanjem transkripcijskog faktora nanog (51). Gorup i sur. pokazali su kolokalizaciju GAP43 ključnog faktora za izrastanje novih aksona te kaspaze 3 nakon indukcije moždanog udara u miševa (52). Wang i suradnici pokazuju da nedostatak bFGF u kulturi pluripotentnih stanica izaziva njihovo odvajanje od ECM. Odvajanje ovih stanica od

ECM rezultira: 1. kaspazom 3 induciranu programiranu staničnu smrt anoikis u tim stanicama, 2. kaspazom 3 pocijepan nanog što stimulira diferencijaciju ovih stanica (53). Mi nismo vidjeli razliku u ekspresiji pocijepane kaspaze 3 što može biti odražaj nedostatka bFGF i ECM u naših kultura.

Nestin u normoksiji pokazuje pozitivitet u jezgri i citoplazmi dok se prilikom hipoksije lokalizira većinom u jezgri. Nestin je intermedijarni filament koji se eksprimira u progenitorskim stanicama središnjeg živčanog sustava i mišićnog tkiva, no njegova ekspresija isčezava prilikom diferencijacije stanica (56,57). Ekspresija nestina u odraslih ljudi povećana je u patološkim stanjima kao što su glijalni ožiljak kod ozljede SŽS, regeneracija oštećenog mišića i neuroepitelni tumori (58–60). Prilikom oksidativnog oštećenja stanica neuralnih progenitora dolazi do povećanja ekspresije nestina. Ovo povećanje ekspresije izrazito je povezano sa citoprotektivnim učinkom (61). Kako su stanice iz ovog eksperimenta uzgajane u atmosferskom kisiku, vrlo je moguće da su stanice bile izložene oksidativnom stresu. Povećana ekspresija nestina djeluje kao protektivni faktor i protuteža aktivaciji apoptoze kao što je pokazano pocijepanom kaspazom 3. Stromalne stanice ljudske oralne sluznice dvostruko pozitivne na nestin i CD44 marker nalaze se uglavnom unutar vezivnih papila ispod lamine proprie oralne sluznice (62). Pozitivni nestin ukazuje na fibroblastno podrijetlo ovih stanica. Mi smo u našem radu pokazali da je nestin pozitivan u jezgri, Zhang i suradnici pokazali su da pozitivan nestin u jezgri sudjeluje u zaštiti tumorskih stanica od staničnog starenja (63).

Jedan od razloga zašto smo u počeku, u normoksiji imali slabiji signal biljega matičnosti OCT4 i SOX2 bi mogao biti da se ovim postupkom u našem uzorku nalaze stanice koje nisu matične. Ipak, kada bi to bio slučaj, vjerojatno bi vidjeli stanice s velikom razlikom u izražaju ovih gena u istom uzorku. U budućnosti možemo razmisliti kako dodatno unaprijediti ovaj protokol: Danas postoje razne metode za izolaciju matičnih stanica, a potencijalno najjednostavnija od njih bazirana je na veličini stanice. Keratinociti veličine između 11 i 20  $\mu\text{m}$  pokazuju najveću sposobnost dijeljenja, dok stanice veće od 20  $\mu\text{m}$  više nemaju sposobnost dijeljenja i terminalno su diferencirane (54). Kako je metoda biranja stanica pod mikroskopom s naknadnim nasađivanjem u praksi vrlo zahtjevna i neprihvatljiva, proizvedeni su posebni najlonski filteri. Pomoću filtera od najlonske mreže (pore od 20 i 11 $\mu\text{m}$ ) izdvojen je veliki broj progenitora keratinocita. Stanice koje su prošla oba filtera odnosno

nezarobljene stanice pokazuju veću vijabilnost i pozitivitet na biljege  $\alpha 6$  integrin i CD71(55). Ovo saznanje otvorilo je put prema razvoju tehnologije bazirane na magnetskim mikročesticama vezanim na protutijela (16). Razvijena je i metoda bazirana na diferencijalnoj adherenciji na fibronektin čime se izdvajaju matične stanice (5).

