

Stanična smrt i obnova matičnim stanicama

Radevenjić, Lana

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, University of Split, Faculty of science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:317589>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za biologiju

Lana Radevenjić

STANIČNA SMRT I OBNOVA MATIČNIM STANICAMA

Završni rad

Split, 2021.

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za biologiju

Lana Radevenjić

STANIČNA SMRT I OBNOVA MATIČNIM STANICAMA

Završni rad

Split, 2021.

STANIČNA SMRT I OBNOVA MATIČNIM STANICAMA

Lana Radevenjić

Apoptoza je jedan je od mehanizama kojim stanica pokreće vlastitu smrt kao sastavni dio fizioloških procesa ili kao odgovor na određena patološka stanja. Aktivno, uz utrošak energije i uz sintezu određenih proteina stanica pokreće programiranu staničnu smrt koja uključuje niz događaja kao što je fragmentacija jezgre i molekule DNA, kondenzacija kromatina i konačno potpuni raspad stanice. Poremećaji apoptoze vezani su uz mnogobrojne bolesti. Istraživanje apoptotskih mehanizama i regulacije apoptoze otvara nove mogućnosti u liječenju bolesti kao što su tumori, autoimune bolesti, degenerativni procesi, AIDS, razvojne anomalije itd. Osim apoptozom, stanice mogu umrijeti i nekrozom. Nekroza nastaje kao posljedica znatnijeg oštećenja stanice izazvanog različitim fizikalno-kemijskim agensima i obično zahvaća veći broj stanica ili veća tkivna područja. Matične stanice su izvor svih stanica tijela, a njihova sposobnost regeneracije oštećenih tkiva čini ih jedinstvenima u medicini. Sposobnost proliferacije i diferencijacije matičnih stanica osigurava održavanje ravnoteže između stanične smrti i stanične obnove. Matične stanice, zbog svojstva pluripotentnosti, stalno su u fokusu znanstvenih istraživanja te je njihova primjena jedna od najvećih nada medicine budućnosti.

Ključne riječi: apoptoza, intrinzički i ekstrinzički put, nekroza, matične stanice

Rad sadrži: 26 stranica, 12 grafičkih prikaza, 14 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Mentor: doc. dr. sc. Elma Vuko

Ocjenjivači: doc. dr. sc. Elma Vuko
doc. dr. sc. Željana Fredotović
doc. dr. sc. Ivica Šamanić

Rad prihvaćen:

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu.

CELL DEATH AND REGENERATION WITH STEM CELLS

Lana Radevenjić

Apoptosis is one of the mechanisms by which a cell initiates its own death as part of physiological processes or in response to certain pathological conditions. Through the use of energy and the synthesis of certain proteins, the cell actively initiates programmed cell death, which consists of several events such as fragmentation of the nucleus and DNA, condensation of chromatin, and finally the complete disintegration of the cell. The study of apoptosis mechanisms and regulation of apoptosis opens new possibilities for the treatment of diseases such as tumors, autoimmune diseases, degenerative processes, AIDS, developmental abnormalities, etc. In addition to apoptosis, cells can also die by necrosis. Necrosis is the result of severe cellular damage caused by various physical or chemical agents and usually affects a larger number of cells or larger tissue areas. Stem cells are a source of all types of body cells, and their ability to regenerate damaged tissue makes them unique in medicine. The ability of stem cells to proliferate and differentiate allows them to maintain a balance between cell death and regeneration. Stem cells are always at the center of scientific research due to their pluripotency and their application is one of the greatest hopes for future medicine.

Keywords: apoptosis, intrinsic and extrinsic pathway, necrosis, stem cells

Thesis consists of: 26 pages, 12 pictures, 14 references. Original language: Croatian

Supervisor: Ph.D. Elma Vuko, Assistant Professor

Reviewers: Ph.D. Elma Vuko, Assistant Professor
Ph D. Željana Fredotović, Assistant Professor
Ph D. Ivica Šamanić, Assistant Professor

Thesis accepted:

Thesis is deposited in the library of the Faculty of Science, University of Split.

IZJAVA

kojom izjavljujem s punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam završni rad s naslovom „Stanična smrt i obnova matičnim stanicama“ izradila samostalno pod voditeljstvom doc. dr. sc. Elme Vuko. U radu sam primijenio/la metodologiju znanstvenoistraživačkog rada i koristio/la literaturu koja je navedena na kraju diplomskog rada. Tuđe spoznaje, stavove, zaključke, teorije i zakonitosti koje sam izravno ili parafrazirajući naveo/la u diplomskom radu na uobičajen, standardan način citirao/la sam i povezao/la s fusnotama s korištenim bibliografskim jedinicama. Rad je pisan u duhu hrvatskog jezika.

Studentica

Lana Radevenjić

Ovaj rad izrađen je u Splitu pod vodstvom doc.dr.sc Elme Vuko, predan je na ocjenu Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja sveučilišne prvostupnice biologije i kemije (univ. bacc. biol. et chem.).

Sadržaj

1	Uvod	1
1.1	Cilj rada:	2
2	Razrada teme.....	3
2.1	Apoptoza.....	3
2.2	Zbivanja tijekom apoptoze	3
2.2.1	Autofagija	4
2.2.2	Nekroza.....	5
2.3	Izvršitelji apoptoze.....	6
2.3.1	Kaspaze.....	6
2.4	Porodica Bcl-2-intrinzički put apoptoze	7
2.4.1	Mehanizam djelovanja intrinzičkog puta	8
2.5	Faktor tumorske nekroze - ekstrinzički put apoptoze.....	10
2.6	Matične stanice i održavanje odraslih tkiva.....	12
2.6.1	Diferencijacija matičnih stanica	14
2.6.2	Medicinska primjena odraslih matičnih stanica	15
2.6.3	Embrionalne matične stanice.....	16
2.6.4	Kloniranje prijenosom jezgre somatske stanice	17
2.6.5	Inducirane pluripotentne matične stanice	18
2.6.6	Nova otkrića u kliničkoj primjeni matičnih stanica	19
2.6.7	Moždani udar	20
2.6.8	Huntingtonova bolest.....	20
2.6.9	Budućnost- cjepiva protiv razvoja karcinoma	21
3	Sažetak	23
4	Literatura.....	24

1 Uvod

Život višestaničnih organizama započinje iz oplođenog jajašca. Ono predstavlja jedinstvenu stanicu iz koje nastaju sve ostale stanice u tijelu, koje se zatim organiziraju u različita tkiva i organe. Od više milijuna stanica u našem tijelu, svaka ima svoju funkciju i ulogu tj. svaka je stanica specijalizirana za funkcioniranje unutar određenog tkiva. Složeni proces brze proliferacije i diferencijacije embrionalnih stanica u ravnoteži je sa staničnom smrću. Programirana stanična smrt je uobičajeni fiziološki proces koji ima važnu ulogu u embrionalnom razvoju i u odraslim tkivima. Kako bi se održavala potrebna ravnoteža između stanične smrti i obnove u odraslim tkivima, gubitak stanica nadomještaju tkivne matične stanice (Cooper i Hausman, 2009).

