



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Оливера Љ. Стојадиновић

**УЛОГА ЛОКАЛНЕ НИШЕ
ЕПИДЕРМАЛНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА
У НАСТАНКУ И РАЗВОЈУ ХРОНИЧНИХ
ВЕНСКИХ УЛКУСА**

докторска дисертација

Крагујевац, 2021



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Olivera Lj. Stojadinović

**THE ROLE OF EPIDERMAL STEM CELLS
NICHE IN PATHOGENESIS OF CHRONIC
VENOUS ULCERS**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2021

ИДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Аутор
Име и презиме: Оливера Стојадиновић
Датум и место рођења: 26.12.1972, Бољевац, Република Србија
Садашње запослење: Доктор медицине, University of Miami, Miller School of Medicine, Dr Philip Frost Department of Dermatology & Cutaneous Surgery, 1600 NW 10 th Ave/RMSB 20203A, Miami, Florida 33136, USA
Докторска дисертација
Наслов: Улога локалне нише епидермалних матичних ћелија у настанку и развоју хроничних венских улкуса
Број страница: 38
Број слика: 7 слика. 1 табела
Број библиографских података: 76
Установа и место где је рад израђен: Универзитет у Крагујевцу, Факултет медицинских наука у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицина 602.9:611.771]:616.14-002.44(043.3)
Ментор: др сци. мед. Марјана Томић-Цанић, редовни професор на Department of Dermatology and Cutaneous Surgery University of Miami Miller Medical School
Коментор: др сци. мед. Небојша Арсенијевић, редовни професор, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 18.07.2019. године
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-03-989/18 од 12.12.2019. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: 1. др сци. мед. Гордана Радосављевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник; 2. др сци. мед. Марија Миловановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан; 3. др сци. мед. Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан; 4. др сци. мед. Дејан Вуловић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан; 5. др сци. мед. Ана Равић Николић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Дерматовенерологија, члан;
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
Датум одбране дисертације:

DOCTORAL DISSERTATION IDENTIFICATION PAGE

Author
Name and surname: Olivera Stojadinović
Date and place of birth: 26.12.1972, Boljevac, Republic of Serbia
Current employment: Doctor of Medicine, University of Miami, Miller School of Medicine, Dr Philip Frost Department of Dermatology & Cutaneous Surgery, 1600 NW 10 th Ave/RMSB 20203A, Miami, Florida 33136, USA
Doctoral Dissertation
Title: The role of epidermal stem cells niche in pathogenesis of chronic venous ulcers
No. of pages: 38
No. of images: 7 images. 1 tables
No. of bibliographic data: 76
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac
Scientific area (UDK): Medicine 602.9:611.771]:616.14-002.44(043.3)
Mentor: dr sci. med. Marjana Tomić-Canić, Full Professor, Department of Dermatology and Cutaneous Surgery University of Miami Miller Medical School
Comentor: dr sci. med. Nebojša Arsenijević, Full Professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 18.07.2019. године
Decision number and date od acceptance of the doctoral disertation: IV-03-989/18 од 12.12.2019. године
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: <ol style="list-style-type: none">1. dr sci. med. Gordana Radosavljević, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for the narrower scientific field of Microbiology and Imunology, president;2. dr sci. med. Marija Milovanović Марија МИЛОВАНОВИЋ, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for the narrower scientific field of Microbiology and Imunology, memeber;3. dr sci. med. Danilo Vojvodić, Full Professor at Medical Faculty of the Military Medical Academy, University of Defence in Belgrade, for the narrower scientific field of Imunology, memeber;4. dr sci. med. Dejan Vulović, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for the narrower scientific field of Surgery, memeber;5. dr sci. med. Ana Ravić-Nikolić, Assistant Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for the narrower scientific field of Dermatovenerology, memeber;
Commission for evaluation and defense of doctoral disertation:
Date of Dissertation Defense:

ЗАХВАЛНИЦА

Захваљујем се проф. др Марјани Томић-Цанић и проф. др Небојши Арсенијевићу, који су ми пружилили несебичну подршку и разумевање током реализације овог пројекта.

Посебну захвалност бих желела да упутим проф. др Марјани Томић-Цанић у чијој сам лабораторији направила своје прве кораке у свету молекуларне биологије и имунологије, и научила прва слова научног размишљања. Марјана ми је омогућила да одговорим на постављена питања користећи најсавременије технике и експерименталне принципе и стекнем искуство упознајући сваку ћелију коже у потрази за одговорима.

Захваљујем се бројним колегама од којих бих желела да истакнем др Ирону Паштар, др Сашу Вукелића и др Харолда Брема који су самном корачали овим путем и помогли ми у савладавању нових техника и колекцији хуманих узорака за анализу.

Захваљујем се др Владимиру Миловановићу који ми је несебично пружио помоћ при техничкој и логистичкој реализацији овог пројекта.

Неизрециву захвалност дугујем својој породици, посебно својој ћерки Мији, на њиховој несебичној подршци и разумевању и речима охрабрења током свих ових година. Без Вас мој пут у свет науке не би био потпун.

Овај рад посвећујем вама који сте веровали у мене и увек сте ту, поред мене, ма где били и ма колико далеко били.

САЖЕТАК

Епидермис коже човека је вишеслојни плочасти кератинизован епител који се непрекидно обнавља од стране епидермалних матичних ћелија. Ове ћелије се налазе у базалном слоју коже и фоликулу длаке и непрекидно обезбеђују одржавање хомеостазе коже. Епидермалне матичне ћелије такође учествују и у зарастању рана. Познато је да су код пацијената који болују од хроничних венских улцера, кератиноцити на ободима наведених промена измењени и нису у могућности да обезбеде нормално зарастање рана. Овај рад представља проспективну клиничку студију која је обухватила 11 пацијената са хроничним венским улцерацијама у оквиру које је, анализом транскрипционих профила на узорцима хуманог ткива, показано да постоје промене у експресији специфичних гена (GATA3, BMPR1, ID2, ID4, LRIG1 и K15) који регулишу одржавање матичних ћелија и њихову диференцијацију. Смањена експресија ових гена указује на осиромашену популацију епидермалних матичних ћелија.

Губитак епидермалних матичних ћелија у непосредној близини обода ране има за последицу активацију гена који стимулишу високу пролиферацију кератиноцита, смањен потенцијал за њихову миграцију и немогућност зарастања рана.

Кључне речи: хронични венски улкуси; епидермалне матичне ћелије; микрочип техника

ABSTRACT

The skin is the largest organ of human body and is constantly renewing. Epidermal and hair follicle stem cells (ESC) reside in distinct niches are indispensable to skin homeostasis and wound closure. The non-healing edges of venous ulcers (VUs) are healing-incompetent, consisting of hyper-proliferative and non-migratory keratinocytes implicating possible deregulation of ESCs. The genes regulating ESC niches have been studied primarily in mouse models. We employed transcriptional profiling of tissue skin specimens derived from the non-healing edges of VUs, to identify changes in gene expression leading to deregulation of ESCs and their fate in a prospective clinical study of 11 patients. We discovered and confirmed the suppression of the following genes: bone morphogenetic protein receptor 1 (BMPRI) and GATA binding protein 3 (GATA3) and inhibitors of DNA-binding proteins 2 and 4 (ID2 and ID4). In addition, we found down-regulation of leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 1 (LRGIG1), a gene important for maintaining ESCs in a quiescent state, and absence of keratin 15 (K15), a marker of the basal stem cell compartment. These data indicated local depletion of ESCs. We also found diminished levels of phosphorylated glycogen synthase kinase 3 (GSK3), nuclear β -catenin present in keratinocytes and overexpression of its transcriptional target, c-myc, supporting the notion of the activation of the Wnt pathway.

We conclude that loss of genes important for regulation of ESCs and their fate along with nuclear presence of β -catenin and c-myc in the VU may lead to the deprivation of local population of ESC and contribute to a hyper-proliferative, non-migratory wound edge and overall impairment of healing.

Key words: venous ulcers; epidermal stem cells; microarrays

САДРЖАЈ

1.	Увод	1
1.1	Епидермис хумане коже и његова улога у формирању и одржавању баријере 1	
1.2	Међућелијске везе и улога у одржавању баријере	2
1.2.1	Адхерентне везе	2
1.2.2	Чврсте везе (Tight junctions).....	2
1.2.3	Дезмозоми.....	3
1.2.4	Хемидезмозоми	3
1.3	Матичне ћелије коже	3
1.3.1	Сигнални путеви контроле матичних ћелија	5
1.3.2	WNT сигнални пут.....	5
1.3.3	Локална продукција кортизола у епидермису и корену длаке. Активација локалне продукције кортизола, Wnt'a и с-трус протеина прозрокована локалном инфламацијом.....	6
1.3.4	LRIG	7
1.3.5	IDs.....	7
1.4	Егзозоми као тип ћелијске комуникације.....	7
1.5	Улога епидермиса у зарастању рана	8
1.6	Акутне ране	9
1.7	Фазе зарастања ране	9
1.7.1	Коагулација.....	9
1.7.2	Инфламација.....	10
1.7.3	Пролиферација	10
1.7.4	Ремоделирање ожиљка	10
1.7.5	Старење и зарастање рана. Фетално зарастање рана и зарастање рана код старијих лица	11
1.8	Модел системи за изучавање процеса зарастања рана.....	12
1.9	Хроничне ране и венске улцерације	12
1.9.1	Дијабетичне ране	12
1.9.2	Декубитне ране.....	12
1.9.3	Венске улцерације.....	13
1.9.4	Заједничке карактеристике свих хроничних рана	13
2	Циљеви рада.....	14
3	Материјали и методе.....	15
3.1.	Хроничне ране и венске улцерације.....	15
3.2.	Изолација РНК.....	15
3.3.	Анализа експресије гена микрочип техником.....	16

3.4. Снага студије и величина узорка	16
3.5. Статистичка анализа и обрада геномских података	17
3.6. Квантитативни qRT-PCR.....	17
3.7. Хистопатологија и имунохистохемија.....	18
3.8. Изолација протеина и њихова квантификација путем имуноблота.....	18
4. Резултати.....	20
4.1. Анализа експресије гена у кератиноцитима пореклом од узорака ткива узетих са обода хроничних венских улцера и здраве коже.....	20
4.2. Анализа експресије маркера матичних ћелија интерфоликуларног епидермиса.....	22
4.3. Анализа експресије гена одговорних за одржавање популације матичних ћелија фоликула длаке у узорцима ткива узетих са обода хроничних венских улцера..	23
4.4. Морфолошка анализа присуства фоликула длаке у узорцима ткива узетих са обода хроничних венских улцера	26
4.5. Анализа експресије компоненти <i>WNT</i> сигналног пута у узорцима ткива узетих са обода хроничних венских улцера	27
5. Дискусија	29
6. Закључци.....	33
7. Литература	34

1. Увод

1.1 Епидермис хумане коже и његова улога у формирању и одржавању баријере

Хумана кожа је највећи орган људског тела. Она представља јединствену баријеру између спољашњег света и унутрашњих човекових органа. Хумана кожа се састоји од епидермиса и дермиса. Епидермис сачињава спољашњи слој коже чија је улога у формирању и одржавању баријере тј. игра улогу у заштити од утицаја околне средине, у спречавању губитка воде, у одржавању хомеостазе, зарастању рана и рестаурацији баријере [1-3]. Епидермис хумане коже се састоји од вишеслојног рожастог епителијума, интрафоликуларног епидерма и фоликула длаке, лојних и знојних жлезда као и меланоцита, дендритичних ћелија, периферних нервних ћелија и механорецептора. Епидермис се подвргава континуираном самообнављању од базалног ка површинском слоју. Отприлике 90 ~ 95% епидермалних ћелија чине кератиноцити организовани у базални, спинозни, грануларни и корнеални слој који одговарају прогресивним фазама диференцијације.

Базални кератиноцити карактеришу се експресијом кератина 5 и 14 (K5 и K14), и састоје се преваходно од митотички активних кератиноцита, укључујући епидермалне матичне ћелије и пролазне амплифирајуће ћелије и мале популације пост-митотичких ћелија које изражавају ране маркере диференцијације. Базални кератиноцити су структурно и функционално повезани са компонентама базалне мембране помоћу специјализованих ћелијских веза које се називају хемидесмосоми. Кератиноцити током диференцијације доспевају на површину коже пролазећи кроз спинозни, грануларни и корнеални слој са кога бивају одстрањени. У току овог процеса експресија кератина 5 и кератина 14 бива замењена кератинином 1 и кератинином 10 (K1 и K10). Ћелије грануларног слоја препознају се по карактеристичним базофилним кератохијалинским гранулама у цитоплазми састављеној преваходно од кератинских филамената, профилалагрина и лорикрина. Захваљујући њиховој повезаности са филагрином, кератински филаменти се агрегирају и формирају дисулфидне везе, и на тај начин се ствара ћелијска овојница непосредно испод плазма мембране. Поред тога, липиди се накопљају унутар ламеларних тела. За време терминалне диференцијације кератиноцита, плазма мембрана и ћелијске органеле, укључујући језгро, се распадају. Присуство калцијума активира ензим трансглутаминазу тако да протеини као што су инволукрин и лорикрин бивају крослинковани, што резултира тврдом, нерастворљивом ћелијском овојницом. У међувремену, липиди који излазе у међућелијски простор формирају континуирани липидни матрикс, који спајаја корнеоците. Ова структура која подсећа на „циглу и малтер“ игра велике улоге у функцији епидермиса. ЈеднаТНарушен интегритет површине коже је узрок многим дерматолошким обољењима као што су atopски дерматитс и хроничне ране. Суседни кератиноцити су такође повезани кроз *tight junctions*, *adheres junctions* и десмосомима. На крају, кроз процес десквације, дисоцирани корнеоцити, ћелије последњег слоја епидермиса које су без нуклеуса, се одвајају у спољну околину што доприноси континуираном обнављању површине коже.

Основни циљ диференцијације јесте формирање и одржавање баријере. Пролазећи кроз стадијуме диференцијације кератиноцити губе ћелијско једро и хемијским условавањем протеина и липида заједно са остатцима ћелијске мембране формирају баријеру. Константан процес диференцијације обезбеђује хомеостазу и одржавање баријере.

Процес диференцијације изискује губитак ћелија епидермиса који се надокнађује активацијом епидермалних матичних ћелија (енгл. *Epidermal Stem Cells*, ESC) што обезбеђује обнављање кератиноцита.

Обнављање коже и њена хомеостаза зависе од активности кератиноцита и популације епидермалних матичних ћелија чија активност и судбина су регулисани специфичним микроокружењем, или нишом којом су окружене [2, 4].

1.2 Међућелијске везе и улога у одржавању баријере

Главна особина епителијалних ћелија је да формирају физичку баријеру која има улогу у одвајању и изоловању различитих ткива, као на пример кожа, која служи као баријера између унутрашњих органа и спољашње средине. Међућелијске везе имају кључну улогу у формирању и одржавању интегритета епителијалне баријере.

Типови међућелијских веза који учествују у формирању и одржавању интегритета коже су адхерентне везе (*adherens junctions*), чврсте везе (*tight junctions*) и дезмосоми. Скорашња истраживања су показала да међућелијске везе не доприносе само структурном интегритету, него имају и улогу сигналних молекула и места за које се везују (eng. *docking site*) различите везикуле које онда ћелија ингестује.

1.2.1 Адхерентне везе

Адхерентне ћелијске везе се простиру преко целог обима ћелије и налазе се испод чврстих веза. За разлику од чврстих веза, где су две мембране спојене, код адхерентних веза мембране су раздвојене простором величине 20 нанометара. Овај тип веза се налази како у ћелијама епителијалног порекла, тако и у другим типовима ћелија. Како им само име каже, адхерентне везе су круцијалне за иницијацију и одржавање међућелијске адхеције у ткиву. Адхерентне везе се састоје од две основне структурне јединице, нектин афадинског комплекса и кадхерин катеннн комплекса. Иако се на основу структуре адхерентних и чврстих веза може претпоставити да су ови типови веза стабилни и непромењиви, дпоказано је да су оба типа међућелијских веза изузетно динамичке структуре чак и у терминално диференцираним ћелијама епидермис.