## 7. ZAKLJUČCI

1. Postupak koji smo primijenili u ovom radu je doveo do uspješne izolacije matičnih stanica oralne sluznice.
2. Stanice izolirane iz tkiva lamine proprije oralne sluznice pokazuju slab intenzitet signala na biljege matičnosti OCT4 i SOX2, te na nestin i kaspazu 3.
3. U usporedbi s normoksijskim uvjetima, hipoksični uvjeti uz deprivaciju glukoze smanjuju intenzitet signala Oct4 i Sox2, a signal nestina postaje primarno nuklearan.



## **8. ZAHVALE**

Zahvaljujem se svom mentoru prof. dr. sc. Dinku Mitrečiću na pristupačnosti i potpori tijekom pisanja ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se Valentini Hribljan i Damiru Lisjaku na pristupačnosti te iznimnoj pomoći pri radu u laboratoriju.

Posebno se zahvaljujem Luciji i svojoj obitelji koji su mi pružili bezuvjetnu podršku tijekom svih šest godina studija.

Veliko hvala i mojim prijateljima na podršci, razumijevanju i vjeri u mene.

## 9. POPIS LITERATURE

1. Mescher A. Junqueira Basic Histology Text and Atlas 14th Edition. McGraw-Hill Education. 2016.
2. Fournier BPJ, Ferre FC, Couty L, Lataillade J-J, Gourven M, Naveau A, i ostali. Multipotent Progenitor Cells in Gingival Connective Tissue. *Tissue Eng Part A* [Internet]. rujan 2010.;16(9):2891–9. Dostupno na: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.tea.2009.0796>
3. Wang F, Yu M, Yan X, Wen Y, Zeng Q, Yue W, i ostali. Gingiva-Derived Mesenchymal Stem Cell-Mediated Therapeutic Approach for Bone Tissue Regeneration. *Stem Cells Dev* [Internet]. prosinac 2011.;20(12):2093–102. Dostupno na: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2010.0523>
4. Sadler L medical embryology / T. Langman Medical Embryology 13th edition. Wolters Kluwer Health. 2010.
5. Davies LC, Locke M, Webb RDJ, Roberts JT, Langley M, Thomas DW, i ostali. A Multipotent Neural Crest-Derived Progenitor Cell Population Is Resident Within the Oral Mucosa Lamina Propria. *Stem Cells Dev* [Internet]. lipanj 2010. [citirano 03. svibanj 2019.];19(6):819–30. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20132052>
6. Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol* [Internet]. 2009. [citirano 01. svibanj 2019.];114:185–99. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19343304>
7. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006.;
8. Shenghui H, Nakada D, Morrison SJ. Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. 06. studeni 2009. [citirano 01. svibanj 2019.];25(1):377–406. Dostupno na: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cellbio.042308.113248>
9. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* [Internet]. srpanj 1981. [citirano 01. svibanj 2019.];292(5819):154–6. Dostupno na: <http://www.nature.com/articles/292154a0>
10. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad*

- Sci U S A [Internet]. prosinac 1981. [citirano 01. svibanj 2019.];78(12):7634–8. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6950406>
11. Stem Cell Basics IV. | stemcells.nih.gov [Internet]. [citirano 02. svibanj 2019.]. Dostupno na: <https://stemcells.nih.gov/info/basics/4.htm>
  12. van der Flier LG, Clevers H. Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Annu Rev Physiol* [Internet]. 12. ožujak 2009. [citirano 02. svibanj 2019.];71(1):241–60. Dostupno na: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.physiol.010908.163145>
  13. Liu S, Dontu G, Wicha MS. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2005. [citirano 02. svibanj 2019.];7(3):86. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1143566/>
  14. Papini S, Cecchetti D, Campani D, Fitzgerald W, Grivel JC, Chen S, i ostali. Isolation and Clonal Analysis of Human Epidermal Keratinocyte Stem Cells in Long-Term Culture. *Stem Cells* [Internet]. 01. srpanj 2003. [citirano 01. svibanj 2019.];21(4):481–94. Dostupno na: <http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.21-4-481>
  15. Webb A, Li A, Kaur P. Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. *Differentiation* [Internet]. 01. listopad 2004. [citirano 01. svibanj 2019.];72(8):387–95. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301468109602565?via%3Dihub>
  16. Calenic B, Ishkitiev N, Yaegaki K, Imai T, Kumazawa Y, Nasu M, i ostali. Magnetic separation and characterization of keratinocyte stem cells from human gingiva. *J Periodontal Res* [Internet]. 01. prosinac 2010. [citirano 01. svibanj 2019.];45(6):703–8. Dostupno na: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0765.2010.01284.x>
  17. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, i ostali. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [Internet]. 01. siječanj 2006. [citirano 02. svibanj 2019.];8(4):315–7. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606>
  18. Denu RA, Nemcek S, Bloom DD, Goodrich AD, Kim J, Mosher DF, i ostali.