Matične stanice nisu specijalizirane i mogu se transformirati u bilo koji drugi tip stanica u organizmu koji je uništen tijekom procesa starenja, bolesti, povreda i sl. One su izvor svih stanica tijela, a ova sposobnost regeneracije oštećenih tkiva čini ih jedinstvenima u medicini. Matične stanice imaju sposobnost samoobnavljanja i proizvodnje zrelih stanica u strogo kontroliranom okruženju. Važnost razumijevanja funkcije matičnih stanica podupiru nova istraživanja koja pokazuju da, odrasle matične stanice, osim sličnih vrsta stanica, mogu stvoriti i nesrodne stanice. Primjerice, matične stanice koštane srži stvaraju ne samo krvne stanice, već i mišićne odnosno beta stanice gušterače (Reddy, 2020). Matične stanice imaju značajnu primjenu u transplataciji tkiva tj. u regenerativnoj medicini čime ubrzavaju i olakšavaju proces transplatacije i pacijentima smanjuju vrijeme čekanja do pronalaska podudarnog donora (Foo i suradnici, 2021). Jedna od novijih kliničkih studija opisuje intravenoznu primjenu egzosoma dobivenih od mezenhimalnih matičnih stanica koštane srži za liječenje oluje citokina u pacijenata hospitaliziranih s teškim COVID-19 (Senegupta i sur., 2020). Autori ovoga rada navode i dodatne mogućnosti primjene egzosoma dobivenih iz koštane srži, npr. kod brojnih upalna stanja uključujući klasični ARDS (engl. *acute respiratory distress syndrome*), kroničnu opstruktivnu plućnu bolest, sepsu, autoimunu bolest i rak što ukazuje na brojne mogućnosti primjene matičnih stanica i njihovih produkata. Matične stanice imaju važnu ulogu u razvoju tumora, recidivu i metastazama. Njihova mogućnost samoobnavljanja i tumorigena svojstva pružaju im jedinstvenu sposobnost da se odupru različitim oblicima terapije. Inhibicija signalnih puteva kao što su kaskade Notch, WNT, Hedgehog i Hippo proučava se u više vrsta

raka s ciljem razvoja terapeutika usmjerenih na ove signalne puteve i matične stanice raka (Clara i sur., 2019).

Sve važnija primjena matičnih stanica u liječenju brojnih patoloških stanja kao što su rak, autoimune i neurodegenerativne bolesti upućuje na važnost daljnjeg proučavanja biologije matičnih stanica. Stoga je razumijevanje složenih mehanizama koji stoje u pozadini regulacije stanične smrti i obnove putem matičnih stanica i dalje u fokusu brojnih znanstvenih istraživanja u staničnoj biologiji i u medicini. U ovom radu opisana je stanična smrt i način na koji se odvija. Objašnjena je funkcija matičnih stanica u obnovi tkiva. Nadalje, opisana je primjena matičnih stanica za liječenje brojnih bolesti poput Huntingtonove bolesti, moždanog udara i karcinoma. Medicinska primjena matičnih stanica stoga je i dalje u fokusu znanosti, te nove spoznaje stalno otvaraju mogućnosti za suvremene metode liječenja do sada neizlječivih bolesti i regeneraciju oštećenih tkiva.

1.1 Cilj rada:

Cilj ovoga rada je:

- objasniti pojam stanične smrti kao uobičajenog fiziološkog procesa
- objasniti važnost održavanja ravnoteže između stanične smrti i stanične obnove
- navesti glavne izvršitelje, regulatore te pokretače apoptoze
- opisati funkciju matičnih stanica u regeneraciji tkiva
- opisati primjenu matičnih stanica u liječenju bolesti poput moždanog udara, Huntingtonove bolesti te razvoja protutumorskih cjepiva

2 Razrada teme

2.1 Apoptoza

Apoptoza se još naziva programirana stanična smrt jer predstavlja aktivan proces koji trošenjem energije i aktivacijom gena sintetizira potrebite proteine (Žlender, 2003). Odrasli organizmi putem programirane stanične smrti održavaju konstantnim broj stanica u tijelu zbog reguliranog održavanja ravnoteže stanične smrti sa staničnom obnovom. Brojni su primjeri u kojima navedena ravnoteža osigurava održavanje života organizma. Stvaranje krvnih stanica u koštanoj srži svakodnevno je proces spregnut s uklanjanjem viška stanica putem programirane stanične smrti. Također, istim mehanizmom uklanjaju se i one stanice koje su oštećene ili potencijalno opasne kao što su stanice s oštećenjima DNA molekule koje često nose štetne mutacije. Takve stanice potrebno je eliminirati iz organizma jer bi u protivnom mogle dovesti do nastanka karcinoma zbog svojstva nekontroliranog rasta (Cooper i Hausman, 2009).

Osim kod odraslih organizama, programirana stanična smrt ima važnu ulogu i tijekom embrionalnog razvoja, primjerice za uklanjanje tkiva između prstiju, kao i za razvoj živčanog sustava kod sisavaca. Naime, djelovanje apoptoze temelji se na stvaranju pravilno strukturiranih veza neurona i ciljnih stanica u svrhu održavanja funkcionalnog živčanog sustava, kao i ostalih organskih sustava koji ovise o faktorima rasta i dodiru sa susjednim stanicama (Cooper i Hausman, 2009). Osim toga, prilikom stvaranja T-limfocita imunološkog sustava, apoptoza odstranjuje potencijalno opasne T-limfocite koji imaju mogućnost uništenja vlastitih stanica zbog kompatibilnosti receptora na staničnoj površini s proteinima normalnih stanica.

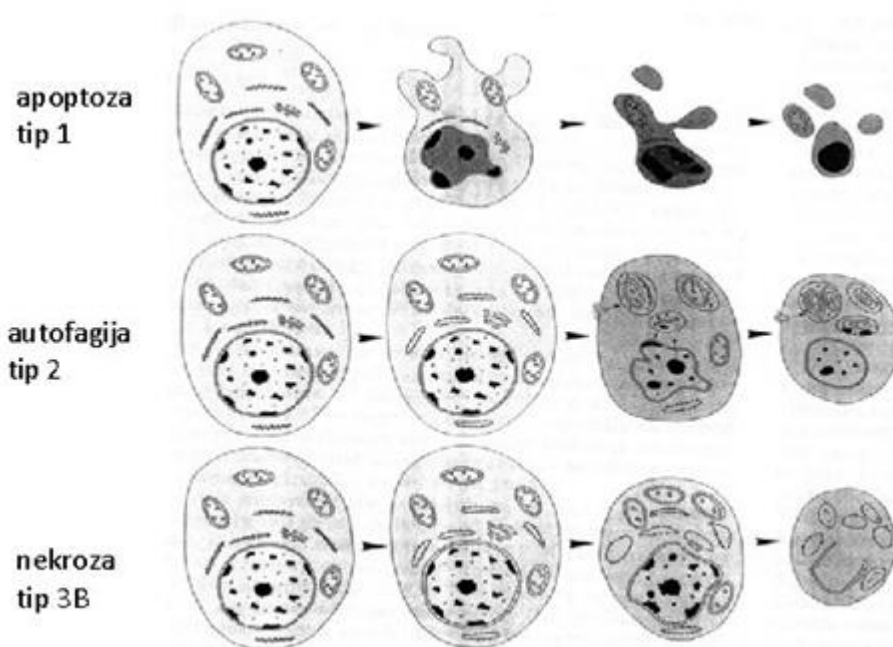
Navedeni i brojni drugi primjeri pokazuju važnost apoptoze u oblikovanju tkiva i organa tijekom embrionalnog razvoja i u održavanju homeostaze odraslih organizama (Karp, 2013).

2.2 Zbivanja tijekom apoptoze

Apoptoza obuhvaća niz različitih promjena koje se događaju u stanici. Prvi korak je fragmentiranje molekule DNA koje nastupa zbog kidanja između nukleosoma. Slijede kondenzacija kromatina te raspad jezgre na sitne komadiće što dovodi do savijanja stanice i

njezina raspada na apoptotička tjelešca. Eliminacija raspadnutih stanica iz organizma posredovana je putem fosfatidilserina. Naime, fosfatidilserin je molekula uobičajeno smještena na unutrašnjem sloju stanične membrane. Tijekom apoptoze i raspada stanice, fosfatidilserin biva izložen na površini stanice i takva stanica postaje lako dostupna makrofagima za proces fagocitoze.

Osim apoptoze koja predstavlja najčešći oblik programirane stanične smrti, postoji i alternativni neapoptotički mehanizam koji se naziva autofagija (Slika 1). Nasuprot navedenom, nekroza je slučajna stanična smrt koja nastaje kao posljedica ozljede (Cooper i Hausman, 2009).