Адхерентне везе имају улогу у одржавању механичке стабилности кератиноцита. Наиме, код мишева код којих је епидермис дефицијентан за једну од компоненти ових веза, α - катенин, као последица неправилне адхеције и губитком адхерентних веза долази до одвајања епидермиса. Поред тога, делеција Е- кадхерина у епидермису доводи до губитка длаке у кожи миша као последица губитка међућелијске везе.

1.2.2 Чврсте везе (*Tight junctions*).

Чврсте везе су мултипротеински комплекси који се простиру читавим обимом ћелије. Међућелијски мембрански простор чврстих веза је у потпуности слепљен због чега се овај комплекс, е.г. тип веза назива и зонула оклуденс. Чврсте везе чине три типаструктуралних мембранских компоненти, IgG- слична фамилија адхерентних молекула ћелијских веза (*IgG-like family of junctional adhesion molecules*),клаудини и оклудини. Овај тип међућелијских веза је присутан код већине кичмењака. Рожаста слој коже (*stratum corneum*) физички одваја организам од спољашње средине и спречава прекомерно губљење воде. Имајући ово у виду, дуго се сматрало да чврсте везе немају

никакву улогу у одржавању хомеостазе епидермалне баријере коже, упркос експресији компонената ових веза у епидермису. Међутим, показано је да мишеви дефицијентни за протеин клаудин-1 губе драматичне количине воде кроз епидермис, доказујући да чврсте везе учествују у спречавању губљења воде из организма. Наиме, мишеви дефицијентни за клаудин-1 задржавају нормалне функције рожастог слоја, али су им оклудинске баријере у грануларном слоју коже нефункционалне. Показано је такође, у моделу миша, да и прекомерно повећана експресија протеина клаудин-6 доводи до дефекта у епидермалној баријери који су повезани са променом у чврстим везама. Поред клаудина – 1 и клаудина -6, и други клаудини су експримирани у кожи и сматра се да имају улогу у селективном транспорту малих молекула кроз кожу.

1.2.3 Дезмозоми

Дезмозоми представљају тип међућелијских веза које учествују у ћелијској адхезији и који су неправилно распоређени у ћелији. Дезмозоми се састоје од протеина из фамилије катхерина, чланова Армадило протеинске фамилије и протеина названог десмоплин.

Дезмозоми су повезани са интермедијалним цитоскелетним филаментима и самим тим представљају део мреже која даје механичку чврстину ћелији. Овај тип веза највише је заступљен у епидермису и миокарду. Тј. ткивима која су константно под утицајем механичких сила. Када се дезмозомална адхезија изгуби, као што је случај у неким генетским и аутоимуним обољењима, ткива која су под утицајем механичког стреса се могу десинтегирати. Самим тим, комплекс дезмозоми – интермедијални филменти омогућава интегритет тих ткива.

1.2.4 Хемидезмозоми

Хемидезмозоми имају улогу у повезивању екстрацелуларног матрикса са ћелијом и у очувању структуре ткива и интегритету. У кожи, хемидезмозоми имају улогу у адхезији кератиноцита за базалну мембрану. Истраживања су показала да се хемидезмозоми састоје од протеина и да је $\alpha\beta 4$ интегрин, један од основних компонената хемидезмозома веома важан у организацији цитоскелета ћелије као и да учествује у регулацији динамичке адхезије ћелија, пролиферацији, диференцијацији и апоптози. Њихова улога је показана у процесу развоја, зарастања рана и туморској инвазији. Они су такође важни сигнални молекули, а показано је да дефекти и потпуни недостатак протеина који сачињавају хемидезмозоме доводи до тешких козних обољења које се карактерису формирањем пликава.

1.3 Матичне ћелије коже

Регенеративни капацитет коже ослања се на локалну популацију матичних ћелија епидерма. У здравој кожи, популација матичних ћелија налази се у стању мировања, и тако бива сачувана од нежељених деоба и диференцијације ћелија који могу да доведу до смањења њихових резерви [2]. Матичне ћелије се налазе у специфичним микроколима, нишама матичних ћелија, које регулишу њихову активност и судбину. До данас, познато је да постоје три нише епидермалних матичних ћелија које су лоциране у фоликулу длаке, основи лојних жлезда и базалном слоју интерфоликуларног епидерма [4]. У нормалним хомеостатским условима, свака дискретна ниша матичних ћелија надопуњава свој властити одељак ткива.

Предложено је да унутар интерфоликуларног епидерма постоји хијерархија која се састоји од споро цикличких матичних ћелија у базалном слоју које производе популацију транзитних амплифирајућих ћелија које пролазе ограничен број подела док се пењу кроз супрабасални слој. Међутим постављен је алтернативни модел у којем један потомак има могућност да се подели на две недиференциране базалне ћелије, две терминалне ћелије за разликовање или по једну од сваке врсте. Још увек није у потпуности јасно да ли матичне ћелије интерфоликуларног епидерма дају ћелије потомке (енгл. *progenitor cells*) које се састоје од ћерке ћелије која одржава популацију матичних ћелија и ћерке ћелије која наставља да се дели и терминално диференцира или егзистирају као један тип ћелија потомака [4], [5]. У оба случаја, важно је истаћи да ове ћелије имају способност самообнављања и диференцијације, што доприноси хомеостазу и очувању целовитости епидермиса.

У нормалним хомеостатским условима, епидермалне матичне ћелије понашају се унипотентно што подразумева искључиво одржавање свог ткива, док, као одговор на повреду, матичне ћелије у оквиру интерфоликуларног епидерма и фоликула длаке дају ћерке ћелије које мигрирају и врше реепителизацију дефекта [6], [7]. Претходна истраживања су показала значај матичних ћелија пореклом из фоликула длаке у процесу реепителизације акутних рана [7]. Ове ћелије нису неопходне за потпуно затварање ране јер се вероватно ово постиже регрутовањем епидермалних ћелија из интерфоликуларног епидерма [6]. Новији докази који подржавају ово запажање и који су у складу са присуством хијерархије потомака матичних ћелија у интерфоликуларном епидерму, указују на то да су матичне ћелије које се споро деле, а не ћелије транзиторно у деоби, те које дугорочно обезбеђују зацељење оштећеног ткива [8]. Из свега наведеног може се закључити да је присуство функционалних матичних ћелија, пореклом од интерфоликуларног епидерма и фоликула длаке, од суштинског значаја за хомеостазу коже и зарастање рана.

Показано је да матичне ћелије пореклом из фоликула длаке имају способност да диференцирају и у друге типове ћелија, као што је доказано у студијама регенерације периферних нерава и кичмене мождине након повреде, што доприноси сазнању да фоликул длаке може бити значајан извор матичних ћелија за аутологно коришћење адултних матичних ћелија у регенеративној медицини [9], [10]. Једно од поља медицине у оквиру кога је регенеративна терапија од изузетне важности јесте третман хроничних рана. Регенеративна терапија матичним ћелијама је од изузетне важности у третману хроничних рана поготово ако се има у виду да је примена фактора раста и трансплантације коже у чак 50% хроничних рана које перзистирају дуже од годину дана непримењива [11], [12]. Терапеутска улога епидермалних матичних ћелија је недавно показана у клиничкој пилот студији, где су фоликули длаке пореклом са главе аутологно трансплантирани на доње експремитете убрзали епителизацију венских улцерација. Такође, недавно истраживање показало је да апликација хуманих алогених кератиноцита и фибробласта у форми спреја се може успешно користити као терапија за нелечене венске улцере. Свакако, даљи увид у механизам деловања терапија на бази ћелија потребан је за боље разумевање и одређивање оптималне употребе [13-15]. Све ово јасно указује на потребу истраживања улоге матичних ћелија у зарастању хроничних рана и откривања регулаторних механизма који би допринели развијању нових терапијских метода у лечењу овог облика рана.

1.3.1 Сигнални путеви контроле матичних ћелија

Различити сигнални путеви контролишу ћелијску судбину матичних ћелија. Најбитнији корак у одржању популације матичних ћелија је строго регулисани однос између процеса само-обнављања и диференцијације матичних ћелија. WNT/ β -катенин, *c-myc*, GATA3, GSK3 β и BMP1 су само неки од механизма који су укључени у одржавање овог баланса.

1.3.2 WNT сигнални пут

WNT сигнални пут је важан механизам трансдукције сигнала како током ембриогенезе тако и у адултном стадијуму развића. Неки од процеса који су регулисани овим сигналним путем су пролиферација и диференцијација ћелија, детерминација телесне осе и синаптичка пластичност [16].

WNT фамилија гена кодира факторе раста који су одговорни за важне развојне и хомеостатске процесе [16]. WNT фактори раста могу да стимулишу неколико различитих интрацелуларних, трансдукционих путева. Неканонски WNT сигнални пут се односи на сигналне путеве у којима долази до активације малих GTPаза и регулације актинског цитоскелета. Канонски WNT сигнални пут посредован је преко протеина β -катенина [16].

1.3.2.1 β -катенин

β -катенин има двоструку улогу у ћелији. У комплексуса цитоплазматичним доменом E- кадхерина и α -катенина повезује ове протеине са актинским цитоскелетом [17]. Поред тога, β -катенин представља кључни молекул канонског WNT сигналног пута у ком транскриптора Tcf (T-cell factor)/Lef (lymphocyte enhancing factor) транскрипцијске факторе у једру [17]. Неки од гена активираних овим сигналним путем су *c-myc*, *c-jun*, фибронектин, циклин D1 и *fra-1* [17]. У нормалним, нерансформисаним ћелијама β -катенин је присутан у адхерентним, међућелијским везама и врло мало је заступљен у једру.

У одсуству WNT сигнала, цитоплазматски β -катенин је заробљен у великом протеинском комплексу који чине Axin, APC (APC-Adenomatous polyposis coli) и GSK3 β (kinaza гликоген синтазе) [17].

Овај комплекс се назива и деструктиван јер је GSK3 β неопходан за фосфорилацију серина на N-терминусу β -катенина. Фосфорилисани β -катенин тако бива препознат за протеозомалну деградацију. Када је WNT сигнал одсутан Tcf/Lef протеини су везани са промоторе WNT циљаних гена у комплексу са транскрипционим корепресорима чиме се инхибира транскрипција WNT циљаних гена [17].

Везивањем WNT лиганата за транскрипционе рецепторе долази до инактивације деструктивног комплекса, тј. активације протеина Dishevelled (Dsh) у цитоплазми [16]. Активирани Dsh протеин инактивира GSK3 β , што доводи до акумулације цитоплазматског β -катенина који се онда транслоцира у једру где интерагује са Tcf/Lef [16]. Као резултат везивања β -катенина за Tcf је активација експресије циљаних гена.

Канонски WNT/ β -катенин сигнални пут има важну улогу у самообнављању, диференцијацији и опстанку матичних целија [18].

1.3.2.2 *c-myc*

C-myc ген је откривен као хомолог ретровирусном *v-myc* онкогену пре 40 година [19]. Убрзо је откривено да *c-myc* има функцију прото-онкогена [20]. Делације *c-myc* гена доводе до ембрионалне леталности код миша што указује на његов значај током развића [21]. Инактивација *c-myc* у фибробластима пацова доводи до значајног продужења времена потребног да се број ћелија удвостручи, што указује да овај ген има централну улогу у регулацији ћелијске пролиферације [22]. Поред битне улоге у пролиферацији, *c-myc* има важну улогу у одржавању популације матичних ћелија. Наиме, *c-myc* регулише однос између само-обнављања и диференцијације матичних ћелија [23].

1.3.2.3 *GATA 3 and GSK3b*

GATA3 протеин има функцију транскрипционог фактора. Овај протеин има битне улоге како током ембрионалног развића, тако и за одржавање хомеостазе адулта [24, 25]. *GATA3* регулише улазак матичних ћелија хематопоеетске лозе у ћелијски циклус доприносећи одржавању популације матичних ћелија [25]. Овај транскрипциони фактор има кључну улогу у усмеравању диференцијације матичних ћелија коже у специјализоване, терминално диференциране ћелија коже [26]. Поред тога, *GATA3* је експримиран у кератиноцитима где учествује у њиховој диференцијацији и успостављању и одржавању интегритета епидермалне баријере [24].

GSK3b је мултифункционална серин/треонин киназа која, у већини ћелија, има преко 100 познатих таргета/супстрата за фосфорилацију [27]. С обзиром на број супстрата јасно је да је ова киназа део различитих сигналних путева, да контролише различите ћелијске процесе и да је укључена у патогенезу многих болести [27]. Поред тога, *GSK3b* регулише преживљавање, пролиферацију, адхезију и диференцијацију матичних ћелија [28].

1.3.2.4 *BMPI1*

BMPI1 (Bone morphogenetic protein type I receptor) је трансмембрански протеин који припада класи серин/треонин киназних рецептора. Овај протеин регулише различите процесе који су укључени у одређивање судбине ћелије како током ембрионалног развића, тако и код адулта. *BMP* сигнални пут има кључне улоге у одржавању популације епителијалних матичних ћелија, као и регулацији диференцијације епителијалних прогенитора [29]. Експресија *BMPI1* у епителијалном ткиву је неопходна за правилну морфогенезу зуба [30]. *BMPI1* регулише терминалну диференцијацију и пролиферацију постнаталних фоликула длаке [30]. Утишавање експресије овог гена у ћелијама дермалне папиле доводи до губитка њиховог потенцијала да се диференцирају у ћелије фоликула длаке чак и у присуству епителијалних матичних ћелија [29].

1.3.3 Локална продукција кортизола у епидермису и корену длаке. Активација локалне продукције кортизола, *Wnt'a* и *c-myc* протеина прозрокована локалним инфламацијом.

Иако је добро знано да глукокортикоиди испољавају инхибиторни ефекат на процес зарастања рана, показано је да саме ћелије епидермиса коже синтетишу ове хормоне [31].

Кератиноцити експримирају ензиме неопходне за синтезу најпознатијег хуманог глукокортикоида, кортизола [31]. Оно што синтезу кортизола у кератиноцитима чини још комплекснијом је регулација продукције овог хормона током зарастања рана. Продукција кортизола у кератиноцитима који се налазе на ободима рана је индована интерлеукином-1 β (IL-1 β), проинфламаторним цитокином који се продукује у току друге фазе зарастања акутних рана, фази инфламације. Инхибиција синтезе глукокортикоида убрзава зарастање рана *in vivo* указујући да је модулација синтезе кортизола у епидермису један од битних механизма током процеса зарастања рана. Поред тога, глукокортикоиди, преко мембранског рецептора, активирају β -катенин сигнални пут и с-тусекспресију у епидермису и на тај начин супримирају миграцију кератиноцита и зарастање рана [32].

Са друге стране, инхибиција синтезе кортизола током зарастања рана повећава продукцију IL-1 β указујући да присуство кортизола у епидермису током зарастања рана може представљати контролу интензитета инфламаторног одговора [31].

1.3.4 LRIG

LRIG1 (*Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1*) је трансмембрански протеин који је маркер интрафоликуларних епидермалних матичних ћелија код човека. Овај протеин помаже одржавању дорматног, успаваног стања матичних ћелија. LRIG1 је таргет тус гена, а губитак LRIG-а повећава пролиферативни капацитет матичних ћелија и резултује у хиперпролиферацији епидермалних ћелија *in vivo*. LRIG1 позитивне ћелије су мултипотентне и од њих могу да настану све ћелије епидермалне линије коже [33].