- Fibroblasts and Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Phenotypically Indistinguishable. *Acta Haematol* [Internet]. 2016. [citirano 02. svibanj 2019.];136(2):85–97. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27188909>
19. Halfon S, Abramov N, Grinblat B, Ginis I. Markers Distinguishing Mesenchymal Stem Cells from Fibroblasts Are Downregulated with Passaging. *Stem Cells Dev* [Internet]. 07. siječanj 2011. [citirano 02. svibanj 2019.];20(1):53–66. Dostupno na: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2010.0040>
  20. Jones PH, Watt FM. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell* [Internet]. 21. svibanj 1993. [citirano 18. svibanj 2019.];73(4):713–24. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8500165>
  21. Higa K, Satake Y, Shimazaki J. The characterization of human oral mucosal fibroblasts and their use as feeder cells in cultivated epithelial sheets. *Futur Sci OA* [Internet]. studeni 2017. [citirano 02. svibanj 2019.];3(4):FSO243. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29134127>
  22. Enoch S, Wall I, Peake M, Davies L, Farrier J, Giles P, i ostali. Increased Oral Fibroblast Lifespan Is Telomerase-independent. *J Dent Res* [Internet]. 25. listopad 2009. [citirano 04. svibanj 2019.];88(10):916–21. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19783799>
  23. Calenic B, Ishkitiev N, Yaegaki K, Imai T, Costache M, Tovar M, i ostali. Characterization of oral keratinocyte stem cells and prospects of its differentiation to oral epithelial equivalents. *Rom J Morphol Embryol* [Internet]. 2010. [citirano 01. svibanj 2019.];51(4):641–5. Dostupno na: <http://www.rjme.ro/RJME/resources/files/510410641645.pdf>
  24. Watt FM. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation [Internet]. Sv. 21, *EMBO Journal*. EMBO Press; 2002 [citirano 01. svibanj 2019.]. str. 3919–26. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1714374>
  25. Marynka-Kalmani K, Treves S, Yafee M, Rachima H, Gafni Y, Cohen MA, i ostali. The Lamina Propria of Adult Human Oral Mucosa Harbors a Novel Stem Cell Population. *Stem Cells* [Internet]. 2010. [citirano 04. svibanj 2019.];N/A-N/A. Dostupno na: <http://doi.wiley.com/10.1002/stem.425>

26. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, i ostali. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* [Internet]. 06. studeni 1998. [citirano 01. svibanj 2019.];282(5391):1145–7. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9804556>
27. Tomar GB, Srivastava RK, Gupta N, Barhanpurkar AP, Pote ST, Jhaveri HM, i ostali. 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*. 2010.;
28. Ganz J, Arie I, Ben-Zur T, Dadon-Nachum M, Pour S, Araidy S, i ostali. Astrocyte-Like Cells Derived From Human Oral Mucosa Stem Cells Provide Neuroprotection In Vitro and In Vivo. *Stem Cells Transl Med* [Internet]. ožujak 2014. [citirano 04. svibanj 2019.];3(3):375–86. Dostupno na: <http://doi.wiley.com/10.5966/sctm.2013-0074>
29. Ganz J, Arie I, Buch S, Zur T Ben, Barhum Y, Pour S, i ostali. Dopaminergic-Like Neurons Derived from Oral Mucosa Stem Cells by Developmental Cues Improve Symptoms in the Hemi-Parkinsonian Rat Model. *Cookson MR*, urednik. *PLoS One* [Internet]. 19. lipanj 2014. [citirano 04. svibanj 2019.];9(6):e100445. Dostupno na: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0100445>
30. Ganz J, Shor E, Guo S, Sheinin A, Arie I, Michaelevski I, i ostali. Implantation of 3D Constructs Embedded with Oral Mucosa-Derived Cells Induces Functional Recovery in Rats with Complete Spinal Cord Transection. *Front Neurosci* [Internet]. 31. listopad 2017. [citirano 04. svibanj 2019.];11. Dostupno na: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2017.00589/full>
31. Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, Itokazu Y, i ostali. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest* [Internet]. lipanj 2004. [citirano 04. svibanj 2019.];113(12):1701–10. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15199405>
32. Steinberg GK, Kondziolka D, Wechsler LR, Lunsford LD, Kim AS, Johnson JN, i ostali. Two-year safety and clinical outcomes in chronic ischemic stroke patients after implantation of modified bone marrow–derived mesenchymal stem cells (SB623): a phase 1/2a study. *J Neurosurg* [Internet]. 01. studeni

2018. [citirano 04. svibanj 2019.];1–11. Dostupno na:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30497166>
33. SanBio Announces Topline Results from a Phase 2b Study in the U.S. Evaluating SB623, a Regenerative Cell Medicine for the Treatment of Patients with Chronic Stroke [Internet]. 2019 [citirano 04. svibanj 2019.]. Dostupno na:  
<http://v4.eir-parts.net/v4Contents/View.aspx?cat=tdnet&sid=1665469>
34. Hirsch T, Rothoef T, Teig N, Bauer JW, Pellegrini G, De Rosa L, i ostali. Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. *Nature* [Internet]. 08. studeni 2017. [citirano 06. svibanj 2019.];551(7680):327–32. Dostupno na: <http://www.nature.com/articles/nature24487>
35. Nakamura T, Yokoo S, Bentley AJ, Nagata M, Fullwood NJ, Inatomi T, i ostali. Development of functional human oral mucosal epithelial stem/progenitor cell sheets using a feeder-free and serum-free culture system for ocular surface reconstruction. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2016. [citirano 06. svibanj 2019.]; Dostupno na: [www.nature.com/scientificreports](http://www.nature.com/scientificreports)
36. Samuel J, Franklin C. Hypoxemia and Hypoxia. U: *Common Surgical Diseases* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2008 [citirano 03. svibanj 2019.]. str. 391–4. Dostupno na: [http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-75246-4\\_97](http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-75246-4_97)
37. Erecińska M, Silver IA. Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir Physiol* [Internet]. 15. studeni 2001. [citirano 03. svibanj 2019.];128(3):263–76. Dostupno na:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034568701003061?via%3Dihub>
38. Lennon DP, Edmison JM, Caplan AI. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: Effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *J Cell Physiol* [Internet]. lipanj 2001. [citirano 07. svibanj 2019.];187(3):345–55. Dostupno na:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11319758>
39. Storch A, Paul G, Csete M, Boehm BO, Carvey PM, Kupsch A, i ostali. Long-Term Proliferation and Dopaminergic Differentiation of Human Mesencephalic Neural Precursor Cells. *Exp Neurol* [Internet]. kolovoz 2001. [citirano 07. svibanj 2019.];170(2):317–25. Dostupno na:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11476598>
40. Hu X, Yu SP, Fraser JL, Lu Z, Ogle ME, Wang J-A, i ostali. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis Hu et al *Cardiopulmonary Support and Physiology. J Thorac Cardiovasc Surg c* [Internet]. [citirano 03. svibanj 2019.];135(4):799. Dostupno na: [https://www.jtcvs.org/article/S0022-5223\(07\)01652-2/pdf](https://www.jtcvs.org/article/S0022-5223(07)01652-2/pdf)
  41. Kato H, Izumi K, Uenoyama A, Shiomi A, Kuo S, Feinberg SE. Hypoxia Induces an Undifferentiated Phenotype of Oral Keratinocytes in vitro. *Cells Tissues Organs* [Internet]. 2014. [citirano 08. svibanj 2019.];199(5–6):393–404. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25720390>
  42. Stenn KS, Link R, Moellmann G, Madri J, Kuklinska E. Dispase, a Neutral Protease From *Bacillus Polymyxa*, Is a Powerful Fibronectinase and Type IV Collagenase. *J Invest Dermatol* [Internet]. 01. kolovoz 1989. [citirano 27. svibanj 2019.];93(2):287–90. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X89905563>
  43. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RDG. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* [Internet]. 23. veljača 1990. [citirano 27. svibanj 2019.];60(4):585–95. Dostupno na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/009286749090662X>
  44. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical Pathways of Caspase Activation During Apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. studeni 1999. [citirano 25. svibanj 2019.];15(1):269–90. Dostupno na: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cellbio.15.1.269>
  45. Fogarty NME, McCarthy A, Snijders KE, Powell BE, Kubikova N, Blakeley P, i ostali. Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature* [Internet]. 2017. [citirano 27. svibanj 2019.];550(7674):67–73. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28953884>
  46. Tai M-H, Chang C-C, Olson LK, Trosko JE. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* [Internet]. 16. rujan 2004. [citirano 27. svibanj 2019.];26(2):495–502. Dostupno na: <https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgh321>