Slika 1. Vrste stanične smrti (izvor: web 1)

2.2.1 Autofagija

Autofagija primarno označava unos staničnih proteina ili organela u lizosom u svrhu proteolitičke razgradnje enzima koji su sadržani u lizosomu. Proces je često potaknut stanjem gladi stanice pri čemu razgradnja unesenih proteina oslobađa energiju potrebnu za osnovne funkcije stanice (Cooper i Hausman, 2009). Okidač autofagije kod kvasaca i biljaka

najčešće je nedostatak dušika, u manjoj mjeri i aminokiselina, nukleinskih kiselina, ugljika te sulfata. Kod sisavaca okidač autofagije može biti nedostatak različitih aminokiselina, ovisno o vrsti stanice. Autofagiju kod srčanog i skeletnih mišića potiče isključivo nedostatak aminokiseline leucin (Mizushima, 2007).

Autofagija je put koji je ponekad alternativan programiranoj staničnoj smrti. Autofagiju od apoptoze razlikuje stvaranje nakupina lizosoma umjesto uobičajenog mehanizma raspada stanice koji je osnova apoptoze. Istraživanja su pokazala da je autofagija glavni način stanične smrti kod razvoja žlijezda slinovnica vinske mušice, te da je također potiče virusna infekcija (Cooper i Hausman, 2009).

2.2.2 Nekroza

Okidač nekroze je znatnije oštećenje stanice. Različiti fizikalni i kemijski agensi uzročnici su nekrotičnih oštećenja što za posljedicu ima nemogućnost održavanja ravnoteže iona i tekućine u stanicama. Nedostatak kisika, ekstremne temperature, liza uzrokovana mikroorganizmima samo su neki od faktora koji dovode do bubrenja stanice i nekontroliranog ulaska kalcijevih i natrijevih iona u stanicu. To dovodi do raspada staničnih organela. Nekroza najčešće zahvaća i okolna tkiva zbog istjecanja sadržaja raspadnute stanice u vanstaničnu tekućinu što nadražuje okolinu.

U slučaju kada je prisutno slabije oštećenje kojim ipak nije uvelike narušena cjelovitost stanice, nastupit će samouništenje. Suprotno, kada agens uzrokuje nepopravljivu štetu na stanici, ona će umrijeti nekrozom. Dugotrajnost kao i jačina oštećenja odredit će na koji način stanica gubi život (Žlender, 2003).

Nekroza, kao i autofagija, može biti put alternativan apoptozi. Primjerice, oštećenja molekule DNA ili određene infekcije uzrok su nekrotične smrti stanice. Ovo saznanje otvara mogućnost dodatnih istraživanja nekroze zdravih stanica, stanica raka, te primjene u liječenju srčanih te neurodegenerativnih bolesti (Cooper i Hausman, 2009).

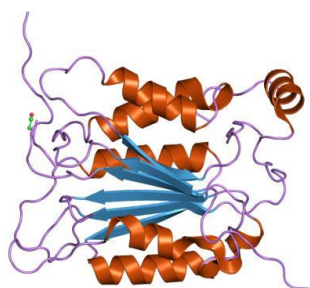
2.3 Izvršitelji apoptoze

Istraživanja provedena na modelnom organizmu *Caenorhabditis elegans* identificirala su tri gena koji su ključni aktivatori apoptoze: *ced-3*, *ced-4* i *ced-9* (Horvitz, 1990). Mutagenezom inaktivirani geni *ced-3* i *ced-4* onemogućavaju staničnu smrt, za razliku od gena *ced-9* čija mutacija dovodi do smrti. Stoga je *ced-9* negativni regulator apoptoze, što znači da njegovom aktivacijom, stanica preživljava. Daljnjim istraživanjima homologni geni su otkriveni kod vinske mušice i sisavaca. Njihova funkcija je prenijeti uputu za sintezu proteina koji potiču apoptozu (Cooper i Hausman, 2009).

2.3.1 Kaspaze

Glavni izvršitelj apoptoze je skupinu proteaza za koje kodira gen *ced-3*. Zajedničkim imenom nazivaju se kaspazama (Slika 2), a njihova karakteristika je cisteinski ostatak u aktivnim mjestima, te cijepanje supstrata nakon aspartata. Mehanizam djelovanja uključuje niz kaskadnih reakcija počevši s inaktivnim pretečama kaspaza koje se aktiviraju posredstvom drugih kaspaza uz proteolitičku razgradnju. Supstrati kaspaza su različite vrste proteina, pa su kaspaze glavni efektori programirane stanične smrti. Većina ciljnih molekula na koje djeluju kaspaze uključena je u mehanizam raspada i smrti stanice, primjerice: inhibitor DNaze, jezgrini lamini, te proteini za fragmentaciju sadržani u matriksu Golgijeva aparata i citoskeleta.

Za razliku od vrste *C. elegans* kod koje postoji samo jedna kaspaza, *ced-3*, sisavci i vinske mušice posjeduju minimalno sedam vrsta kaspaza koje se mogu klasificirati kao inicijatori ili efektori. Inicijatorske kaspaze su one koje primaju signal za apoptozu i kaskadom reakcija aktiviraju efektorske koje, prateći taj niz, cijepaju esencijalne proteine i dovode stanicu do smrti (Cooper i Hausman, 2009).

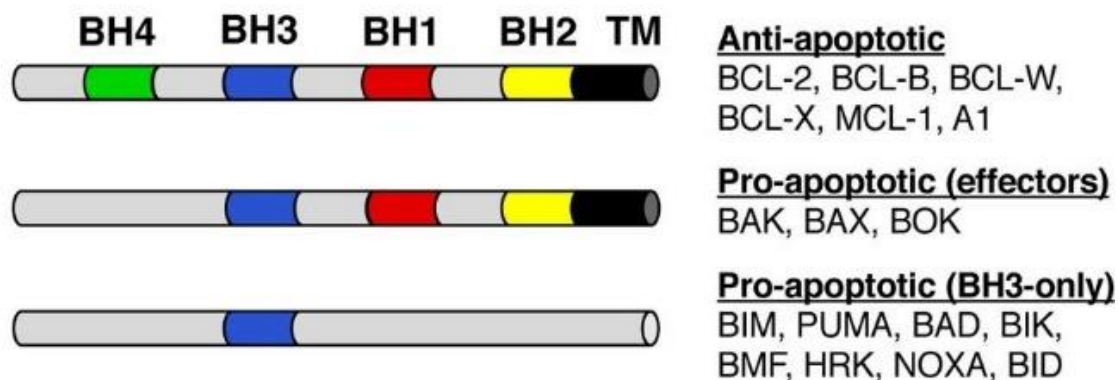


Slika 2. Trodimenzionalni prikaz strukture kaspaze (izvor: web 2)

2.4 Porodica Bcl-2-intrinzički put apoptoze

Osim važnosti izvršitelja apoptoze, velika važnost imaju i regulatori. Bcl-2 je središnji regulator programirane stanične smrti kod sisavaca, identificiran je kao onkogen koji sudjeluje u razvoju limfoma B-stanica. Gen Bcl-2 srodan je genu Ced-9 kod vrste *C. elegans*. Sisavci nose uputu za sintezu cijele porodice Bcl-2 proteina koja je podijeljena u tri osnovne skupine među kojima razlikujemo proteine koji inhibiraju apoptozu (antiapoptotički), ali i one koji je potiču (proapoptotički) (Slika 3). Članove ovih skupina karakterizira jedna ili više malih BH domena (BH; engl. *Bcl-2 homology domains*), pa tako unutar proapoptotičke skupine postoje višedomenska skupina s tri BH domene (BH1, BH2, BH3), kao i takozvana samo-BH3 proteinska skupina (engl. *BH3-only proteins*) koja sadrži samo jednu BH domenu.

Glavna karakteristika proteina iz porodice Bcl-2 je inhibicija apoptoze, zbog čega se također smatraju i onkogenima. Nekontrolirani rast stanica podjednako doprinosi nastanku raka kao i neuspjela ili nepotpuna stanična smrt. Međusobna regulacija navedenih skupina određuje daljnju sudbinu stanice - život ili smrt. Tako su višedomenski proapoptotički članovi porodice efektori koji induciraju apoptozu, no inhibirani su u interakciji s antiapoptotičkim članovima porodice. Održavanje ravnoteže između njih od iznimne je važnost (Cooper i Hausman, 2009).