1.3.5 IDs

ID (*Inhibitor of DNA binding*) протеини припадају класи “*helix-loop-helix*” транскрипционих регулатора. Ови протеини су укључени у различите ћелијске процесе, укључујући ћелијску диференцијацију, миграцију и инвазију. Активност ових транскрипционих регулатора је уско повезана са патогенезом разних тумора. ID протеини су такође, укључени у пролиферацију епителијалних матичних ћелија. [34, 35].

1.4 Егзозоми као тип ћелијске комуникације

Традиционални поглед на међућелијску комуникацију подразумева да суседне ћелије интерагују преко ћелијских веза. Удаљене ћелије комуницирају помоћу секретованих, солубилних фактора, као што су хормони и цитокини. Поред тога, електрични и хемојски сигнали (нпр. нуклеотидим липиди и тако даље) су саставни део ћелијске комуникације. Најновија истраживања су показала да ћелије поседују још један механизам укључен у међућелијску комуникацију а то су екзозоми [36].

Екзозоми су микровезикуле димезиј од 30 нанометара до 50 нанометара у пречнику. Ове микровезикуле идентификоване су први пут у међућелијском простору 1980-тих година. Непосредно након њиховог откривања сматрало се да ћелија користи екзозоме као вид ослобашања од продуката који јој више нису потребни или су оштећени те су екзозоми били препознати само као део механизма укљученог у одржавање ћелијске хомеостазе.

Поред тога, сматрало се да њихово ослобађање нема никаквог утицаја на ћелије у околини. Скорашња истраживања су међутим показала да ове екстрацелуларне везикуле имају функцију у преношењу протеина, липида и нуклеинских киселина до циљних ћелија које преузимају садржај екзозома различитим механизмима. Пријем екзозома доводи до промене ћелијског понашања као и фенотипа циљаних ћелија. Имајући ово у виду, екзозоми су препознати као вид међућелијске комуникације која има значајне улоге у најразличитијим ћелијским процесима, као што су имуни одговор ћелије, сигнална трансдукција и прелентовање антигена [36].

Екзозоми могу бити ослобођени из сваке еукариотске ћелије, те се самим тим садржајкоји они носе разликује у зависности од типа ћелије која је секретовала екзозоме, као и од тренутног стања саме ћелије (нпр. стадијум диференцијације, да ли ћелија подвргнута стресу, да ли је ћелија неопластично трансформисана и тако даље). Самим тим, екзозоми и биолошки активан материјал унутар њих могу представљати у будућности могу представљати прогностичке и дијагностичке маркере.

Екзозоми секретовани из мезенхималних матичних ћелија имају велики утицај на процес зарастања рана [37]. Наиме, резултати многих истраживања показали су да екзозоми пореклом од мезенхималних матичних ћелијастимулишу процес зарастања рана. Ови екзозоми промовишу процес пролиферације, миграције, и ангиогенезе у оштећеном ткиву, акутној рани. поред тога они контролишу процес инфламације реукују формирање оживљеног ткива. Имајући ово у виду, сматра се да екзозоми пореклом од матичних ћелија представљају нови, ефикасни приступ у терапији хроничних рана у будућности.

1.5 Улога епидермиса у зарастању рана

Након механичке повреде коже, пошто је баријера нарушена, кератиноцити на ивици ране бивају активисани, и из својих резервоара секретују цитокине који стимулишу долазак полиморфонуклеарних ћелија из циркулације на место повреде. То даље подспешује кератиноците који слично полиморфонуклеарним ћелијама настављају да секретују цитокине и факторе раста. Експресија кератина у кератиноцитима се мења, и кератиноцити у овом стадијуму експримирају кератин 6 (К6) и кератин (К16) на ободима ране, који им омогућавају миграцију према средишту ране где је епидерм оштећен како би епитализовали огољени слој коже.

Да би поправили дефект, кератиноцити на ободима акутних рана морају прво да ослободе ћелијске везе са суседним кератиноцитима и базалном ламином како би могли мигрирати преко привремено депонованог матрикса. Многобројни регулатори као што су фактори раста, интегрини, хемокини и матрикс металопротеиназе модулирају миграцију кератиноцита. Након миграције првог слоја кератиноцита који покрију огољени слој епидерма једнослојним епителом, базални кератиноцити пролиферишу и својом пролиферацијом обезбеђују адекватну количину ћелија неопходну за адекватно зарастање ране. У том процесу на ободима венских рана нагомилани кератиноцити крећу да у једном слоју мигрирају преко свежег матрикса.

Да би процес миграције почео, интеракција између ћелија мора се растопити. Хемидесмосоми који везују базалну мембрану са базалним слојем кератиноцита такође морају бити растављени да би се омогућила миграција као и десмосоми који повезују кератиноците између себе. Алфа6 бета4 ($\alpha 6\beta 4$) интегрин који је експримиран на базалним кератиноцитима везује се за изоформу ламинина званог ламинин-5 у ламини

денси базалне мембране, доприносећи адхезивном својству хемидесмосома. Када кератиноцити почну мигрирати, долази до преласка са $\alpha\beta 4$ на алфа3 бета1 ($\alpha 3\beta 1$) интегрин који помаже миграцији кератиноцита и везивању са ламинин 5, омогућавајући на тај начин несметано кретање кератиноцита у циљу зарастања ране.

Вишеструки регулатори као што су фактори раста и цитокини, интегрини, кератини, матричне металопроотеиназе (ММП), хемокини и ванћелијске макромолекуле модулирају миграцију кератиноцита. Епидермални фактори раста, попут HB-EGF (*heparin binding- epidermal growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*) and TGF- α (*transforming growth factor alpha*), директно активирају EGFR (*epidermal growth factor receptor*) који стимулише миграцију и пролиферацију кератиноцита и индукује експресију К6 и К16. С друге стране, наше лабораторије су показале да глукокортикоиди могу блокирати миграцију посредовану EGF-ом потискивањем транскрипције К6 / К16.

Да би рана успешно зацелила, кератиноцити би требали бити у стању да се не само одвоје од основне базне ембране, већ и да се крећу и мигрирају кроз фибрин и ново синтезисани екстрацелуларни матрикс ране, процес за који су неопходни ензими који се називају матрикс металопроотеиназе (ММП). Укључени ММП су ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-10, ММП-14, ММП-19, ММП-28, ММП49, 50'. ММП-1, који је присутан на ивицама ране, помаже миграцију кератиноцита по колагену 1. Цитокини и фактори раста излучени током процеса зарастања рана такође подстичу производњу ММП-а. Још важније, оптимална миграција кератиноцита током затварања ране зависи од строге регулације ММП-а и њихових инхибитора, инхибитора металопроотеиназа.

1.6 Акутне ране

Акутне ране су учестали здравствени проблем. Популационе анализе су показале да од акутних рана пати око 11 милиона особа годишње смо у Америци, од којих 30000 бива хоспитализовано.

Акутни процес зарастања рана је прецизно организован и контролисан процес који води ка репарацији оштећеног ткива и у којем различити типови ћелија као што су тромбоцити, кератиноцити, ћелије имуног система, фибробласти, ћелије фоликула длаке имају кључну улогу у поновном успостављању ткивног интегритета. Процес зарастања рана је подељен у четири просторно и временски преклапајуће фазе; коагулацију, инфламацију, пролиферацију и ремоделовање оживљеног ткива [3].

1.7 Фазе зарастања ране

1.7.1 Коагулација

Прва фаза у зарастању рана је коагулација. Убрзо након настанка ране, површинског оштећења коже, тромбоцити се везују за иштећене крвне судове иницирајући хемостатску реакцију и формирање крвног угрушка. Формирани крвни угрушак спречава, са једне стране, прекомерно крварење, док са друге стране представља иницијалну, приремену заштиту ране.

Поред тога тромбоцити који се налазе у окружењу ране секретују различите факторе раста, факторе преживљавања, као и факторе који воде апоптози ћелија. Кључни фактори које тромбоцити секретују током фазе пролиферације су PDGF (*platelet-derived*

growth factor) i TGF- α 1 and TGF- α 2 (*transforming growth factors α 1 and 2*) који делују као хемоатрактанти за имуне ћелије [38, 39].

1.7.2 Инфламација

Фаза инфламације започиње миграциом имуних ћелија на место повреде под утицајем хемоатрактаната оји продукују оштећени кератиноцити на ободима ране, као и тромбоцити из циркулације. Неутрофили су прве ћелије имуног система које мигрирају на место повреде у року од неколико минута након повреде коже и задржавају се у региону ране наредних два дана. Неутрофили заједно са тромбоцитима учествују у формирању крвног угрушка сто покреће каскаду догађаја која као последицу има формирање крвног угрушка и секрецију хемоатрактаната који утичу на друге типове имуних ћелија [3, 39].

Неутрофили који су мигрирали на место повреде секретују IL-6 који има вањну улогу у иницијацији зарастања рана. Наиме, IL-6 има митогени и пролиферативни утицај на кератиноците, а истовремено служи и као хемоатрактант за неутрофиле. Поред неутрофила, леукоцити и макрофаги долазе привучени цитокинима на место повреде. Имуне ћелије продукују слободне радикале кисеоника који имају анимикробијску функцију, као и пролазе које уклањају страна тела и бактерија из подручја ране. Макрофаги у подручје ране бивају привучени

MCP-1 (*Macrophage Chemoattractant Protein*) хемоатрактантом који је пристан у кератиноцитима и промовише миграцију не само макрофага него и Т ћелија на место повреде. Фаза инфламације се завршава апоптозом имуних ћелија [38, 39].

1.7.3 Пролиферација

При крају инфламационе фазе започиње фаза пролиферације. Током ове фазе сигнали раста који су секретовани од стране имуних ћелија, кератиноцита и фибробласта делују аутокринно и паракринно сто доводи до пролиферације и истовремене миграције ћелија коже.

Ови процеси доводе до формирања гранулационог ткива и епителизације базе ране. За миграцију и пролиферацију дермалних и епидермалних ћелија у акутној рани неопходна је адекватна васкуларизација која ће обезбедити нутријенте за високо метаболички активне митотске ћелије. Самим тим, да би процес зарастања рана ефикасно одиграо неопходно је адекватно успостављање и одржавање ангиогенезе. Ангиогенеза започиње убрзо након самог настанка ране. Сигнали за индукцију овог процеса су локална хипоксија и оштећење крвних судова на месту повреде који доводе до продукције про-ангиогених фактора. VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor 2*) и PDGF су централни медијатори ангиогенезе на месту повреде. У одговору на про- ангиогене факторе ендотелијалне ћелије деградују базалну мембрану, мигрирају ка месту повреде, пролиферишу, успостављају међућелијске везе и финално формирају нови крвни суд [3, 38, 39].

1.7.4 Ремоделирање ожиљка

Формирање нових крвних судова на месту повреде представља погодно микорозкружење за пролиферацију и миграцију епидермалних и дермалних ћелија, што доводи до реепителизације ране и успостављању интегритета епидермиса.

Фибробласти који пролиферишу у подручју ране синтетички екстрацелуларни матрикс и гранулационо ткиво које је богато новим крвних судовима. Новоформирани екстрацелуларни матрикс се састоји углавном од колагена III, фибронектина, фибрина и хијалуронске киселине. Овај матрикс постепено бива замењен екстраћелијским матриксом који се углавном састоји од колагена типа I. Недуго затим долази до контраховања ране и ремоделирања матрикса. Контракција ране се постиже активношћу диференцираних фибробласта или миофибробласта, који као одговор на TGF- α , тензију ткива и присуство одређених матриксних протеина формирају актинске стрес филаменте. Контрактилне силе настале у фибробластима се затим преносе у екстраћелијски матрикс помоћу интегринских рецептора. Рана се може контрховати и као последица реорганизације екстрацелијског матрикса [38, 39]. Овај динамичан процес подразумева циклусе формирања и деградације екстрацелијског матрикса. Кључну улогу у овом процесу имају ремоделирајући ензими матрикса MMP. Ремоделовање матрикса током зарастања рана омогућава стварање погодног микроокружења које фаворизује одређене фазе зарастања рана (нпр. Ремоделирање матрикса ће створити микроокружење које ће омогућити адекватне услове за фазу пролиферације кератиноцита). На крају фазе ремоделирања долази до индукције апоптозе у фибробластима, што доводи до формирања ацелуларног ожињеног ткива чија је тензиона моћ слична неоштећеној кожи. Још увек није довољно јасно који механизми доводе до програмиране ћелијске смрти фибробласта током ремоделовања гранулационог ткива. Резултати различитих истраживања указују на то да TNF- α (*Tumor Necrosis Factor α*) и FGF2 могу да доведу до повећања броја апоптотских ћелија у финалној фази зарастања рана. Неадекватна апоптоза дермалних ћелија у финалној фази зарастања рана може довести до стварања хипертрофичног ожиљка и келоида [38, 39].

1.7.5 Старење и зарастање рана. Фетално зарастање рана и зарастање рана код старих лица

Заједничка карактеристика већине пацијената који болују од хроничних рана је да су ови пацијенти старијег доба. Истраживања спроведена на здравим мишевима и људима показују да процес старења негативно корелише са зарастањем рана [38, 39]. Сматра се да старење повећава ризик за настанак хроничних рана, поготово када је у комбинацији са другим коморбидитетима као што су дијабетес, побисен притисак и исхемија. Показано је да старење може довести до промене микробиома коже што последично може да доведе до смањене способности зарастања рана. Хормони, поготово естрогени и андрогени доприносе старењу. Показано је да ови хормони представљају важне регулаторе зарастања рана. Старији пацијенти мушког пола имају највећу инциденцу за развој венских улцерација. Ова инциденца корелира са смањеним нивоом естрогена [38].

За разлику од успореног, отежаног зарастања рана код старијих особа, зарастање рана код фетуса се дешава веома ефикасно и без стварања ожиљка. Протеоглигани, колагени и фактори раста који се експримирају током феталног зарастања рана су различити него у адултним ранама. Мање диференцирано стање феталне коже, као и минимална инфламација током процеса зарастања су важне карактеристике одговорне за зарастање рана без стварања ожиљног ткива. Поред тога, феталне ране се одликују присуством високог нивоа хијалуронске киселине, као и бршжом и ефикасном депозицијом колагена. Разумевање процеса зарастања рана без стварања ожиљка има битну клиничку примену у модулисању болести са присуством фиброзе као и код формације ожиљка након неадекватног зарастања рана [38].

1.8 Модел системи за изучавање процеса зарастања рана

Репарација ткива је универзални процес који се дешава код свих вишећелијских организама. Конзервирани механизми који диригују ивум процесом се самим тим могу анализирати уз помоћ разних животињских модела. Резултати ових истраживања се могу екстраполирати на клиничку примену код људи.

Процес зарастања хуманих рана је најсичнији зарастању рана код свиња, те се самим тим експериментални модел свиња доста коисти у ове сврхе. Међутим због компликоване анестезје у хирурских процедура као и немогућности генетске манипулације, и троскова одржавања овог модела, у експрименатлане сврхе се чешће користе мањи глодари, претежно модел миша, пацова и зеца. Поред глодара, *Drosophila* и зсебра рибица се често користе као модели са проучавање патогенезе зарастања рана. Коришћење ова два модела даје велику могућност за генетско манипулисање [39].

Процес реепителиализације ране се такође може изучавати на хуманом ткиву уз помоћ *ex vivo* технике или генерисањем органотипичне 3D структуре која се састоји из дермиса кога чине примарни хумани фибробласти, епидермиса састављеног од хуманих, примарних кератиноцита, и екстрацелијског матрикса састављеног од колагена типа I.

1.9 Хроничне ране и венске улцерације

Хроничне ране, укључујући и венске улцерације и проблеми са којима се здравство суочава при њиховом третману довели су до епидемије храночних рана и негативно се одражавају на квалитет живота болесника који од њих пате. Три типа хроничних рана са којима се медицински радници најчешће срећу су хрнични венски улцери, дијабетичне ране и декубиталне ране.