47. Fong H, Hohenstein KA, Donovan PJ. Regulation of Self-Renewal and Pluripotency by Sox2 in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* [Internet]. kolovoz 2008. [citirano 27. svibanj 2019.];26(8):1931–8. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18388306>
48. Tapia N, MacCarthy C, Esch D, Gabriele Marthaler A, Tiemann U, Araúzo-Bravo MJ, i ostali. Dissecting the role of distinct OCT4-SOX2 heterodimer configurations in pluripotency. *Sci Rep* [Internet]. 28. listopad 2015. [citirano 04. lipanj 2019.];5(1):13533. Dostupno na: <http://www.nature.com/articles/srep13533>
49. Rizzino A. Concise review: The Sox2-Oct4 connection: critical players in a much larger interdependent network integrated at multiple levels. *Stem Cells* [Internet]. lipanj 2013. [citirano 04. lipanj 2019.];31(6):1033–9. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23401375>
50. Ren H, Cao Y, Zhao Q, Li J, Zhou C, Liao L, i ostali. Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 18. kolovoz 2006. [citirano 31. svibanj 2019.];347(1):12–21. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16814746>
51. Fujita J, Crane AM, Souza MK, Dejosez M, Kyba M, Flavell RA, i ostali. Caspase Activity Mediates the Differentiation of Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* [Internet]. 05. lipanj 2008. [citirano 25. svibanj 2019.];2(6):595–601. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590908001628#bib13>
52. Gorup D, Boháček I, Miličević T, Pochet R, Mitrečić D, Križ J, i ostali. Increased expression and colocalization of GAP43 and CASP3 after brain ischemic lesion in mouse. *Neurosci Lett* [Internet]. lipanj 2015. [citirano 25. svibanj 2019.];597:176–82. Dostupno na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394015003419>
53. Wang X, Lin G, Martins-Taylor K, Zeng H, Xu R-H. Inhibition of caspase-mediated anoikis is critical for basic fibroblast growth factor-sustained culture of human pluripotent stem cells. *J Biol Chem* [Internet]. 04. prosinac 2009. [citirano 25. svibanj 2019.];284(49):34054–64. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19828453>