Slika 3. Sekvenca i funkcionalna klasifikacija BCL-2 proteina (izvor: Wicky i sur., 2019)

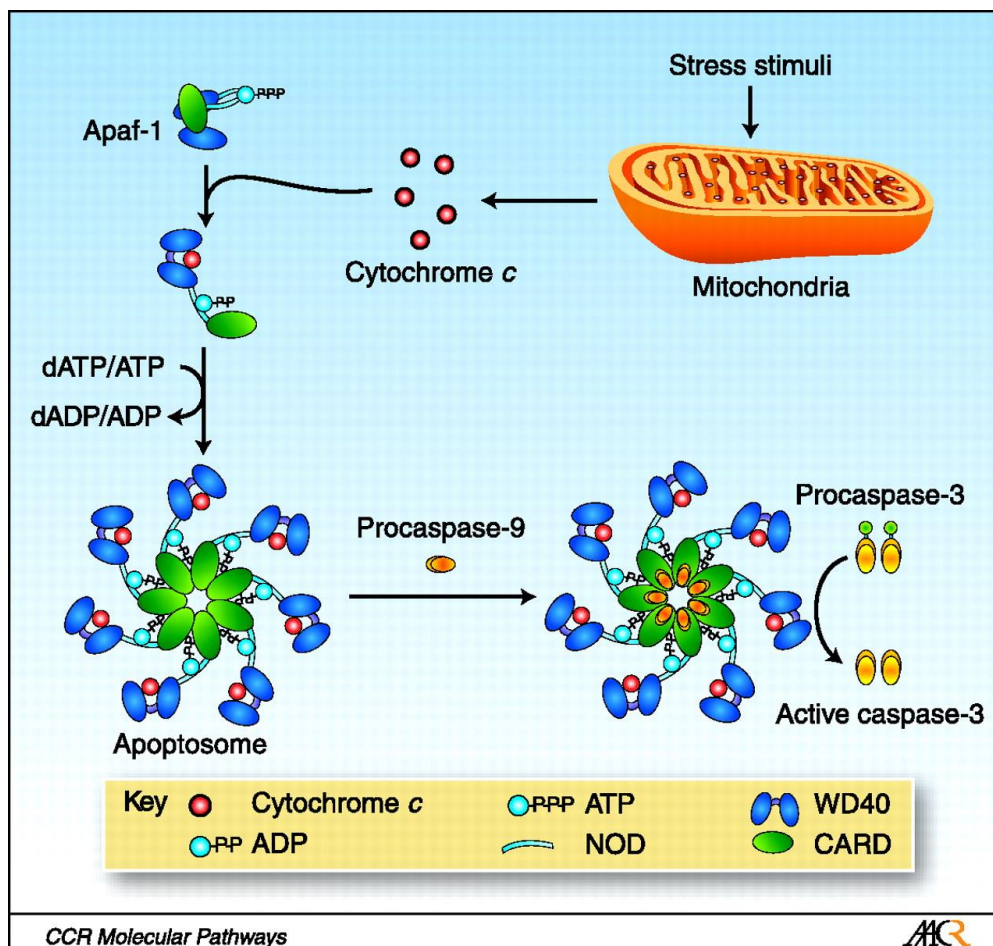
Navedene skupine proteina reguliraju aktivaciju intrinzičkog puta apoptoze, koji je uzrokovan genetičkim pogreškama, hipoksijom, nedostatkom citosolnog kalcijeva kationa, proizvodnjom slobodnih radikala koji dovode do oksidativnog stresa (Karp, 2013). Velikoj skupini navedenih proteina koji djeluju u mitohondrijima pripadaju i proteini Bax i Bak. Kao proapoptotički, oni omogućuju aktivaciju apoptoze, dok su inhibirani u interakciji s antiapoptotičkim proteinima kao što je i Bcl-2. Samo-BH3 proteini potaknut će staničnu smrt ako su stimulirani signalima kao što je oštećenje DNA molekule, međutim uz stimulaciju faktorima rasta, mogu sudbinu stanice preusmjeriti na preživljavanje.

Najčešći okidač intrinzičkog puta stanične smrti je oštećenje DNA molekule kojim se uklanjaju mutacije s potencijalno karcinogenim svojstvima. Pokretač može biti i nedostatak faktora rasta, signala koji omogućuju opstanak različitim tipovima stanica. Utjecaja ovih signala na razvoj stanica očituje se primjerice u živčanom sustavu sisavaca čiji neuroni pod utjecajem faktora rasta preživljavaju, dok ostali umiru uslijed nedostatka istog (Cooper i Hausman, 2009).

2.4.1 Mehanizam djelovanja intrinzičkog puta

Programiranu staničnu smrt u sisavaca nadgleda mitohondrij kao središnje mjesto regulacije apoptoze u stanici. Citokromi C koji su smješteni u međumembranskom prostoru mitohondrija dobit će slobodan put za izlaz putem pora na membrani ili interakcije s okolnim membranskim

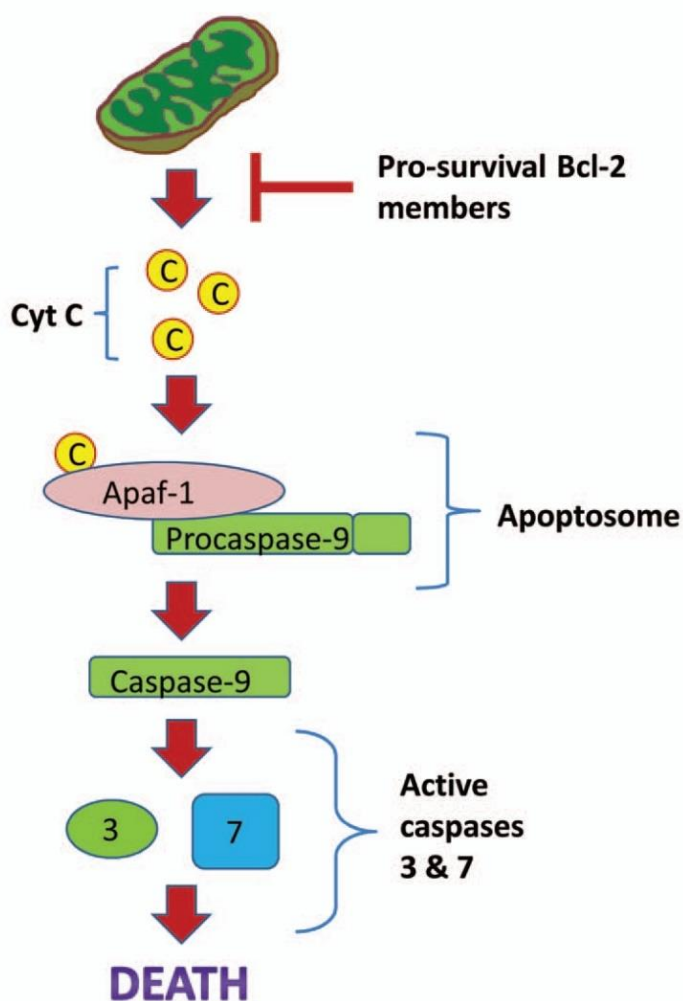
proteinima u trenutku kada na površini mitohondrijske membrane proteini Bax i Bak budu aktivirani u obliku oligomera nekim signalom smrti. Tvorba oligomera dovodi do otpuštanja citokroma C iz mitohondrija. Citokrom C veže se za Apaf-1 (Apoptotski proteaza-aktivirajući faktor 1) (Slika 4).