1.9.1 Дијабетичне ране

Дијабетес мелитус је метаболичка болест која је асоцирана са немогућношћу правилног зарастања рана. Тренутна преваленца за настанак дијабетес типа 2 је 6.4% са предиспозицијом да до 2030.год. буде 8% на нивоу светске популације. Отежано зарастање рана код пацијената са типом дијабетес 2 може бити последица дефицијенције инсулина, хипергликемије, хиперлипидемије, перифералне неуропатије, као и гојазности. Најчешћа клиничка индикација отежаног зарастања рана која је асоцирана са дијабетесом су дијабетичне ране које се јављају на стопалима (ДФУ). 2-3% пацијената са дијабетесом ће развити ДФУ сваке године, док ће 15% пацијената са дијабетесом развити ДФУ током живота [38].

1.9.2 Декубитне ране

Декубитне ране су зоне некротичног ткива на кожи које су узроковане непрекидним притиском на меко ткиво током дугог временског периода. Главни фактори који доприносе настајању декубитних рана су биомеханичке силе, влажност и локална исхемија. Овај тип хроничних рана се најчешће јавља код пацијената са више различитих обољења, као и код старије популације, поготово оних који су непокретни или слабо покретни. И поред мале стопе преживљавања пацијената са декубитним ранама, ефикасна терапија за овај тип хроничних рана и даље не постоји [38].

1.9.3 Венске улцерације

Венске улцерације су најчешћи форма хроничних рана на доњим деловима ногу. Инциденца настанка венских улцерација је повећана за 3-4% код старијих особа (старији од 65 година). Молекуларни механизми који се налазе у основи хроничних венских болести и венске хипертензије које воде ка липодерматосклерозе, структуралној и функционалној измени доњег дела ноге и настанку улцерације су још увек недовољно истражени. Скорашња истраживања указују да дуготрајна инфламација, инхибиција миграције кератиноцита, измењени сигнални путеви, као и нерегулисана експресија специфичних микро- РНА се налазе у основи ове болести [38].

1.9.4 Заједничке карактеристике свих хроничних рана

Испитивањем узорака ткива са ивица хроничних улцерација показано је да су кератиноцити на ивицама хроничних рана различити и фенотипски и биолошки од кератиноцита који се налазе у нормалном епидерму а и од кератиноцита које се налазе на ивицама акутних рана. За разлику од нормалне коже, где митотски активни кератиноцити бораве само у базалном слоју, кератиноцити у хроничним ранама подлежу дељењима и у супрабазалним слојевима. У претходним истраживањима показано је да кератиноцити присутни у ободу венских улцерација хиперпролиферишу и нису у могућности да обезбеде зарастање ране [40-42], што указује на поремећај у регулацији епидермалних матичних ћелија и њихове микросредине. У прилог овоме говори и то да повећана експресија протеина с-тус у епидерму код миша доводи до масивне пролиферације и диференцијације кератиноцита, што за последицу има смањење резерве популације матичних ћелија [42-44]. То је у складу са претходним запажањем да је ниво иРНК с-тус-а повећан у епидерму хроничних рана [42]. Кератин 15 (K15) [46] и протеин LRIG1 (енгл. *leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein1*) [47] окарактерисани су као потенцијални маркери епидермалних матичних ћелија у оквиру интерфоликуларног епидермиса. BMPR1a (енгл. *morphogenetic protein receptor1*), GATA3 (енгл. *GATA binding protein 3*) и ID2, ID4 (енгл. *inhibitors of DNA-binding protein 2 and 4*) су познати као гени који регулишу епидермалне матичне ћелије и њихову судбину у оквиру фоликула длаке [48]. До сада није познато каква је експресија ових гена у ободима хроничних венских улцерација. Клиничком опсервацијом се јасно уочава одсуство длака у околини хроничних рана [48, 49], што је навело на размишљање и формулисање хипотезе да је пул епидермалних матичних ћелија по ободима хроничних венских улуса смањен. Како би се ово испитало урађена је клиничка студија на 11 пацијената и том приликом анализирана експресија неколико маркера епидермалних матичних ћелија.

2 Циљеви рада

У циљу истраживања везаних за настанак и развој хроничних венских улцерација у оквиру овог рада постављени су следећи специфични циљеви:

1. Утврдити профил експресије гена у узорцима коже са обода хроничних венских улцерација и упоредити са здравом хуманом кожом у циљу проналажења гена који су различито регулисани.
2. Испитати експресију маркера карактеристичних за матичне ћелије у оквиру интерфоликуларног епидермиса.
3. Утврдити профил експресије гена одговорних за одржавање популације матичних ћелија фоликула длаке у узорцима ткива узетих са обода хроничних венских улцера.
4. Испитати експресију компоненти WNT сигналног пута у узорцима ткива узетих са обода хроничних венских улцера.
5. Извршити морфолошку анализу и испитати присуство фоликула длаке у узорцима ткива узетих са обода хроничних венских улцера.

3 Материјали и методе

3.1. Хроничне ране и венске улцерације

Здрава хумана кожа. С обзиром на потешкоће у прикупљању узорака коже доњих екстремита особа са здравом кожом, која је у транслационој медицини чест проблем, у овом истраживању коришћени су узорци коже добијене током редукционе мамопластике и абдоминопластике. Узорци су добијени према прописаном протоколу који је одобрен од стране Етичког одбора институције. У стерилним условима са узорака коже добијене током редукционе мамопластике и абдоминопластике уклоњена је субкутана масноћа (120 mm×50 mm). Епидермис и дермис сваког узорка сачуван је на неколико различитих начина 1) један део коже је сачуван у агенсу *RNA later* (Ambion/Applied Biosystems, Austin, TX) који чува активност рибонуклеинске киселине ради њене изолације; 2) други део коже је замрзнут у течном азоту ради касније изолације протеина или 3) сачуван у тзв. ОСТ (енгл. *optimal cutting temperature*) медијуму даљу имунохистохемијску обраду.

Венске улцерације. У оквиру ове студије коришћене су биопсије коже са обода венских улцерација пореклом од три мушка и осам женских пацијената, који су добијени приликом хирушке обраде, такозваног дебридмана ране при чему се део коже са обода ране одстрањује оштрим предметом, скалпелом, како би се омогућило зарастање рана [40]. Сви пацијенти који су учествовали у студији су старији од 18 година, а млађи од 80 година старости, са Артеријско Брахијалним индексом (АБИ): 0,9 и без дијабетеса. Пацијенти су морали да имају хронични венски улцер који је био присутан дуже од шест месеци. Пре биопсије/дебридмента сваке ране кожа око улцерације је очишћена Бетадин раствором а након тога опрана стерилном водом. Добијени узорци коже венских улцера су припремљени на следећи начин: део ткива је постављен у ОСТ медијум (*Tissue Tek, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA*) и затим смрзнут у течном азоту за даљу имунохистохемијску обраду, део ткива је сачуван у формалину за даљу обраду и постављање у парафин и за даљу имунохистохемијску обраду, а део ткива замрзнут је за изолацију протеина или сачуван у *RNA later* медијуму за будућу изолацију рибонуклеинске киселине. Узорци коже венских улцерација су стандардизовани према методи која је описана раније [42]. Узорци су бојени хематоксилином и еозином ради потврде присуства епидерма и дерма у сваком од узорака. Сви узорци добијени са обода венских улцерација су имали све претходно описане карактеристике ткива: хиперпролиферативни, хиперкератотични и паракератотични епидермис типичан за обод хроничних рана [40, 48- 49].

3.2. Изолација РНК

Изолација и пречишћавање РНК из здраве коже и коже венских улцерација изведена је уз помоћу *miRVana* кита за изолацију РНК (Ambion/Applied Biosystems, Austin, TX) по протоколу приложеном уз реагенсе. Контрола квалитета изоловане РНК је утврђена коришћењем AGILENT биоаналитичне машине (*Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA*) којим се утврђује РНК интеграциони број (*RIN*-РИН) који служи као мера квалитета РНК. Само узорци са РНК интеграциони бројем већим од 5 коришћени су за даље експерименталне анализе.

3.3. Анализа експресије гена микрочип техником

Уз помоћ реверзне транскриптазе, 5 μg укупне РНК преведено је у цДНК, амплификовано и обележено у складу са протоколом [50] уз помоћ аутоматизованог *GeneChip*[®] (*Affimetrix, Grand Island, NY*) уређаја за анализу генске експресије. Овај уређај се састоји се од хибридационе пећи, аутоматизоване јединице за испирање и бојење *GeneChip*[®] (енгл. *GeneChip*[®] *Fluidics station*), уређаја за читање *GeneChip*[®]-а високе резолуције (*Agilent Gene Array scanner, Hewlett-Packard*) и компјутера са одговарајућом програмском подршком. Укратко, обележена цДНК је хибридована са HGU95Av2 микрочипом (*Affimetrix, Grand Island, NY*). Микрочип је испран и обојен анти-биотин-стрептавидин-фикоеритрин обележеним антителима коришћењем *Affimetrix* јединице за испирање и бојење, а за читање резултата је коришћен *Agilent Gene Array Scanner (Hewlett-Packard)*. Необрађени подаци су потом анализирани коришћењем *Genespring 13* софтвера. Анализа *GeneChip* плочица изводи се коришћењем *Affimetrix* програма и *Genespring* софтвера који садржи низ сложених поступака. Основни квантитативни податак који се добија анализом је вредност интензитета сигнала која је пропорционална колични транскрипта у испитиваном узорку. Поређењем вредности интензитета сигнала проба на чип плочици са којима су хибридовани испитивани узорци разлике у нивоу експресије гена између два узорка су затим били квантификовани. Једна плочица притом се означава као експериментална, а друга као основна. Пре поређења потребно је нормализовати плочице због могућих техничких и биолошких фактора насталих током експеримената. Технички фактори који могу утицати на разлике су следећи: квантитет и квалитет означене хибридоване РНК, разлике у реагенсима, бојењу и руковању плочицом. Биолошки фактори који могу утицати на резултате произилазе углавном из разлика у генетској предиспозицији, дужини трајања улцерације, итд. Пажљивим планирањем експеримената, стандардизовањем протокола за обележавање, хибридацију и нормализацију, споменуте разлике могу се значајно смањити. У овом раду коришћени су стандардни експериментални протоколи, а експерименти су рађени симултано (хумана кожа и кожа са обода венских улцера). У *Affimetrix* сугерисаним протоколима, као *MAS5 (MicroArray Suite)*, нормализација се изводи коришћењем групе проба које представљају гене са већ познатим сигналом и који је једнак у свим ћелијама (енгл. *Housekeeping genes*). Један ген на плочици је представљен са више различитих проба. Приликом прерачунавања вредности интензитета група проба, контролне и експерименталне плочице постављају се на исту циљну вредност интензитета (енгл. *target intensity*) која најчешће износи 100. Упоредивање сигнала изводи се помоћу поступка којим се рачуна износ вредности интензитета сигнала група проба на две различите групе плочица, а може се приказати као однос експресије (енгл. *expression ratio*), однос промене (енгл. *fold change*) или као логаритамска вредност односа експресије (енгл. *log₂ expression ratio*), при чему се користи логаритам 2.

3.4. Снага студије и величина узорка

Величина узорка је израчуната на основу података о нивоу експресије ID4 анализираних qRT-PCR-ом у нормалном и туморском ткиву у студији сличног дизајна [51]. Студијски узорак је израчунат узимајући вредност за алфа 0.05 и за снагу студије 0.8 за *Student*-ов *t* тест (два независна узорка), поредећи групе међу собом (у оба смера), према статистичком програму *G*Power3*. На основу претпоставке која захтева највећи узорак, односно очекиване најмање разлике у испитиваним параметрима између експерименталних и контролних група, утврђен је број узорака према групама и он

износи 11 за сваку од група. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (*Student*-ов *t* тест за два независна узорка) између две групе испитаника, са снагом студије $\geq 80\%$.

3.5. Статистичка анализа и обрада геномских података

Након што се претходно описаним поступцима утврдило да је дошло до разлике у експресији неког гена, у даљој анализи су коришћени статистички тестови којима се утврђује да ли је та разлика статистички значајна. Важно је одредити најприкладнији статистички тест. Већина статистичких тестова може се сврстати у параметријске и непараметријске, а њихова употреба зависи да ли је расподела података нормална. У случају нормалне расподеле података, за анализу се користе параметријски тестови попут *t*-теста, а у случају да расподела није нормална користе се непараметријски тестови попут Mann-Whitney теста и теста суме рангова (Wilcoxonov *t*-test). У случају да се експресија гена упоређује на више група плочица, а не само на експерименталним и основним/контролним, користи се параметријски тест анализе варијансе (ANOVA) или непараметријски Kruskal-Wallisov тест. При анализи експресије одређеног гена најчешће се користи *t*-тест којим се процењује да ли је разлика просечне вредности интензитета скупова проба на експерименталним и на основним плочицама статистички значајна. С обзиром на то да просечна вредност на експерименталним плочицама може бити већа и мања од просечне вредности на основним/контролним плочицама, користи се двосмерни *t*-тест (енгл. *two-tailed test*). Надаље, ако се на основним плочицама користи РНК прикупљена од здравих контрола, користи се независни *t*-тест (енгл. *unpaired t-test*), а ако се користи РНК из поновно прикупљених узорака од истих болесника, користи се парни *t*-тест (енгл. *paired t-test*). Спровођењем *t*-теста добија се *p*-вредност (енгл. *p-value*) и ако је она била мања од 0.05, разлика је сматрана статистички значајном. Међутим, ако се *t*-тест спроводи много пута, као што је то случај у анализи експресије гена, то би значило да од 10 000 гена чак њих 500 показује разлику у експресији случајно. Стога се при анализи експресије гена користе још и контролне методе, као што је Benjamini-Hochberg метода, помоћу којих се смањује број гена који показују лажну разлику у експресији, која је и примењена при анализи експресије гена у овом истраживању.

3.6. Квантитативни qRT-PCR

За qRT-PCR реакцију 0.5µg тоталне РНК из здраве коже и венских улцерација је преведено у комплементарну ДНК (cDNK) уз помоћ *Omniscript Reverse Transcription kit* (Qiagen, Valencia, CA). Реакција qRT-PCR је рађена у Opticon2 апарату (Bio-Rad, Hercules, Ca) и помоћу реакционог микса који је у себи имао *SYBR Green* обележене нуклеотиде (*iQ SYBR Green Supermix* (Bio-Rad, Hercules, CA). Релативна експресија гена је нормализована у односу на експресију *HPRT1* гена.

У експериментима су коришћени следећи олигонуклеотиди:

- *HPRT1F*: 5'-AAAGGACCCACGAAGTGTT-3'
- *HPRT1R*: 5'-TCAAGGGCATATCCTACAACAA-3'
- *LRIG1F*: 5'-CTGGACGCGGAGCCTAAAC-3'
- *LRIG1R*: 5'-GCTGCGAATCTTGTTGTGCTG-3'

- *BMPR1aF*: 5'-TCAGACTCCGACCAGAAAAAGT-3'
- *BMPR1aFR*: 5'-TGGCAAAGCAATGTCCATTAGTT -3'
- *GATA3F*: 5'-GTGCTTTTTAACATCGACGGTC-3'
- *GATA3R*: 5'-AGGGGCTGAGATTCCAGGG-3',
- *ID2F*: 5'-GACCCGATGAGCCTGCTATAC- 3'
- *ID2R*: 5'-AATAGTGGGATGCGAGTCCAG-3'
- *ID4F*: 5'-CGCTCACTGCGCTCAACAC- 3'
- *ID4R*: 5'-TCAGGCGGCCGCACACCT-3'

3.7. Хистопатологија и имунохистохемија

Сечењем узорака ткива на микротому (*HM 315, Carl Zeiss*) добијени су пресеци дебљине 6 μm који су након тога постављени на микроскопске плочице. Применом ксилена пресеци су девоскирани, а након тога рехидрирани и испрани са 1x фосфатним пуфером (1x PBS). На овакав начин пресеци су припремљени за бојење хематоксилином и еозиним или за имунохистохемију. У циљу откривања антигена, пресеци укалупљени у парафин су загревани на 95°C у одговарајућем раствору под називом *Target Retrieval Solution (DAKO Corporation, Carpinteria, CA)* у воденом купатилу након чега су испирани и третирани са 0.1% H_2O_2 у метанолу 30 минута. Потом су пресеци испрани водом и 5% BSA (албумин пореклом из серума говечета) и инкубирани са анти-ID2 - анти-ID4 антителима (*Santa Cruz, CA*) у 5% BSA/1x PBS, преко ноћи на 4°C.