54. Barrandon Y, Green H. Cell size as a determinant of the clone-forming ability of human keratinocytes [Internet]. Sv. 82, Cell Biology. 1985 [citirano 09. svibanj 2019.]. Dostupno na: <https://www.pnas.org/content/pnas/82/16/5390.full.pdf>
55. Fujimori Y, Izumi K, Feinberg SE, Marcelo CL. Isolation of small-sized human epidermal progenitor/stem cells by Gravity Assisted Cell Sorting (GACS). J Dermatol Sci [Internet]. prosinac 2009. [citirano 09. svibanj 2019.];56(3):181–7. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19828297>
56. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. Cell [Internet]. 23. veljača 1990. [citirano 15. svibanj 2019.];60(4):585–95. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1689217>
57. Sejersen T, Lendahl U. Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development. J Cell Sci [Internet]. prosinac 1993. [citirano 15. svibanj 2019.];106 ( Pt 4):1291–300. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8126108>
58. Frisen J, Johansson CB, Török C, Risling M, Lendahl U. Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. J Cell Biol [Internet]. 01. listopad 1995. [citirano 16. svibanj 2019.];131(2):453–64. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7593171>
59. Vaitinen S, Lukka R, Sahlgren C, Hurme T, Rantanen J, Lendahl U, i ostali. The Expression of Intermediate Filament protein Nestin as Related to Vimentin and Desmin in Regenerating Skeletal Muscle. J Neuropathol Exp Neurol [Internet]. 01. lipanj 2001. [citirano 16. svibanj 2019.];60(6):588–97. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11398835>
60. Dahlstrand J, Collins VP, Lendahl U. Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors. Cancer Res [Internet]. 01. listopad 1992. [citirano 16. svibanj 2019.];52(19):5334–41. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1382841>
61. Sahlgren CM, Pallari H-M, He T, Chou Y-H, Goldman RD, Eriksson JE. A nestin scaffold links Cdk5/p35 signaling to oxidant-induced cell death. EMBO J [Internet]. 18. listopad 2006. [citirano 16. svibanj 2019.];25(20):4808–19. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17036052>

62. Abe S, Yamaguchi S, Sato Y, Harada K. Sphere-Derived Multipotent Progenitor Cells Obtained From Human Oral Mucosa Are Enriched in Neural Crest Cells. *Stem Cells Transl Med* [Internet]. siječanj 2016.;5(1):117–28. Dostupno na: <http://doi.wiley.com/10.5966/sctm.2015-0111>
63. Zhang Y, Wang J, Huang W, Cai J, Ba J, Wang Y, i ostali. Nuclear Nestin deficiency drives tumor senescence via lamin A/C-dependent nuclear deformation. *Nat Commun* [Internet]. 06. prosinac 2018. [citirano 25. svibanj 2019.];9(1):3613. Dostupno na: <http://www.nature.com/articles/s41467-018-05808-y>

## 10. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Dražen Juraj Petrović

Datum rođenja: 2.11.1994.

Mjesto rođenja: Zagreb, Hrvatska

### OBRAZOVANJE:

2001.-2009. Osnovna škola Vladimira Nazora, Virovitica

2009.-2013. Gimnazija Petra Preradovića, Virovitica

2013.-2019. Medicinski fakultet, Zagreb

### AKTIVNOSTI:

Sudjelovanje na državnom natjecanju iz kemije i biologije 7.-10.5.2012.

Sudjelovanje na državnom natjecanju iz kemije 17.-19.4.2013.

Demonstrator na Katedri za anatomiju (2014. - 2015.)

Demonstrator na Katedri za Medicinsku Kemiju i Biokemiju (2014.- 2019.)

Demonstrator na Katedri za Hitologiju i Embriologiju (2017.- 2019.)

Član predsjedništva Kardiološke sekcije Medicinskog fakulteta (od 2017.)

Sudjelovanje na studentskom kongresu RECOOP KFSD 2<sup>nd</sup> u Bratislavi 11.4.2019.

Studjelovanje na međunarodnoj konferenciji International Conference on Neurological Disorders and Neurorestoration u Dubrovniku 10-13.5.2019

Koautor na radu objavljenom u Croatian Medical Journal 30.4.2019. pod naslovom: Necroptosis is one of the modalities of cell death accompanying ischemic brain stroke: from pathogenesis to therapeutic possibilities objavljenom

### PRIZNANJA:

Dekanova nagrada za najboljeg studenta 2. godine