Slika 4. Formiranje apoptosoma (izvor: web 3)

Apaf1 aktivira se vezanjem za ATP. Kada se citokrom C veže za aktivirani Apaf1, nastane kompleksna kružna molekula, apoptosom. Apoptosom će vezati i cijepati prokaspazu-9, pri čemu ona postaje aktivirana kaspaza-9. Ona svojom proteolitičkom aktivnošću cijepa ostale prokaspaze čime ih aktivira kaskadom reakcija (Xiong i sur., 2014). Za vrijeme staničnog preživljavanja ovaj kompleks neće nastati jer tada potrebni citokromi C nisu prisutni u citosolu zajedno s kaspazom-9 i Apaf-1 proteinom zbog čega oni tada ostaju inaktivirani (Slika 5).

Apoptoza ne mora nastati samo kao posljedica staničnog stresa i signala koji ju potiču intrinzičkim putem, već može biti aktivirana i ekstrinzičkim putem preko specifičnih polipeptida koji djeluju na stanične receptore kojima se dalje prenose signali smrti u stanicu (Slika 6) (Cooper i Hausman, 2009).



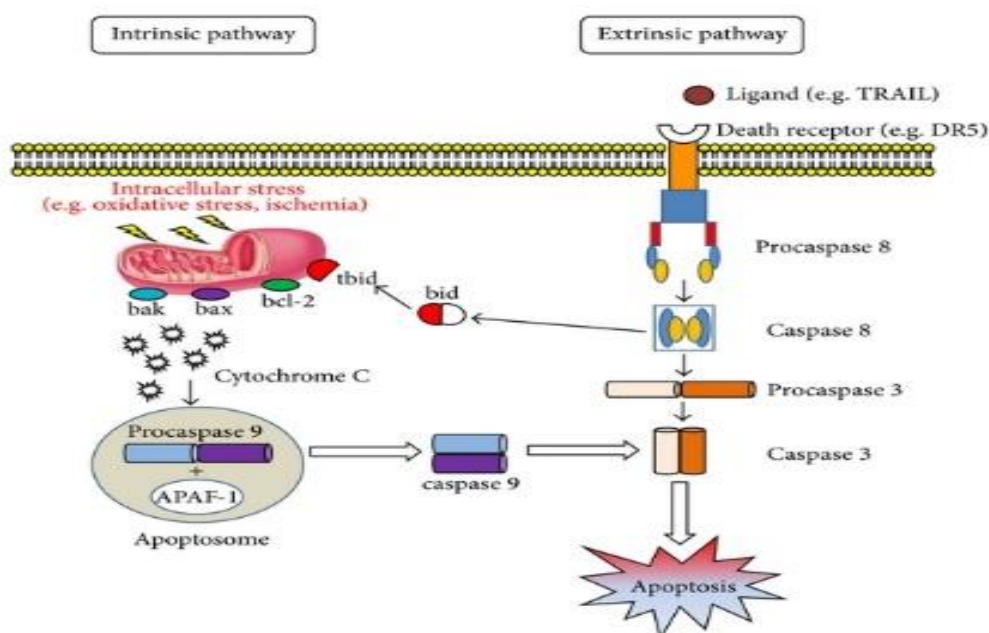
Slika 5. Shematski prikaz puta apoptoze u mitohondriju (izvor: web 4)

2.5 Faktor tumorske nekroze - ekstrinzički put apoptoze

Trimerni protein, faktor tumorske nekroze (engl. *Tumor necrosis factor* – TNF), nastaje kao produkt stanica imunološkog sustava kao odgovor na nepovoljne uvjete u stanici poput povišene temperature, izlaganja stanice radijaciji, toksičnim agensima ili uslijed virusne

infekcije. Mehanizam djelovanja ovog faktora ne razlikuje se od ostalih, a sastoji se od vezanja na specifični receptor na površini membrane preko kojeg prenosi uputu za staničnu smrt ili preživljavanje. Jedan od receptora je i transmembranski protein TNFR-1 koji pripada obitelji takozvanih „death“ proteina jer na polipeptidnom lancu sadrži segment od sedamdesetak aminokiselina koji omogućuje interakciju proteina i usmjerava stanicu prema apoptozi. Kaskadnim aktivacijama proteina proteolitički se cijepaju i aktiviraju dvije prokaspaze-8 (Karp, 2013). One dalje kidaju i aktiviraju ostale kaspaze te na taj način iniciraju apoptozu (Cooper i Hausman, 2009).

Interakcija TNF s članovima porodice TNF receptora često u unutrašnjost stanice prenosi dva suprotna signala od kojih jedan omogućava preživljavanje stanice, dok je drugi vodi prema smrti. Većina stanica koje sadrže TNF receptor neće podleći apoptozi, iako su prethodno tretirane TNF-om. To znači da se tumorske stanice ipak ne mogu liječiti uz pomoć TNF-a. Stanica se opire apoptozi pomoću velikog broja transkripcijskih faktora koji aktiviraju ekspresiju gena kodirajućih za niz proteina staničnog preživljavanja. Stoga se stanična sudbina temelji na održavanju ravnoteže između signala koji ju održavaju na životu, i onih koji ju usmjeravaju prema apoptozi i nekrozi (Karp, 2013).



Slika 6. Shematski prikaz intrinzičkog i ekstrinzičkog puta apoptoze (izvor: web 5)

2.6 Matične stanice i održavanje odraslih tkiva

Za održavanje ravnoteže između stanične smrti i obnove, potreban je poseban tip stanica koji ima sposobnost brze proliferacije u svrhu održavanja pravilne funkcije i stalnog broja stanica većine tkiva i organa.

Mnogostanični organizmi većinom sadrže diferencirane stanice koje gube sposobnost daljnje proliferacije. Gubitak diferenciranih stanica tkiva nadomješta se samoobnavljajućim matičnim stanicama koje su manje diferencirane. Diobom matičnih stanica nastaju stanice-kćeri od kojih je jedna uvijek matična stanica, dok se ostale diferenciraju. Ovaj proces karakterizira stanice kao što su, primjerice: spermiji, krvne stanice, epitel kože, epitel koji oblaže probavne organe. Navedene stanice imaju kratki životni vijek i konstantno se moraju nadomještati proliferacijom.

Tkiva, odnosno stanice, koje se regeneriraju aktivnošću samoobnavljajućih matičnih stanica su:

- **Hematopoetski sustav:** Sadrži nekoliko vrsta krvnih stanica, od kojih svaka ima različitu funkciju, što ukazuje na visoki stupanj diferencijacije jedne matične stanice koja potječe iz koštane srži. Kratkoživuće krvne stanice moraju se kontinuirano iznova stvarati jer ih čovjek dnevno izgubi više od 100 milijardi. Posredstvom faktora rasta i brojnim diobama, omogućeno je specifično diferenciranje prema određenom tipu krvnih stanica što označava kraj proliferacije.
- **Epitel crijeva:** Dno crijevnih kripti glavno je mjesto diobe matičnih stanica kojima se iznova stvaraju stanice crijevnog epitela koje zbog nepovoljnih uvjeta žive jako kratko i svakodnevno su podložne programiranoj staničnoj smrti. Uloga stanica epitela crijeva je probava i apsorpcija hrane. Postoje tri osnovna tipa stanica: apsorpcijske, enteroendokrine i peharske koje nastaju preko prijelazno-umnažajućih stanica.
- **Koža i kosa:** Epidermalne matične stanice diobom stvaraju prijelazno-umnažajuće stanice koje diferencijacijom dolaze na površinu kože gdje nadomještaju odbacene stanice. Tri su tipa kožnih staničnih linija: epiderma, folikul kose i žlijezde lojnice, od kojih se svaka obnavlja putem vlastite matične stanice.