На замрзнутим узорцима коже урађена је и имунохистохемијско бојење антителима специфичним за *GATA3*, *K15* и β -катенин. Плочице са пресецима коже дебљине 5 μm фиксирани су или у 4% параформалдехиду 10 минура (*GATA3*) или 1 минут у хладном ацетону (*K15* и β -catenin). Пресеци су блокирани са 5% BSA. Мишја моноклонска антителима која специфично препознају *GATA3* (*Santa-Cruz, Santa Cruz, CA*) или *K15* [21] као и поликлонално зечје антителима које детектује фосфорилисану форму β -catenin-а (*AbCam, Cambridge, MA*) су растворена у 5% BSA/1x PBS и инкубирани преко ноћи на 4°C. Пресеци су затим инкубирани са секундарним антителима *Alexa Fluor* медијумом (*Invitrogen, Carlsbad, CA*) у трајању од 1 h на собној температури. У негативној контроли уместо примарног антителима употребљен је преимуни серум а по један пресек је инкубиран без примарног антителима као додатна контрола. Сви узорци су третирани пропидијум јодидом или 4',6-Диамидино-2-фенилиндолом (*Vector Labs, Burlingame, CA*) у циљу визуелизације нуклеуса. Пресеци су посматрани под *Nikon Eclipse E800* микроскопом, а дигиталне слике хистопатолошких пресека ткива ране су добијене коришћењем *Spot RT* камере и *SPOT-Camera Advanced* програма.

3.8. Изолација протеина и њихова квантификација путем имуноблота

За изолацију протеина из здравих узорака коже и венских улцера коришћен је комерцијално доступни *Tissue-PE LB* кит (*Genotech, South San Francisco, CA*) са додатком протеазних и фосфатазних инхибитора 1mM phenylmethylsulfonyl fluorid,

20mM glycerophosphat, 8 mM sodium pyrophosphate, 1 ug/ml leupeptin, 1 ug/ml pepstatin A, and 1 ug/ml aprotinin (*Roche, IN*). Нормализација лизата је урађена у односу на укупну концентрацију протеина Брадфордском методом и чувани на -80°C . Екстракти протеина су кувани 5 минута у пуферу за узорке ($2\times$ *Laemmli sample buffer*, *Sigma, St. Louis, MO*) а затим су раздвајани 10% SDS-PAGE електрофорезом. Трансфер протеина на нитроцелулозну мембрану (*VWR*) вршен је на волтажи од 100V током 1h у трис/глицинском пуферу за трансфер. Мембрана је затим блокирана са 5% BSA у TBS-у (Ph 7,4) (engl. *Tris Buffered Saline*, *Sigma, St. Louis, MO*) током 1 сата на собној температури а потом је инкубирана са примарним антителима, специфичним за anti-*c-myc* antitelo (*Abcam Inc., MA, USA*) и *GAPDH* (*Santa Cruz, CA, USA*), преко ноћи на 4°C . Укупни ћелијски лизат из *Jurkat* ћелија (*Santa Cruz, CA, USA*) коришћен је као експериментална позитивна контрола.

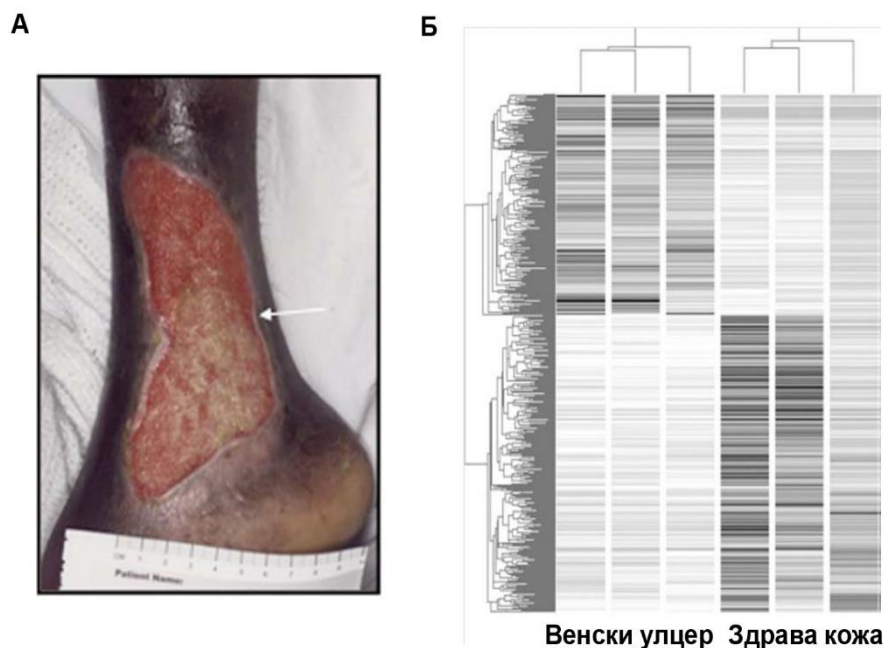
Мембране су затим пране 3 пута по 5 минута у TBS /0.1% Тритон X-100 и два пута у TBS-у а затим инкубиране један сат са одговарајућим секундарним антителима. Као секундарно антителима коришћено је анти-зечије антителима коњуговано са пероксидазом рена (*Santa Cruz, CA, USA*), а за визуелизацију имунских комплекса је примењен *Super Signal West Pico* хемилуминесцентни субстрат (*Pierce, IL, USA*). Експозиција филма којим је вршена детекција сигнала рађена је у складу са упутством произвођача (*HyBlot CL, Denville Scientific, Inc., South Plainfield, NJ*).

4. Резултати

4.1. Анализа експресије гена у кератиноцитима пореклом од узорака ткива узетих са обода хроничних венских улцера и здраве коже

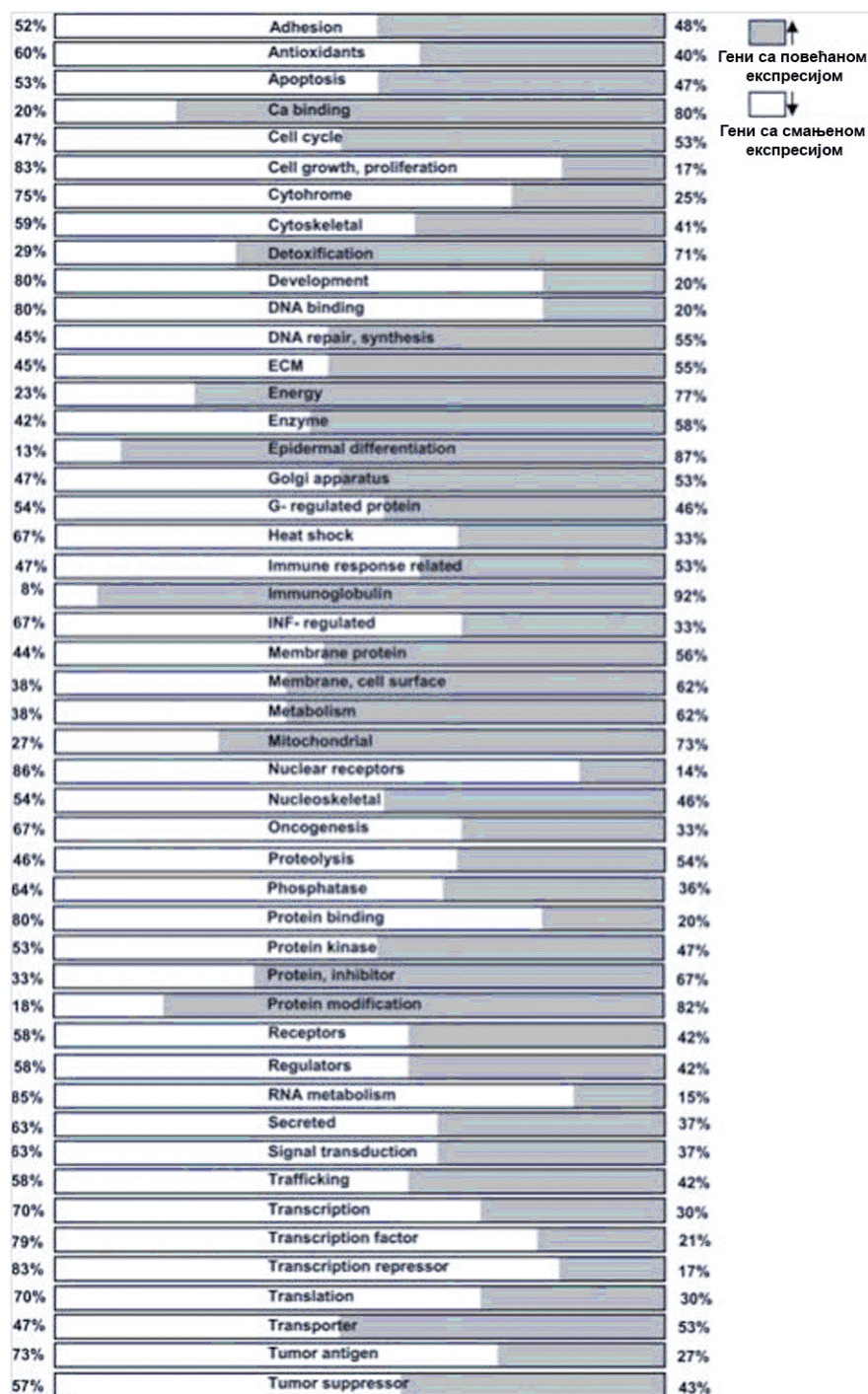
Током претходних истраживања на различитим типовима хроничних улцера показано је да узорци ткива узети са обода наведених промена имају специфичну морфологију. Наиме, епидерм са обода венских улцера показује знаке хиперпролиферације, хипер- и паракератозе и присуство митотски активних ћелија у супрабазалном слоју коже [43, 51]. Такође, показано је да активација *c-myc* и нуклеарна локализација β -катенина у епидермису код пацијената са хроничним улцерима доводе до заустављања миграције кератиноцита и доприносе нарушавању процеса зарастања ране [43]. Ове промене указују на поремећај у једном од два процеса који доприносе хомеостазу епидермиса а то су активација и диференцијација кератиноцита.

Како би се испитало да ли су ови процеси у кератиноцитима поремећени код хроничних венских улцера у овој студији употребљена је микроереј технологија. Ова техника омогућава симултано праћење експресије великог броја гена поређењем узорака здравих и оболелих ткива, у овом случају нормалне хумане коже и коже добијене са обода хроничних венских улцерација. Међусобним поређењем могу се издвојити гени или читаве групе гена одговорне за биолошке процесе који су дерегулисани и указују на могућу патогенезу различитих оболења.



Слика 4.1 А: Пример венског улцера коришћеног у овој студији на коме је стрелицом означено место биопсије ткива коришћено у микроереј анализи. **Б:** Генетичко стабло које приказује различит образац експресије гена у узорцима ткива пореклом од венских улцера (лево) и здраве коже (десно).

У току овог истраживања урађено је поређење експресионих профила гена у здравој хуманој кожи са експресијом гена у узорцима ткива пореклом од хроничних венских улцера. Пример локализације узоркованог ткива из кога је изолована РНК за микроереј анализу приказан је на Слици 4.1А. Добијени резултати микроереј анализе приказани су на Слици 4.1Б при чему је идентификована статистички значајна промена у експресији 1557 гена.

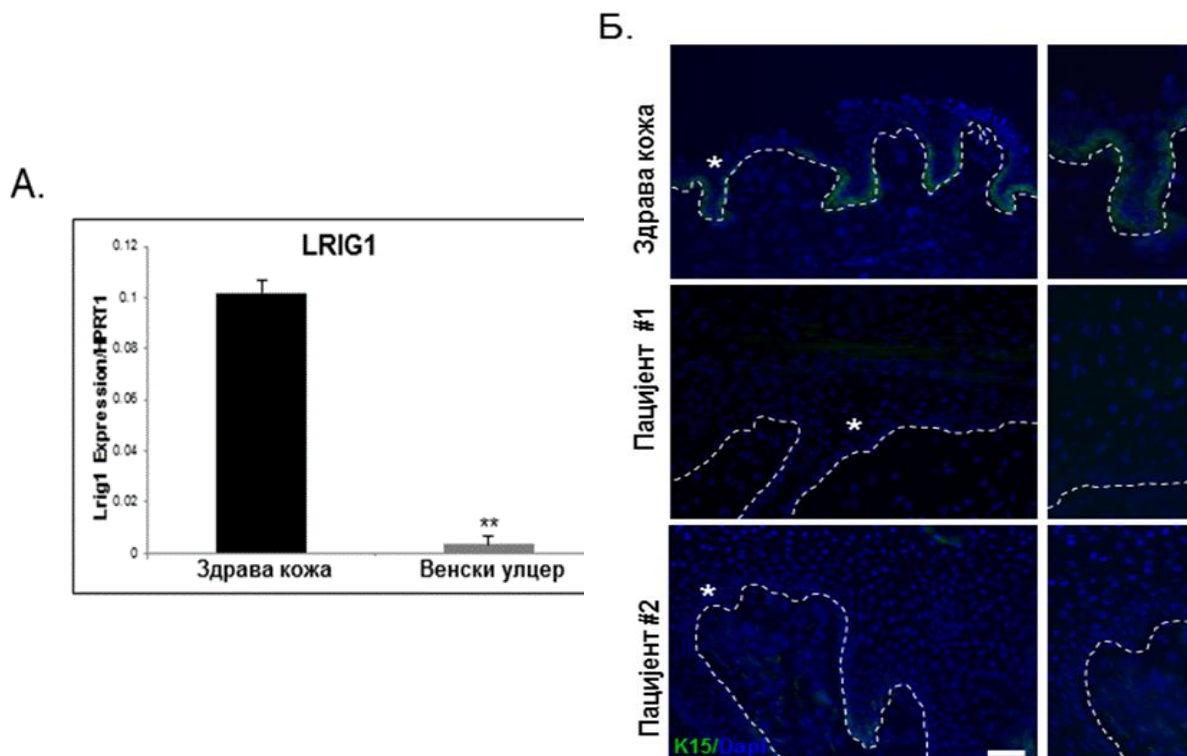


Слика 4.2: Процент гена који показују промењену експресију у узорцима ткива пореклом из хроничних венских улцера и здраве коже сортирани према биолошкој функцији. Сивом бојом је означен проценат гена који показују повећану експресију а белом бојом проценат гена који показују смањену експресију.

Ови гени кодирају протеине укључене у велики број различитих ћелијских процеса (Слика 4.2) што указује да је механизам настанка хроничних венских улцера сложен и подразумева синергистичке догађаје у кератиноцитима који доводе до промена чија је крајња последица поремећај у њиховој активацији и диференцијацији што доводи до неадекватног зарастања рана и развоја хроничних улцерација. Једну од главних улога у нормалној активацији и диференцијацији кератиноцита играју матичне ћелије епидермиса. У експерименталним радовима из различитих лабораторија претходно је показано је да поремећена регулација гена који су битни за одржавање нормалне функције ових ћелија игра улогу у настанку разних обољења коже.