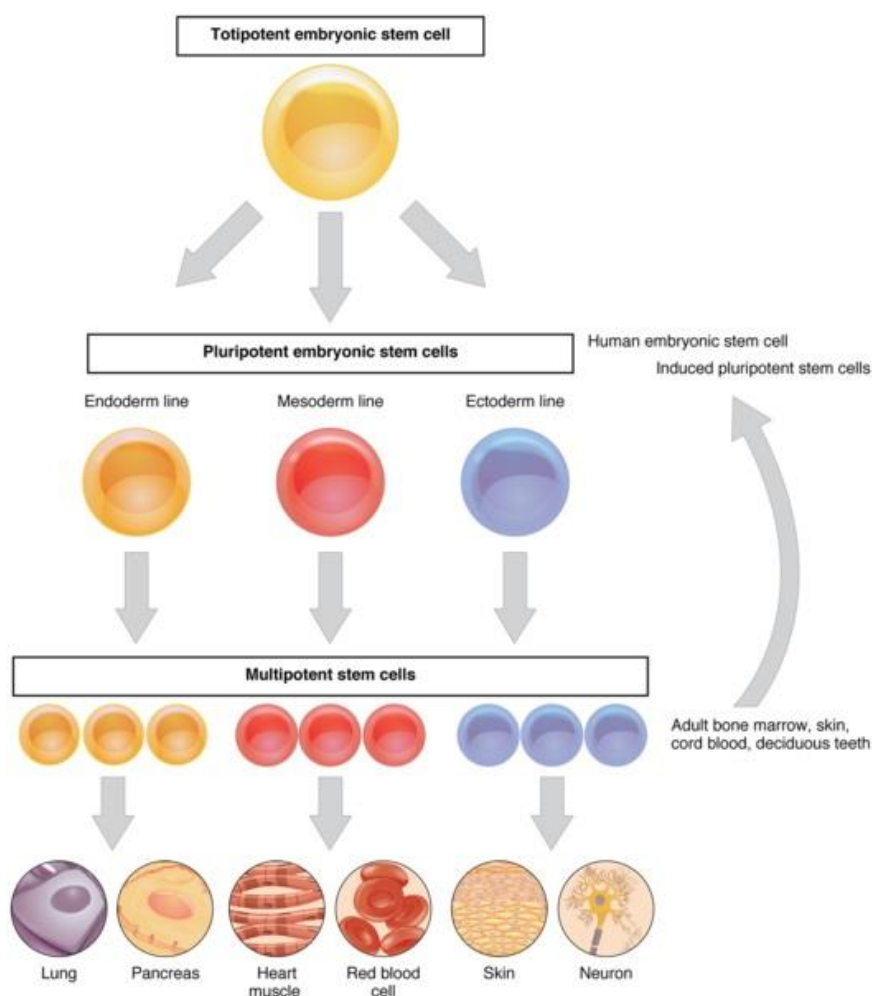
Područje folikula kose sadržava matične stanice odgovorne za nastanak kose, to mjesto naziva se nabreknuće. Putem prijelazno-umnažajućih stanica nastat će vlas kose. U bazi žlijezda lojnica također su smještene matične stanice.

Postoje i one stanice koje ulaze u G_0 -fazu staničnog ciklusa pri čemu zadržavaju moć proliferacije, koja se aktivira po potrebi. Na taj način su u mogućnosti regenerirati oštećena tkiva.

- **Fibroblasti:** Nalaze se u vezivnom tkivu i luče kolagen. Njihova funkcija je popravak oštećenja tkiva koja su izložena ranjavanju uz pomoć faktora rasta trombocita (engl. *platelet-derived-growth factor*, PDGF) koji je potaknut stvaranjem krvnog ugruška na mjestu ozljede. Kaskadom reakcija koja uključuje proteinsku tirozin-kinazu, izlučit će se kolagen i popraviti oštećenja u tkivu.
- **Endotel krvnih žila:** Faktor rasta vaskularnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) potiče proliferaciju endotelnih stanica te tvorbu novih krvnih žila. Njega proizvode stanice tkiva u kojem će izrasti nove krvne kapilare. Jedan od aktivatora ovog faktora je stanična hipoksija. Na isti način proliferiraju stanice glatkog mišića arterija i dijelova probavnog i dišnog sustava.
- **Skeletni mišić:** Građa skeletnih mišića obuhvaća snop mišićnih vlakana s velikim brojem jezgara. Oštećenje mišića nastalo primjerice vježbom obnavlja se putem satelitnih matičnih stanica. Te stanice nalaze se ispod bazalne lamine vlakna i zaustavljene su u G_0 -fazi staničnog ciklusa. Sposobne su brzo proliferirati nakon što su aktivirane, pri čemu regeneriraju mišićna vlakna.
- **Epitel unutrašnjih organa:** Jetra štakora se može u potpunosti obnoviti u svega nekoliko dana zahvaljujući iznimno brzom proliferaciji jetrenih stanica koje se aktiviraju oštećenjem ili kirurškim uklanjanjem dijela jetre (Cooper i Hausman, 2009).

2.6.1 Diferencijacija matičnih stanica

Oplođena oocita koja čini zigotu, zajedno s njenim potomcima nastalim u prvim dvjema diobama, čine prvu i najprimitivniju skupinu matičnih stanica. One se nazivaju totipotentnima jer tvore embrij i trofoblaste posteljice. Nakon otprilike četiri dana, totipotentne stanice specijaliziraju se u „šuplju loptu“ poznatu kao blastocista, te u nakupinu stanica ICM (engl. *inner cell mass*) iz koje će proizaći embrij. Njihova sposobnost je diferencijacija u gotovo sve vrste tkiva osim u embrij jer ne podržavaju rast i razvoj posteljice i potpornog tkiva, te se stoga smatraju pluripotentnima. Sljedeća skupina stanica koja ima sposobnost stvaranja ograničenog broja diferenciranih stanica koje podrijetlom odgovaraju lokaciji u tkivu su multipotentne stanice. Osim navedenih, poznate su još i unipotentne matične stanice koje generiraju jednu specifičnu vrstu stanica (Slika 7) (Alison i sur., 2002)..



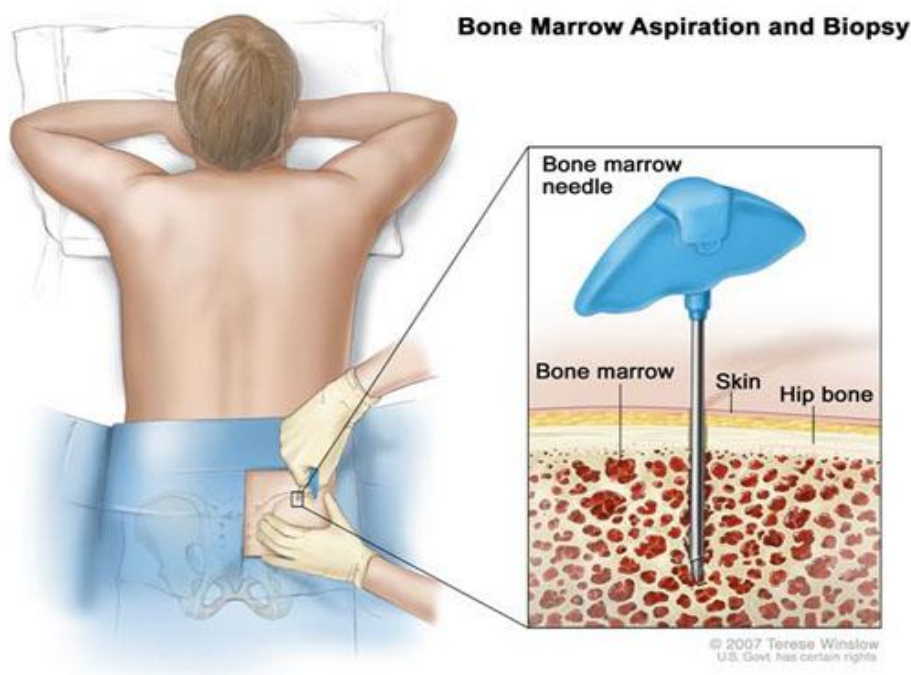
Slika 7. Diferencijacija matičnih stanica (izvor: web 6

2.6.2 Medicinska primjena odraslih matičnih stanica

Korist matičnih stanica u medicini je velika budući da se njima potencijalno može nadomjestiti oštećeno tkivo. Jedna od primjena odraslih matičnih stanica je transplatacija koštane srži u svrhu suzbijanja ubrzanog širenja tumorskih stanica. Kemoterapija, kao metoda liječenja karcinoma, za svrhu ima onemogućavanje replikacije ili inhibiciju DNA stanica tumora koje se brzo dijele. Međutim, kemoterapija nepovoljno djeluje i na okolne stanice koje trebaju stalnu obnovu putem matičnih stanica. Među tkivima koja se na ovaj način uništavaju najviše stradaju su koža, kosa i crijevni epitel te hematopoetski sustav. Transplatacijom matičnih stanica koštane srži omogućava se obnova ovoga sustava .