4.2. Анализа експресије маркера матичних ћелија интерфоликуларног епидермиса

Како би се утврдило присуство епидермалних матичних ћелија и њихових регулаторних механизма у оквиру интерфоликуларног епидермиса урађена је анализа експресије *LRIG1* гена који представља маркер интерфоликуларних матичних ћелија који има улогу у одржавању матичних ћелија у стању мировања [46-54].



Слика 4.3 Анализа експресије *LRIG1* и *K15* гена у венским улцерима и поређење са здравом кожом.

А) Анализа експресије *LRIG1* у венским улцерима ($n=11$) и поређење са експресијом у здравој кожи методом *qRT-PCR*; $**p \leq 0.01$.

Б) Имунофлуоресцентно бојење антителом специфичним за *K15* протеин указује на комплетно одсуство *K15* протеина у узорцима венских улцера, за разлику од здраве коже где је *K15* експримиран у базалном слоју епидермиса. Звезда означио увећано поље приказано са десне стране. Скала величине 50 μ m.

qRT-PCR-ом је показано да је експресија овог гена значајно смањена у узорцима ткива пореклом од венских улцера у поређењу са здравом кожом (Слика 4.3А). У циљу даље карактеризације присуства епидермалних матичних ћелија у оквиру интерфоликуларног епидермиса и фоликула длаке испитана је експресија K15 гена који је познат као маркер епидермалних матичних ћелија [55]. Методом имунохистохемије утврђено је одсуство експресије овог гена у узорцима ткива пореклом од венских улцера за разлику од здраве коже где је експресија K15 гена потврђена у базалним кератиноцитима (Слика 4.3Б). Добијени резултати указују на поремећену регулацију експресије маркера матичних ћелија који су одговорни за одржавање ових ћелија у интерфоликуларном епидермису.

4.3. Анализа експресије гена одговорних за одржавање популације матичних ћелија фоликула длаке у узорцима ткива узетих са обода хроничних венских улцера

Даља анализа је била усмерена на испитивање групе гена који су одговорни за основне биолошке процесе кератиноцита, а то су активација и диференцијација, при чему је показано да је експресија гена маркера активације кератиноцита повећана, што се пре свега односи на гене који регулишу процес пролиферације ћелије тј. ћелијски циклус. Микроереј анализом је показано да гени регулатори ћелијског циклуса, како они који врше активацију ћелијског циклуса тако и његову репресију, имају промењену експресију указујући на губитак способности ћелије да овај процес регулише на адекватан начин. Такође, показано је да маркери ране и касне диференцијације кератиноцита имају промењену експресију што указује да ни овај процес није правилно регулисан. Наведене промене у експресији гена, као и њихова потврда *qRT-PCR*-ом и методом имунохистохемије указују да кератиноцити на ободима венских улцера нису у могућности да регулишу своју пролиферацију и диференцијацију што резултује задебљалим, хиперпролиферативним, хипер- и паракератотичним епидермисом [42].

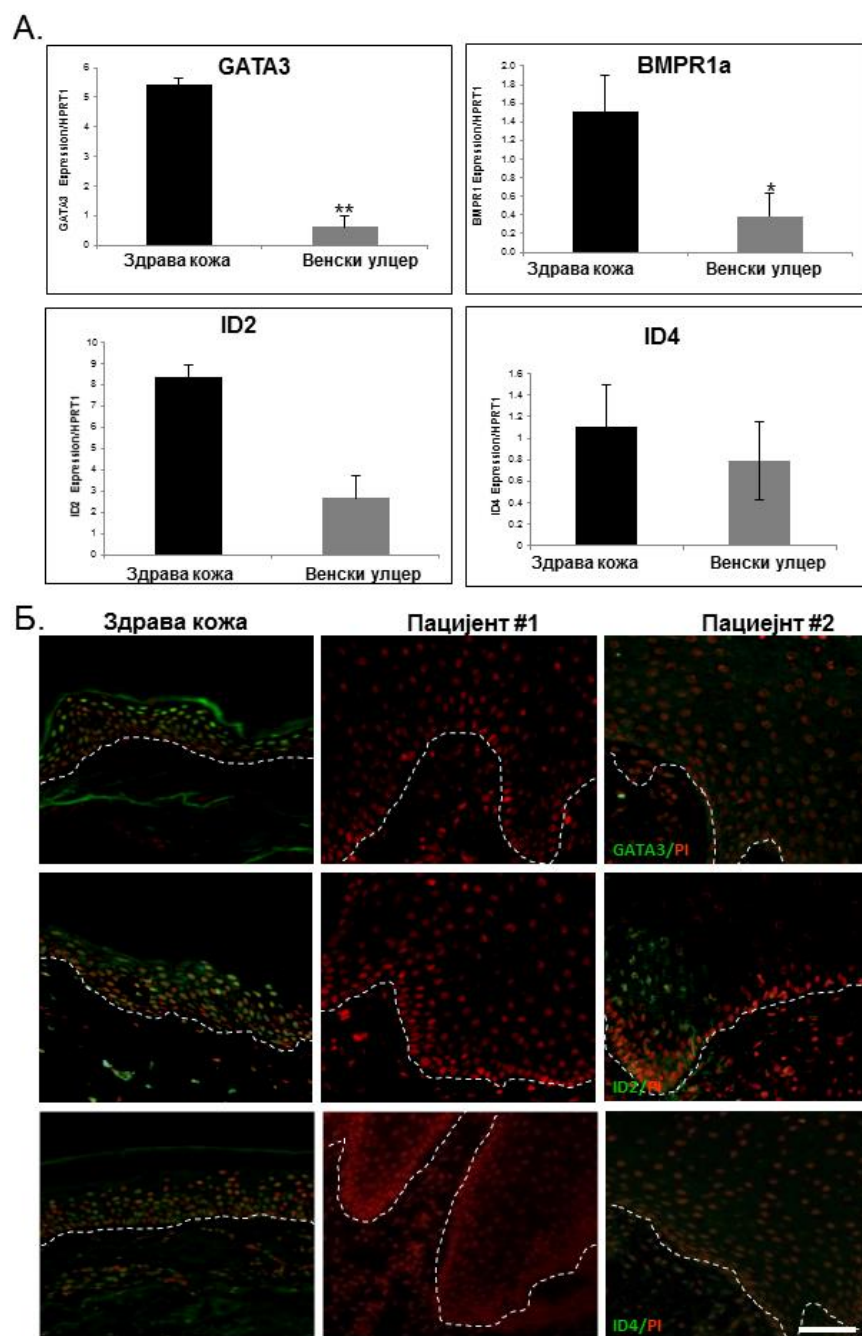
На основу добијених резултата микроереј техником, примећено је да гени одговорни за одржавање нише матичних ћелија такође имају измењен профил експресије. Листа издвојених гена и њихов опис дат је у Табели 4.1. Показано је да највећи број гена показује смањење експресије док један од њих, *MUCBP*, протеин директно укључен у сигналну *MUC*- каскаду има повећану експресију у узорцима ткива пореклом од венских улцера. Сви наведени гени учествују у одржавању матичних ћелија фоликула длаке у стању мировања.

Табела 1. Листа гена одговорна за одржавање нише матичних ћелија са измењеним профилем експресије у венским улцерима

Листа гена за које је познато да учествују у одржавању нише епидермалних матичних ћелија (<i>Fold change</i> - ниво промене: ВУ#/здрава кожа)	Симбол гена	Назив/опис гена	Функција
-8.13	GATA3	<i>GATA binding protein 3</i>	Протеин укључен у процес транскрипције
-2.02	TBX1	<i>T-box 1</i>	Регулаторни протеин (транскрипциони фактор)
-3.30	BMPRI	<i>bone morphogenetic protein receptor, type IA</i>	Рецептор
+2.61	MYCBP	<i>c-myc binding protein</i>	Регулаторни протеин укључен у „ <i>myc</i> “ сигналној каскади
-7.52	ID2	<i>inhibitor of DNA binding 2, helix-loop-helix protein</i>	Регулаторни протеин (репресор транскрипције)
-70.42	ID4	<i>inhibitor of DNA binding 4, helix-loop-helix protein</i>	Регулаторни протеин (транскрипциони фактор)

У циљу потврде резултата добијених микроереј техником, експресија гена *BMPRIa*, *GATA3*, *ID2*, и *ID4* је додатно анализирана qRT-PCR-ом. Том приликом је потврђена смањена експресија ових гена у узорцима ткива пореклом из венских улцера у односу на експресију у здравој кожи (Слика 4.4А).

Такође, имунохистохемијом је показана смањена једарна локализација *ID2* и *ID4* протеина, као и потпуно одсуство *GATA3* протеина у свим узорцима пореклом од венских улцера (Слика 4.4Б), док је на пресецима контролних узорака здраве коже њихова експресија детектована широм епидермиса. На основу добијених резултата закључено је да у узорцима хроничних венских улцера постоји смањена експресија главних регулаторних протеина који обезбеђују стање мировања матичних ћелија присутних у фоликулу длаке.



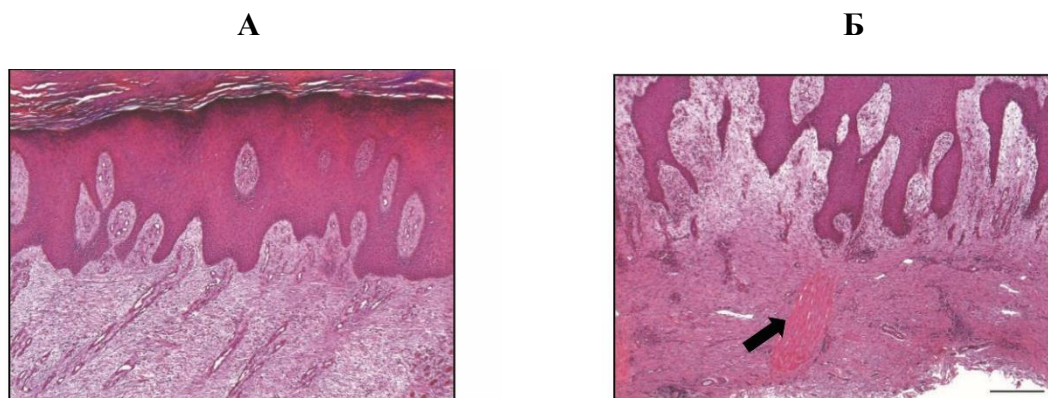
Слика 4.4 Анализа експресије маркера који контролишу стање мировања епидермалних матичних ћелија на ободу венских улцера.

A) *qRT-PCR* анализа експресије *GATA3*, *BMPR1a*, *ID2* и *ID4* у венским улцерима и здравој кожи. Сви резултати су приказани као средња вредност \pm *SD* (стандрдна девијација) укупно 10 ткива венских улцерација и 4 узорка здраве коже.
* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

B) Репрезентативни приказ резултата имунохистохемијског бојења који указује на смањену једарну локализацију *ID2* и одсуство *ID4* и *GATA3* у узорцима ткива венских улцера у поређењу са здравом кожом. Скала величине 50 μ m.

4.4. Морфолошка анализа присуства фоликула длаке у узорцима ткива узетих са обода хроничних венских улцера

У циљу идентификације присуства матичних ћелија урађена су хистохемијска бојења хематоксилином и еозином како би се детектовало присуство фоликула длаке у узорцима ткива венских улцера. Узорковање је вршено тако да су за анализу били доступни како епидерм, тако и папиларни и ретикуларни дерм. Морфологија ткива обојена на описан начин код пацијената са хроничним венским улцерима указала је на карактеристични образац који се одликује хиперпролиферативним епидермом и присуством дермалне фиброзе. Ова анализа је урађена на узорцима ткива пореклом од свих пацијената при чему је на 11 узорака утврђено потпуно потпуно одсуство фоликула длаке. Код једног пацијента примећено је присуство мишића подизача длаке (*musculus arrector pilli*) који је код сисара увек лоциран уз фоликул длаке. Иако је констатовано присуство овог мишића сам фоликул длаке није примећен (Слика 4.5). Ови резултати су у потпуности у сагласности са литературним подацима [56] који указују да постоји потпуно одсуство длаке у ткиву које окружује венску улцерацију. Овај хистолошки резултат у потпуности употпуњује клиничку слику одсутва длаке у околном ткиву. Такође, овај резултат је у корелацији са примећеном смањеном експресијом гена одговорних за одржавање нише матичних ћелија фоликула длаке у ткиву које окружује венски улцер.



Слика 4.5 Одсуство фоликула длаке и хиперпролиферативног епидермиса је карактеристично за ткиво које окружује венски улцер. А) Типичан хистолошки изглед здравог ткива. Б) У једном од 11 узорака примећено је присуство мишића подизача длаке (црна стрелица), али не и присуство фоликула длаке.

4.5. Анализа експресије компоненти *WNT* сигналног пута у узорцима ткива узетих са обода хроничних венских улцера

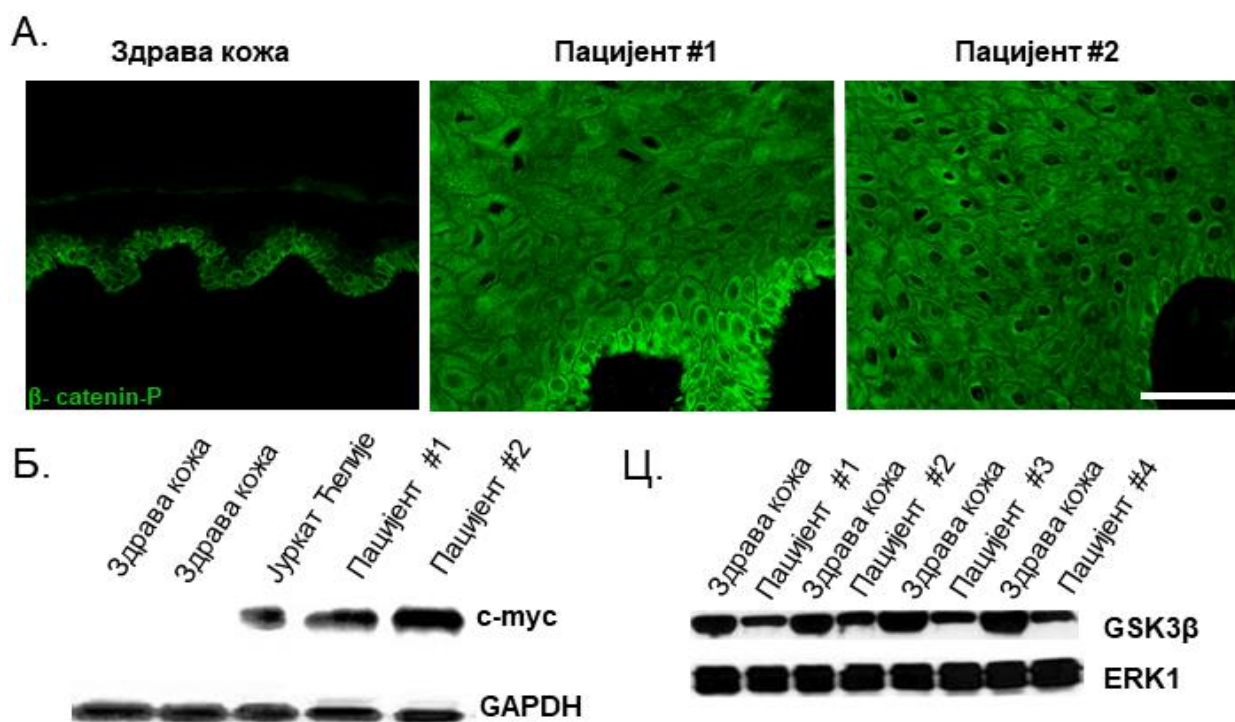
Wnt фамилија секреторних гликопротеина је једна од најважнијих фамилија сигналних молекула која учествује у регулацији различитих аспеката развоја, као што је развој костију, мишића, ангиогенеза и метаболизам липида и глукозе. Познато је да пренос сигнала *Wnt* путем учествује и у настанку многих патофизиолошких стања али и у регулацији судбине матичних ћелија [57].

У претходним истраживањима, методом имунохистохемије показана је једарна локализација β -катенина и *c-myc* протеина у узорцима ткива које окружује венску улцерацију [43]. Како би се додатно окарактерисала улога овог сигналног пута у настанку венских улцерација, методом имунохистохемије анализирана је експресија и локализација фосфорилисане, активне форме β -катенина. Овом анализом уочена је цитоплазматска и једарна локализација фосфорилисане форме β -катенина у узорцима ткива које окружује венске улцере.

За разлику од оболелог ткива, у здравом ткиву показано је да је β -катенин лоциран преобладајуће у мембранама базалног слоја (Слика 4.6А). Такође, *Western blot* анализом је показано да је ниво протеина *c-myc*, низводног циљног гена β -катенина, повећан у узорцима ткива пореклом од хроничних венских улцерација при поређењу са здравом кожом.

Истовремено, у узорцима здраве коже није примећено присуство овог протеина (Слика 4.6Б). Поред тога, *Western blot* методом анализиран је и ниво протеина *p-GSK3 β* који игра значајну улогу у активацији *WNT* сигналног пута.

У узорцима ткива здраве коже примећен је значајно виши ниво овог протеина у односу на ткива венских улцерација пореклом од неколико различитих пацијената (Слика 4.6Ц). Смањен ниво *p-GSK3 β* указује на активацију *WNT* сигналног пута.



Слика 4.6 Анализа експресије компоненти Wnt сигналног пута у узорцима венских улцерација и здраве коже.

А) Имунофлуоресцентна анализа активације β -катенина у венским улцерацијама потврђена једарном локализацијом кроз читав епидерм. У оквиру здраве коже локализација фосфорилисане форме је цитоплазматска и ограничена на базални и први супрабазални слој. Скала величине 50 μ m.

Б) Western blot анализа експресије c-мус у венским улцерацијама и Jurkat ћелијама (позитивна контрола) и поређење са експресијом у здравој кожи.

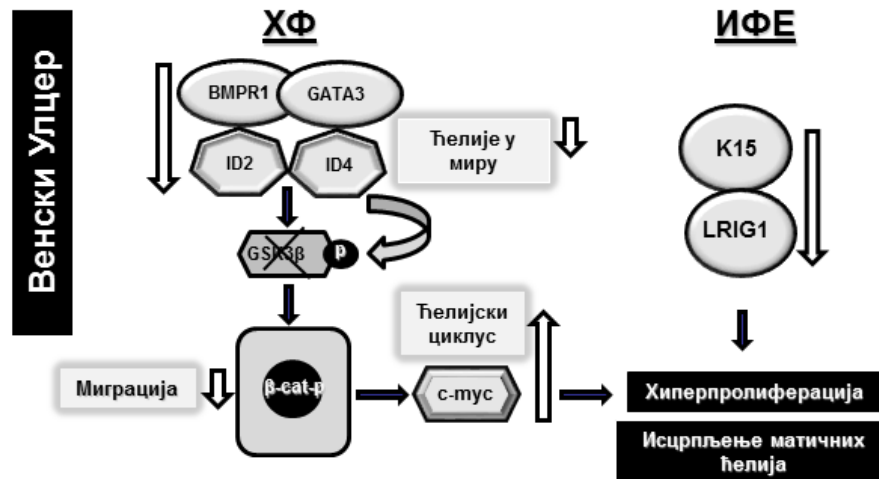
Ц) Western Blot анализа експресије фосфорилисане форме GSK3 β у венским улцерима и поређење са експресијом у здравој кожи.

5. Дискусија

Тема истраживања која је описана у овом раду обухватала је анализу ткива пореклом од пацијената са хроничним венским улцерацијама у циљу идентификације промене у експресији гена, а посебно оних гена који карактеришу судбину епидермалних матичних ћелија. Добијени резултати су показали да гени који регулишу стање мировања епидермалних матичних ћелија, пре свега гени *BMPRI*, *GATA3*, *ID2* и *ID4* показују смањен ниво експресије у узорцима ткива пореклом са обода венских улцерација, што пре свега указује на губитак контроле над епидермалним матичним ћелијама. Такође, резултати су показали да долази до смањења експресије *GSK3 β* , што за последицу има повећање фосфорилисане форме β -катенина у једру и *c-myc*-а, и активацију *Wnt* сигналног пута. Поред тога, резултати су показали смањену експресију *LRIG1*, гена који представља маркер интерфоликуларних матичних ћелија који има улогу у одржавању матичних ћелија у стању мировања и *K15*, гена који је познат као маркер епидермалних матичних ћелија, у оквиру интерфоликуларног епидерма на ободу венских улцера. Сви добијени резултати указују на то да губитак регулације функције епидермалних матичних ћелија може утицати на убрзан ћелијски циклус и трошење популације матичних ћелија, што затим доприноси настанку хиперпролиферативног епидермиса карактеристичног за обод хроничних венских улцера.

Ободи хроничних венских улцера карактеристични су по хиперпролиферативним кератиноцима које одликује активација β -катенина и *c-myc*-а [18]. β -катенин сигнални пут има бројне улоге у регулацији судбине матичних ћелија које се налазе у оквиру епителног ткива, као што су матичне ћелије фоликула длаке, где његова једарна локализација и стабилизација стимулише успаване матичне ћелије да пролиферишу [58, 59]. β -катенин је такође повезан са *BMP* сигналним путем са обзиром да је показано да кондициона аблација *BMPRI* гена доводи до стабилизације и активације неактивних матичних ћелија да започну пролиферацију [60, 61]. Осим тога, показано је да *GATA3*, који супримира терминалну диференцијацију епидермалних матичних ћелија инхибирајући експресију гена за кератин 10 (*K10*), такође има смањену експресију [62]. Током претходног истраживања показано је да у ободима хроничних венских улцерација постоји супресија раног маркера диференцијације *K10* [1], [63]. Добијени резултати шематски су приказани на Слици 5.1 описују супресију *BMPRIa* гена у венским улцерацијама која корелира са повећаном експресијом β -катенина и смањеном експресијом *GATA3*, што заједно указује на губитак мировања и повећање хиперпролиферације епидермиса у оквиру патолошких промена које настају код хроничних венских улцерација.

Познато је да *Wnt* сигнални пут регулише судбину матичних ћелија [39].



Слика 5.1 Шематски приказ утицаја епидермалних стем ћелија коже у патогенези хроничних венских улцерација.

У оквиру хроничних венских улцерација овај сигнални пут није правилно регулисан, што је потврђено смањеном фосфорилацијом *GSK3β* која указује на његову активацију. *С-тус*, транскрипциони циљни ген β-катенина, има важну улогу у контроли епидермалних матичних ћелија, учествујући у процесу конверзије матичних ћелија у стање привременог умножавања. Његова повећана експресија може довести до повећања стопе пролиферације и диференцијације [58, 66]. Индукција експресије *с-тус*-а у ободима хроничних венских улцера указује на губитак стања мировања и смањење популације матичних ћелија, што је у сагласности са претходним сазнањима који указују да се поремећај у зарастању рана и редукција ћелија *bulge* региона длаке које задржавају обележивач настаје као последица повећане експресије *с-тус*-а код трансгених мишева.

Гени који кодирају протеине инхибиторе везивања за ДНК, *ID2* и *ID4*, одговорни су за одржавање стања мировања популације матичних ћелија у фоликулу длаке и преобладајуће су експримиране у недиференцираним матичним ћелијама које имају успорен ћелијски циклус [67, 68]. Фамилија *ID helix-loop-helix (HLH)* протеина, који су универзално експримиране, негативно регулишу основне *HLH* регулаторе транскрипције који промовишу одређивање судбине ћелија [68]. Имајући у виду наведено, добијени резултат који се односи на смањену експресију *ID2* и *ID4* у венским улцерима може указати на губитак стања мировања матичних ћелија, али и претходно описан поремећај у експресији маркера карактеристичних за диференцијацију кератиноцита [42].

LRIG1 ген је препознат као маркер хуманих матичних ћелија у интерфоликуларном епидерму, мада су *LRIG1* позитивне ћелије пронађене и у спојној зони фоликула длаке код миша [69]. Показано је да *LRIG1* регулише стање мировања популације матичних ћелија у интерфоликуларном епидерму, а супротни однос између нивоа експресије *LRIG1* и *с-тус*-а претходно је показан у базалном слоју хуманог интерфоликуларног епидерма [70-71]. Добијени резултати у овом раду показали су значајну супресију *LRIG1* у хроничним венским улцерима, упоредо са повећањем експресије *с-тус*-а, што заједно указује на смањење популације матичних ћелија интерфоликуларног епидерма што даље доводи до њиховог исцрпљивања и присуство хиперпролиферативног епидермиса на ободима венских улцерација. Смањена експресија

LRIG1 повезана је са лезијама коже налик на псоријазу код миша и слабо диференцираним карциномом сквамозних ћелија, указујући на улогу *LRIG1* у процесу губитка стања мировања матичних ћелија у оболењима коже који се карактеришу хишерпролиферацијом кератиноцита [72].

K15 је један од првих описаних маркера повезан са матичним ћелијама у фоликулу длаке [73]. Иако његова прецизна улога у кератиноцитима тек треба да буде откривена, експресија *K15* може бити повезана не само са популацијом матичних ћелија већ и са ћелијама налик базалним које реагују у условима нарушавања пролиферације и диференцијације здравог епитела [44]. У мишијем моделу ране пуне дебљине (енг. *full-thickness wound model*), ћелије настале од *K15* позитивних ћелија у фоликулу мигрирају у епидерм како би учествовале у обнављању, тако да је *K15* експресија само привремено присутна у интерфоликуларном епидермису након формирања ране [74]. У моделу идуковане ране, експресија *K15* је иницијално повећана и детектована у базалном и супрабазалном слоју интерфоликуларног епидерма, затим пролазно смањена пре успостављања уобичајене експресије у базалном слоју обновљеног епидерма [46, 55]. У узорцима здраве коже експресија *K15* је детектована у базалном слоју док је у ободу хроничних венских улцерација његова експресија одсутна. То указује на губитак субпопулације ћелија способних за обнову епидерма и одржавање хомеостазе. Са друге стране, током зарастања акутне ране, матичне ћелије одговарају брзо на изазвану повреду повећавањем пролиферације и смањењем процеса диференцијације, до тренутка када повређено ткиво у потпуности не зарасте [2, 75]. Добијени резултати могу навести на размишљање да је губитак сигнала који контролишу популацију матичних ћелија у хроничним венским улцерима проузрокован специфичним микроокружењем којем су оне изложене, с обзиром на то да је познато да хроничне ране имају специфичан „миље“ цитокина и фактора раста који се разликује од оног присутног током зарастања акутних рана [76]. Резултати приказани у овом раду указују да је у венским улцерацијама присутна нарушена регулација сигнала који доприносе одржавању матичних ћелија у стању мировања у фоликулу длаке и у интерфоликуларном епидерму. Наиме, услед честих деоба које карактерише хишерпролиферативни епидерм на ободима венских улцерација долази до осиромашења популације матичних ћелија. Овај резултат је додатно подржан чињеницом да су маркери матичних ћелија карактеристични за фоликул длаке и интерфоликуларни епидерм одсутни у ободима хроничних венских улцерација.

Представљени резултати су први у литератури који указују на корелацију између поремећених сигналних путева који регулишу опстанак матичних ћелија и губитка популације матичних ћелија у ободима хиперпролиферативних венских улцера. Наиме, показано је да је експресија *BMPRI*, *GATA3*, *ID2* и *ID4* гена смањена, затим да је смањен ниво фосфорилисане форме *GSK3 β* што указује на активацију *Wnt* сигналног пута, који је додатно потврђен повећаним једарним присуством β -катенина и повећаном експресијом *c-myc*-а. Смањена експресија *LRIG1*, гена важног за одржавање матичних ћелија у стању мировања које се одликује одсуством деоба праћена је и одсуством експресије *K15*, маркера матичних ћелија базалног слоја. Све наведено указује на локално осиромашење популације епидермалних матичних ћелија што даље води формирању хиперпролиферативног епидермиса какав је карактеристичан за обод хроничних венских улцера. Иако ова запажања изискују механичке студије, тешко применљиве код људи, она обезбеђују основу за даље клиничке студије које ће омогућити тестирање потенцијалних нових терапијских модалитета у циљу постизања успостављања нише матичних ћелија које ће обезбедити повратак епидерма у функционално стање, способног да обезбеди зарастање хроничних венских улцерација.

Приказани резултати указују на нарушену функцију епидермалних матичних ћелија у хроничним венским улцерацијама и могу обезбедити основу за имплементацију терапије матичним ћелијама и успостављање стратегије регенеративне медицине за третман и лечење хроничних венских улцерација.

6. Закључци

1. Функција епидермалних матичних ћелија на ободима хроничних венских улцера је нарушена и овај дисбаланс игра значајну улогу у патогенези хроничних венских улцера.
2. Кожа на ободима хроничних венских улцера се карактерише абнормалном пролиферацијом кератиноцита, што је последица смањеног нивоа фосфорилисане форме *GSK3 β* и указује на активацију *Wnt* сигналног пута, што је додатно потврђено повећаним једарним присуством β -катенина и повећаном експресијом *c-myc-a*.
3. Експресија гена, *LRIG1* и *K15*, маркера матичних ћелија интерфоликуларног епидерма је смањена а *K15* протеин је одсутан из базалног слоја коже на ободима хроничних венских улцера.
4. Транскрипциони профил коже са обода хроничних венских улцера показује смањење експресије гена одговорних за одржавање популације матичних ћелија фоликула длаке *BMPRI*, *GATA3*, *ID2* и *ID4*, који имају улогу у контроли нише матичних ћелија коже на ободима хроничних венских улцера.
5. Морфолошка анализа узорака коже узетих са обода хроничних венских улцера се карактерише одсуством фоликула длаке.
6. Губитак регулације функције епидермалних матичних ћелија доводи до убрзаног ћелијског циклуса и трошења популације матичних ћелија коже, доприноси настанку хиперпролиферативног епидерма карактеристичног за обод хроничних венских улцера и успоравању процеса зарастања рана.