Dva su izvora matičnih stanica koje se koriste u liječenju karcinoma. jedna mogućnost je pohrana matičnih stanica pacijenta prije primjene kemoterapije. One se vraćaju u pacijenta nakon završetka kemoterapije, pri čemu je važno da su takve matične stanice zdrave. Blisko srodni donor također može donirati vlastite matične stanice u svrhu liječenja (Slika 8).

Navedeni postupak se koristi za liječenje raka i za druge hematopoetske bolesti poput aplastične anemije, imunodeficijencije ili poremećaja hemoglobina. Osim matičnih stanica koštane srži, epitelne stanice također imaju kliničku primjenu, što se koristi kod pacijenata kojima je potrebna transplatacija kožnog tkiva zbog opekline ili rana. Postupak se sastoji od uzgoja epidermalnih stanica u kulturi iz kojih se stvara epitelni sloj. Tkivo se potom može transplatirati, pri čemu se zbog upotrebe pacijentove kože, eliminira potencijalno odbacivanje presatka. Komplikacije u primjeni odraslih matičnih stanica nastaju najčešće zbog poteškoća prilikom izolacije matičnih stanica i njihova uzgoja u kulturi (Cooper i Hausman, 2009).



Slika 8. Aspiracija koštane srži i biopsija (izvor: web 7)

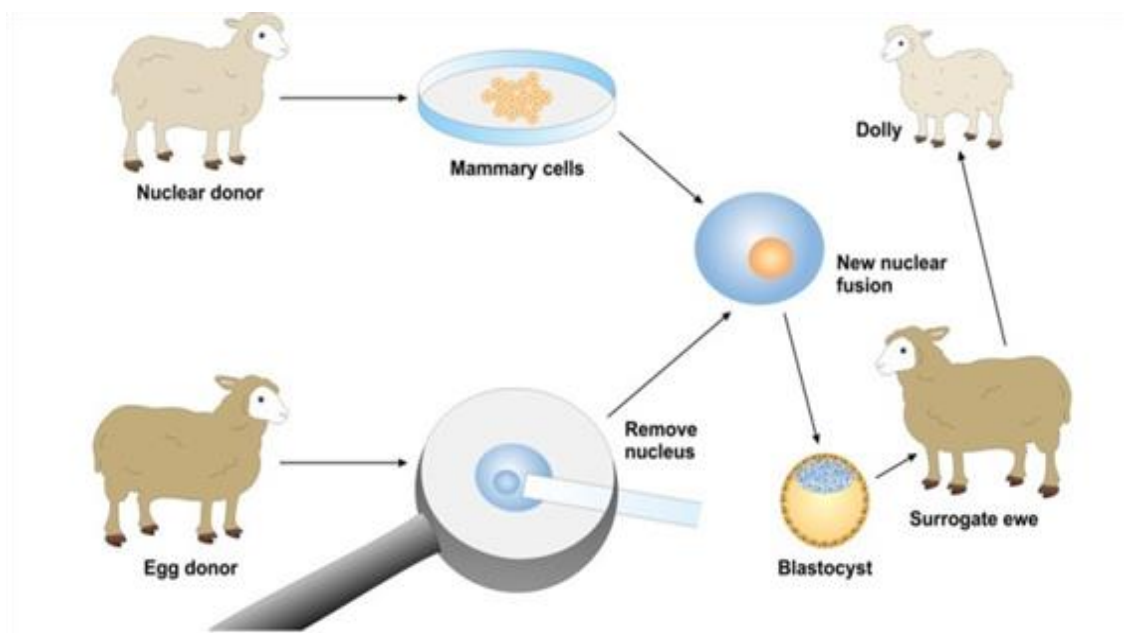
2.6.3 Embrionalne matične stanice

Matične stanice ranoga embrija za razliku od odraslih matičnih stanica, vrlo se lako izoliraju i uzgajaju. Budući da imaju mogućnost brze proliferacije i zadržanu sposobnosti diferencijacije u sve tipove stanica, nazivaju se pluripotentnima.

Embrionalne matične stanice miša moguće je dobiti iz unutrašnje mase stanica embrija i uzgajati ih u kulturi. Potrebno je održavati ih nediferenciranima, što omogućuje upotreba specifičnog faktora rasta LIF (engl. *leukemia inhibitory factor*). Uklanjanjem LIF-a, dolazi do agregacije stanica u embrioidna tjelešca te diferenciranja u različite tipove stanica kao što su adipociti, neuroni, krvne stanice, epitelne stanice itd. Faktori rasta koji se koriste u medijima za uzgoj embrionalnih matičnih stanica određuju sudbinu stanice. Ovo upućuje na važnost proučavanja faktora rasta koji bi omogućili uzgoj neurona ili stanica kardiomiocita za liječenje srca ili mozga oštećenih srčanim odnosno moždanim udarom (Cooper i Hausman, 2009).

2.6.4 Kloniranje prijenosom jezgre somatske stanice

Pedesetih godina prošloga stoljeća izvedeni su prvi pokusi kloniranja na žabama, kasnije se provode i na sisavcima uključujući ovce, miševe, goveda, zečeve itd. Postupkom prijenosa jezgre somatske stanice (epitel mliječne žlijezde), u neoplođenu jajnu stanicu kojoj je uklonjena jezgra enukleacijom, nastala je ovca Dolly. Embrij je nakon uzgoja u kulturi prebačen u zamjensku majku, pa je nastali potomak klon ovce koja je donirala jezgru (Slika 9). Kloniranje i embrionalne matične stanice koriste se u svrhe terapijskog kloniranja.



Slika 9. Postupak kloniranja- ovca Dolly (izvor: web 8)

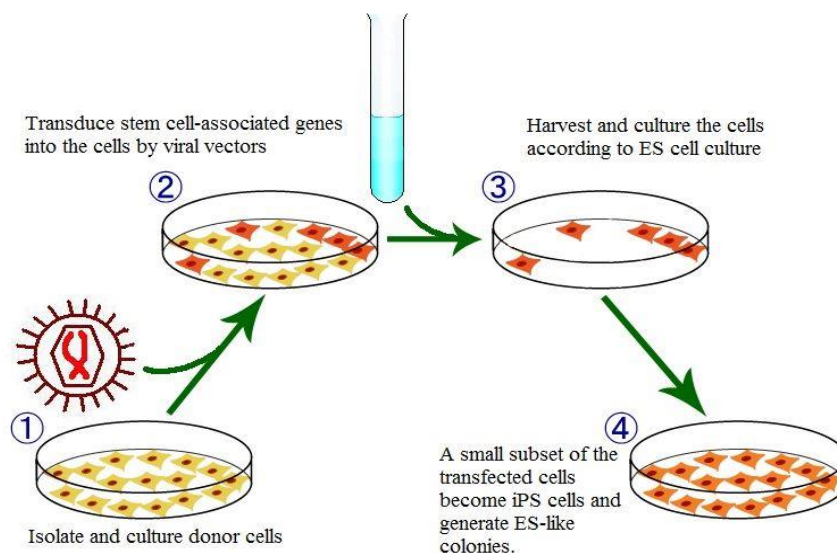
Terapijsko kloniranje temelji se na prijenosu jezgre u jajašce kojem je odstranjena jezgra, nakon čega slijedi uzgoj embrija u kulturi. Rani embrij je izvor embrionalnih matičnih stanica koje se dalje koriste i diferenciraju u potrebno tkivo za transplataciju. Prednost ovoga postupka je izbjegavanje imunološkog odbacivanja presatka zbog genetičke identičnosti presađivanih matičnih stanica s primateljem.