7. Литература

- [1] Lindley LE, Stojadinovic O, Pastar I, Tomic-Canic M. Biology and Biomarkers for Wound Healing. *Plast Reconstr Surg*. 2016;138(3 Suppl):18S-28S.
- [2] Ojeh N, Pastar I, Tomic-Canic M, Stojadinovic O. Stem Cells in Skin Regeneration, Wound Healing, and Their Clinical Applications. *Int J Mol Sci*. 2015;16(10):25476-501.
- [3] Pastar I, Stojadinovic O, Yin NC, Ramirez H, Nusbaum AG, Sawaya A, et al. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014;3(7):445-64.
- [4] Gonzales KAU, Fuchs E. Skin and Its Regenerative Powers: An Alliance between Stem Cells and Their Niche. *Dev Cell*. 2017;43(4):387-401.
- [5] Prodinge CM, Reichelt J, Bauer JW, Laimer M. Current and Future Perspectives of Stem Cell Therapy in Dermatology. *Ann Dermatol*. 2017;29(6):667-87.
- [6] Garcin CL, Ansell DM, Headon DJ, Paus R, Hardman MJ. Hair Follicle Bulge Stem Cells Appear Dispensable for the Acute Phase of Wound Re-epithelialization. *Stem Cells*. 2016;34(5):1377-85.
- [7] Ansell DM, Kloepper JE, Thomason HA, Paus R, Hardman MJ. Exploring the "hair growth-wound healing connection": anagen phase promotes wound re-epithelialization. *J Invest Dermatol*. 2011;131(2):518-28.
- [8] Mascre G, Dekoninck S, Drogat B, Youssef KK, Brohee S, Sotiropoulou PA, et al. Distinct contribution of stem and progenitor cells to epidermal maintenance. *Nature*. 2012;489(7415):257-62.
- [9] Yamazaki A, Obara K, Tohgi N, Shirai K, Mii S, Hamada Y, et al. Implanted hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells encapsulated in polyvinylidene fluoride membrane cylinders promote effective recovery of peripheral nerve injury. *Cell Cycle*. 2017;16(20):1927-32.
- [10] Shirai K, Hamada Y, Arakawa N, Yamazaki A, Tohgi N, Aki R, et al. Hypoxia Enhances Differentiation of Hair Follicle-Associated-Pluripotent (HAP) Stem Cells to Cardiac-Muscle Cells. *J Cell Biochem*. 2017;118(3):554-8.
- [11] Alavi A, Sibbald RG, Phillips TJ, Miller OF, Margolis DJ, Marston W, et al. What's new: Management of venous leg ulcers: Treating venous leg ulcers. *J Am Acad Dermatol*. 2016;74(4):643-64; quiz 65-6.
- [12] Singer AJ, Tassiopoulos A, Kirsner RS. Evaluation and Management of Lower-Extremity Ulcers. *N Engl J Med*. 2017;377(16):1559-67.
- [13] Jimenez F, Garde C, Poblet E, Jimeno B, Ortiz J, Martinez ML, et al. A pilot clinical study of hair grafting in chronic leg ulcers. *Wound Repair Regen*. 2012;20(6):806-14.
- [14] Martinez ML, Escario E, Poblet E, Sanchez D, Buchon FF, Izeta A, et al. Hair follicle-containing punch grafts accelerate chronic ulcer healing: A randomized controlled trial. *J Am Acad Dermatol*. 2016;75(5):1007-14.
- [15] Martinez ML, Escario Travesedo E, Jimenez Acosta F. Hair-follicle Transplant Into Chronic Ulcers: A New Graft Concept. *Actas Dermosifiliogr*. 2017;108(6):524-31.
- [16] Catriona Y L., Roel N. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:781-810

- [17] Yuko K., Raymond H. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*. 2008 ;4(2):68-75
- [18] Gautam D., Zhaohui Y., Holly H., Guibin C., April P., Peter D , et al. Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2005;23(10):1489-501
- [19] Bister K, Jansen HW. Oncogenes in retroviruses and cells: biochemistry and molecular genetics. *Adv Cancer Res*.1986;47:99-188
- [20] Cole MD, McMahon SB. The Myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation. *Oncogene*. 1999 May 13;18(19):2916-24
- [21] Davis AC, Wims M, Spotts GD, Hann SR, Bradley A. A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev*. 1993 Apr;7(4):671-82
- [22] Mateyak MK, Obaya AJ, Adachi S, Sedivy JM. Phenotypes of c-Myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination. *Cell Growth Differ*. 1997 Oct;8(10):1039-48.
- [23] Wilson A, Murphy MJ, Oskarsson T, Kaloulis K, Bettess MD, Oser GM, Pasche AC, Knabenhans C, Macdonald HR, Trumpp A. c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev*. 2004 Nov 15;18(22):2747-63
- [24] Zeitvogel J, Jokmin N, Rieker S, Klug I, Brandenberger C, Werfel T. GATA3 regulates FLG and FLG2 expression in human primary keratinocytes. *Sci Rep*. 2017 Sep 19;7(1):11847.
- [25] Ku CJ, Hosoya T, Maillard I, Engel JD. GATA-3 regulates hematopoietic stem cell maintenance and cell-cycle entry. *Blood*. 2012 Mar 8;119(10):2242-51
- [26] Kaufman CK, Zhou P, Pasolli HA, Rendl M, Bolotin D, Lim KC, Dai X, Alegre ML, Fuchs E. GATA-3: an unexpected regulator of cell lineage determination in skin. *Genes Dev*. 2003 Sep 1;17(17):2108-22.
- [27] Beurel E, Grieco SF, Joep RS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther*. 2015 Apr;148:114-31.
- [28] Racaud-Sultan C, Vergnolle N. GSK3 β , a Master Kinase in the Regulation of Adult Stem Cell Behavior. *Cells*. 2021 Jan 24;10(2):225
- [29] Rendl M, Polak L, Fuchs E. BMP signaling in dermal papilla cells is required for their hair follicle-inductive properties. *Genes Dev*. 2008 Feb 15;22(4):543-57
- [30] Andl T, Ahn K, Kairo A, Chu EY, Wine-Lee L, Reddy ST, Croft NJ, Cebra-Thomas JA, Metzger D, Chambon P, Lyons KM, Mishina Y, Seykora JT, Crenshaw EB 3rd, Millar SE. Epithelial *Bmpr1a* regulates differentiation and proliferation in postnatal hair follicles and is essential for tooth development. *Development*. 2004 May;131(10):2257-68.
- [31] Vukelic S, Stojadinovic O, Pastar I, Rabach M, Krzyzanowska A, Lebrun E, Davis SC, Resnik S, Brem H, Tomic-Canic M. Cortisol synthesis in epidermis is induced by IL-1 and tissue injury. *J Biol Chem*. 2011 Mar 25;286(12):10265-75.
- [32] Jozic I, Vukelic S, Stojadinovic O, Liang L, Ramirez HA, Pastar I, Tomic Canic M. Stress Signals, Mediated by Membranous Glucocorticoid Receptor, Activate

- PLC/PKC/GSK-3 β / β -catenin Pathway to Inhibit Wound Closure. *J Invest Dermatol.* 2017 May;137(5):1144-1154
- [33] Jensen KB, Collins CA, Nascimento E, Tan DW, Frye M, Itami S, et al. Lrig1 expression defines a distinct multipotent stem cell population in mammalian epidermis. *Cell Stem Cell.* 2009;4(5):427-39.
- [34] Ke J, Wu R, Chen Y, Abba ML. Inhibitor of DNA binding proteins: implications in human cancer progression and metastasis. *Am J Transl Res.* 2018 Dec 15;10(12):3887-3910.
- [35] Kiyokawa H, Yamaoka A, Matsuoka C, Tokuhara T, Abe T, Morimoto M. Airway basal stem cells reutilize the embryonic proliferation regulator, Tgf β -Id2 axis, for tissue regeneration. *Dev Cell.* 2021 Jul 12;56(13):1917-1929.
- [36] Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci.* 2019;9:19.
- [37] Goodarzi P, Larijani B, Alavi-Moghadam S, Tayanloo-Beik A, Mohamadi-Jahani F, Ranjbaran N, Payab M, Falahzadeh K, Mousavi M, Arjmand B. Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomes for Wound Regeneration. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1119:119-131.
- [38] Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Adv Skin Wound Care.* 2012 Jul;25(7):304-14.
- [39] Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med.* 2014 Dec 3;6(265):265sr6.
- [40] Lorenz HP, Adzick NS. Scarless skin wound repair in the fetus. *West J Med.* 1993 Sep;159(3):350-5.
- [41] Pastar I, Stojadinovic O, Tomic-Canic M. Role of keratinocytes in healing of chronic wounds. *Surg Technol Int.* 2008;17:105-12.
- [42] Stojadinovic O, Pastar I, Vukelic S, Mahoney MG, Brennan D, Krzyzanowska A, et al. Deregulation of keratinocyte differentiation and activation: a hallmark of venous ulcers. *J Cell Mol Med.* 2008;12(6B):2675-90.
- [43] Stojadinovic O, Brem H, Vouthounis C, Lee B, Fallon J, Stallcup M, et al. Molecular pathogenesis of chronic wounds: the role of beta-catenin and c-myc in the inhibition of epithelialization and wound healing. *Am J Pathol.* 2005;167(1):59-69.
- [44] Arnold I, Watt FM. c-Myc activation in transgenic mouse epidermis results in mobilization of stem cells and differentiation of their progeny. *Curr Biol.* 2001;11(8):558-68.
- [45] Waikel RL, Kawachi Y, Waikel PA, Wang XJ, Roop DR. Deregulated expression of c-Myc depletes epidermal stem cells. *Nat Genet.* 2001;28(2):165-8.
- [46] Bose A, Teh MT, Mackenzie IC, Waseem A. Keratin k15 as a biomarker of epidermal stem cells. *Int J Mol Sci.* 2013;14(10):19385-98.
- [47] Jensen KB, Collins CA, Nascimento E, Tan DW, Frye M, Itami S, et al. Lrig1 expression defines a distinct multipotent stem cell population in mammalian epidermis. *Cell Stem Cell.* 2009;4(5):427-39.

- [48] Kaufman CK, Zhou P, Pasolli HA, Rendl M, Bolotin D, Lim KC, et al. GATA-3: an unexpected regulator of cell lineage determination in skin. *Genes Dev.* 2003;17(17):2108-22.
- [49] Grey JE, Harding KG, Enoch S. Venous and arterial leg ulcers. *BMJ.* 2006;332(7537):347-50.
- [50] Tomic-Canic M, Ayello EA, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H. Using gene transcription patterns (bar coding scans) to guide wound debridement and healing. *Adv Skin Wound Care.* 2008;21(10):487-92; quiz 93-4.
- [51] Brem H, Stojadinovic O, Diegelmann RF, Entero H, Lee B, Pastar I, et al. Molecular markers in patients with chronic wounds to guide surgical debridement. *Mol Med.* 2007;13(1-2):30-9.
- [52] Li D, Turi TG, Schuck A, Freedberg IM, Khitrov G, Blumenberg M. Rays and arrays: the transcriptional program in the response of human epidermal keratinocytes to UVB illumination. *FASEB J.* 2001;15(13):2533-5.
- [53] Galatro TF, Uno M, Oba-Shinjo SM, Almeida AN, Teixeira MJ, Rosemberg S, et al. Differential expression of ID4 and its association with TP53 mutation, SOX2, SOX4 and OCT-4 expression levels. *PLoS One.* 2013;8(4):e61605.
- [54] Kretzschmar K, Watt FM. Markers of epidermal stem cell subpopulations in adult mammalian skin. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4(10).
- [55] Troy TC, Arabzadeh A, Turksen K. Re-assessing K15 as an epidermal stem cell marker. *Stem Cell Rev.* 2011;7(4):927-34.
- [56] Spentzouris G, Labropoulos N. The evaluation of lower-extremity ulcers. *Semin Intervent Radiol.* 2009;26(4):286-95.
- [57] McCubrey JA, Rakus D, Gizak A, Steelman LS, Abrams SL, Lertpiriyapong K, et al. Effects of mutations in Wnt/beta-catenin, hedgehog, Notch and PI3K pathways on GSK-3 activity-Diverse effects on cell growth, metabolism and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863(12):2942-76.
- [58] Petersson M, Niemann C. Stem cell dynamics and heterogeneity: implications for epidermal regeneration and skin cancer. *Curr Med Chem.* 2012;19(35):5984-92.
- [59] Blanpain C, Fuchs E. Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006;22:339-73.
- [60] Kobiela K, Stokes N, de la Cruz J, Polak L, Fuchs E. Loss of a quiescent niche but not follicle stem cells in the absence of bone morphogenetic protein signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(24):10063-8.
- [61] Yi R. Concise Review: Mechanisms of Quiescent Hair Follicle Stem Cell Regulation. *Stem Cells.* 2017;35(12):2323-30.
- [62] Kobiela K, Pasolli HA, Alonso L, Polak L, Fuchs E. Defining BMP functions in the hair follicle by conditional ablation of BMP receptor IA. *J Cell Biol.* 2003;163(3):609-23.
- [63] Stojadinovic O, Pastar I, Nusbaum AG, Vukelic S, Krzyzanowska A, Tomic-Canic M. Deregulation of epidermal stem cell niche contributes to pathogenesis of nonhealing venous ulcers. *Wound Repair Regen.* 2014;22(2):220-7.
- [64] Morasso MI, Tomic-Canic M. Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing. *Biol Cell.* 2005;97(3):173-83.

- [65] Zouboulis CC, Adjaye J, Akamatsu H, Moe-Behrens G, Niemann C. Human skin stem cells and the ageing process. *Exp Gerontol.* 2008;43(11):986-97.
- [66] Rodriguez CN, Nguyen H. Identifying Quiescent Stem Cells in Hair Follicles. *Methods Mol Biol.* 2018;1686:137-47.
- [67] Xie Y, Awonuga A, Liu J, Rings E, Puscheck EE, Rappolee DA. Stress induces AMPK-dependent loss of potency factors Id2 and Cdx2 in early embryos and stem cells [corrected]. *Stem Cells Dev.* 2013;22(10):1564-75.
- [68] Hammond NL, Jahoda CA. Id2, Id3, and Id4 proteins show dynamic changes in expression during vibrissae follicle development. *Dev Dyn.* 2008;237(6):1653-61.
- [69] Quist SR, Eckardt M, Kriesche A, Gollnick HP. Expression of epidermal stem cell markers in skin and adnexal malignancies. *Br J Dermatol.* 2016;175(3):520-30.
- [70] Jensen KB, Watt FM. Single-cell expression profiling of human epidermal stem and transit-amplifying cells: Lrig1 is a regulator of stem cell quiescence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(32):11958-63.
- [71] Li Y, Zhang J, Yue J, Gou X, Wu X. Epidermal Stem Cells in Skin Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2017;6(9):297-307.
- [72] Tanemura A, Nagasawa T, Inui S, Itami S. LRIG-1 provides a novel prognostic predictor in squamous cell carcinoma of the skin: immunohistochemical analysis for 38 cases. *Dermatol Surg.* 2005;31(4):423-30.
- [73] Waseem A, Dogan B, Tidman N, Alam Y, Purkis P, Jackson S, et al. Keratin 15 expression in stratified epithelia: downregulation in activated keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1999;112(3):362-9.
- [74] Ito M, Liu Y, Yang Z, Nguyen J, Liang F, Morris RJ, et al. Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med.* 2005;11(12):1351-4.
- [75] Arwert EN, Hoste E, Watt FM. Epithelial stem cells, wound healing and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(3):170-80.
- [76] Barrientos S, Brem H, Stojadinovic O, Tomic-Canic M. Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2014;22(5):562(5):569-78.

БИОГРАФИЈА

Оливера Стојадиновић је рођена 26.12.1972. године у Бољевцу. У родном граду је завршила основну школу а затим природно математички смер Гимназије у Зајечару. Основне студије медицине је уписала школске 1992-1993 године на Медицинском факултету Универзитета у Београду, и дипломирала 29.06.1989 године. Након завршених основних студија медицине од 2002 до 2005 године је као *Postdoctoral Research Fellow, Senior Research Fellow u Associate Scientist*, радила на *NYU School of Medicine* а од 2005-2006 у Болници за специјалну хирургију у Њу Јорку. Оливера је радила као *Research Assistant Professor* од 2009 до 2016 на Департману за Дерматологију и кожно хирургију Универзитета у Мајамију. *Internship* на Департману хирургије је завршила од 2016 до 2017 године Оливера је 2020. године завршила специјализацију из Дерматологије и кожне хирургије на Универзитету у Мајамију и ради као *Voluntary Profesora na University od Miami* и у *Minar's Dermatology*.

Оливера има преко 60 објављених публикација у научним часописима, рецензент је у многобројним научним часописима и активни је члан *Wound Healing Society, Society for Investigative Dermatology* и *American Academy of Dermatology*.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Оливера Стојадиновић, изјављујем да докторска

дисертација под насловом:

Улога локалне нише епидермалних матичних ћелија у настанку и развоју
хроничних венских улкуса

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као
резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,

да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити
другог права интелектуалне својине других лица,

да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у
чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну
одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 2021. године,

O. Stojadinović

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, _____ Оливера Стојадиновић _____,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Улога локалне нише епидермалних матичних ћелија у настанку и развоју
хроничних венских улкуса

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, _____, _____ 2021. године,



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>