Samo 1-3% embrija dobivenih na gore opisani način može dati živo potomstvo. Većina embrija u daljnjem postupku bude uništena. Iz navedenog razloga znanost je više usmjerena

metodama kao što je uzgoj induciranih pluripotentnih matičnih stanica (Cooper i Hausman, 2009).

2.6.5 Inducirane pluripotentne matične stanice

Četiri transkripcijska faktora (Oct3/4, Sox2, Klf4 i c-Myc) dovoljna su za reprogramiranje tjelesnih stanica u pluripotentne matične stanice. Vektori za unošenje transkripcijskih faktora u stanicu su retrovirusi (Slika 10). Nastale inducirane pluripotentne matične stanice imaju sposobnost diferencijacije u veliki broj tipova stanica kada se prebace u mišji embrij. Ovo otkriće provedeno na mišjim fibroblastima potvrđeno je i na stanicama kože ljudi. I dalje postoje problemi i izazovi ovog postupka za koje znanost traži učinkovita rješenja. Primjerice, neki transkripcijski faktori, kao što je *c-Myc*, djeluju kao onkogeni. Nadalje, korištenje retrovirusa za unos transkripcijskih faktora u stanicu može uzrokovati mutacije koje vode nastanku raka (Cooper i Hausman, 2009).

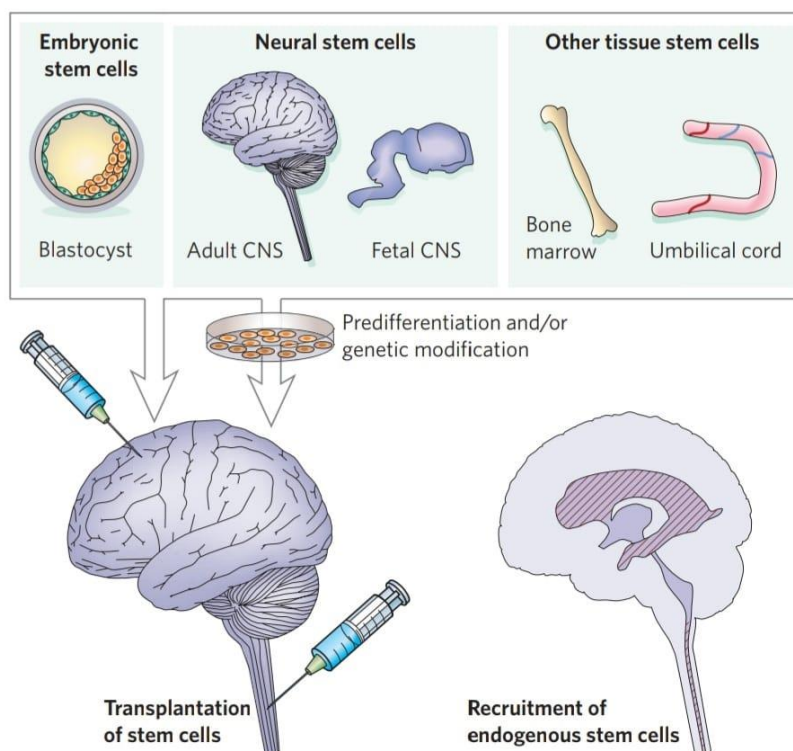


Slika 10. Proces razvoja induciranih pluripotentnih matičnih stanica (izvor: web 9)

2.6.6 Nova otkrića u kliničkoj primjeni matičnih stanica

Matične stanice su potencijalni izvor živčanih i glija stanica koje se mogu nadomjestiti oštećene stanice mozga i leđne moždine. Takvu sposobnost imaju embrionalne matične stanice i matične stanice fetalnog i odraslog centralnog živčanog sustava. Za terapiju primjenom matičnih stanica nužno je detaljno poznavanje patologije određene bolesti. Ovisno o uzroku i obliku oštećenja, liječenje uključuje i potrebne lijekove. Na opisani način postignuti su rezultati u liječenju moždanog udara, Huntingtonove bolesti, multiple skleroze, Alzheimerove bolesti itd. (Lindvall i Kokaia, 2006).

Primjena matičnih stanica ostvaruje se postupkom direktne transplatacije ili transplatacijom neposredno nakon prediferencijacije, odnosno genetske modifikacije stanica u kulturi (Slika 11). Svrha ovog postupka je usmjeravanje diferencijacije ka specifičnim neuronima, glija stanicama ili stanicama koje proizvode posebne neurozaštitne molekule kojima se uspostavlja mehanizam oporavka putem vlastitih matičnih stanica pacijenta. Te stanice migriraju i popunjavaju oštećenje mozga ili leđne moždine (Lindvall i Kokaia, 2006).



Slika 11. Primjena matičnih stanica za liječenje neuroloških poremećaja (izvor: Lindvall i Kokaia, 2006)

2.6.7 Moždani udar

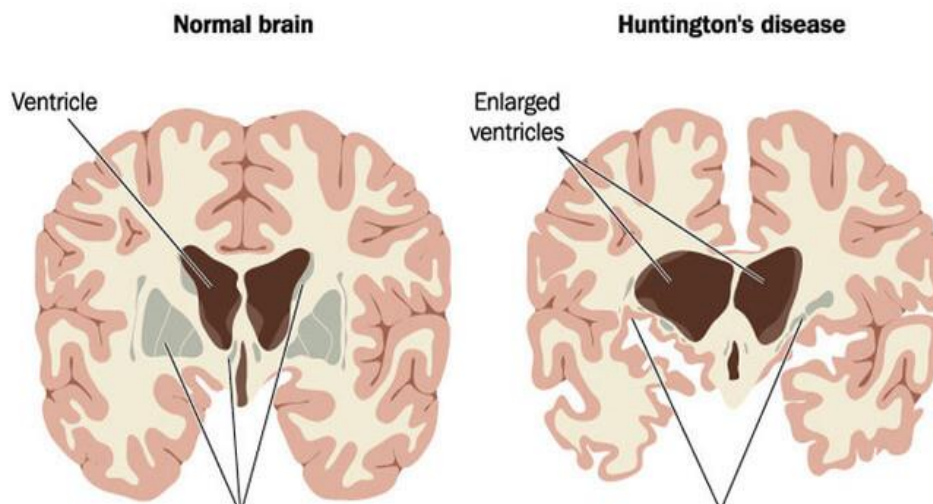
Začepljenjem moždane arterije dolazi do nastanka moždanog udara koji je popraćen žarišnom ishemijom, gubitkom živčanih i glija stanica, te motornim, osjetilnim i kognitivnim oštećenjima. Transplatacija matičnih stanica predstavlja metodu liječenja. Izvori matičnih stanica poput fetalnog mozga, stanica neuroepitela, koštane srži ili pupčane vrpce koriste se u liječenju i oporavku od moždanog udara. Trofički faktori prehranjuju stanice čime im omogućuju preživljavanje, te održavanje funkcije. Terapija matičnim stanicama ima za cilj zamijeniti uništene neurone, nemijelinizirane aksone ali i popraviti živčane puteve.

Transplatacija ljudskih fetalnih živčanih matičnih stanica u mozak štakora oštećen moždanim udarom. To dovodi do migracije novih živčanih stanica prema mjestu ozlijede. Nadalje, istraživanja pokazuju da transplatacija majmunskih embrionalnih matičnih stanica u mozak miša rezultira diferencijacijom u živčane i glija stanice, čime se obnavljaju uništeni živčani putevi te veza s ciljnim neuronima. Posljedica je poboljšanje motoričkih funkcija. Mogućnost poboljšanja ove metode je genetska modifikacija matičnih stanica, primjerice ekspresijom anti-apoptotičkih gena. Siva moždana tvar odraslih glodavaca ima sposobnost samoobnavljanja nakon oštećenja uzrokovanog moždanim udarom pri čemu su vlastite matične stanice izvor novih neurona koji migriraju na mjesto ozlijede. Stoga se brojna istraživanja bave istraživanjem može li i na koji način ljudski mozak povećati mogućnost preživljavanja vlastitih kortikalnih neurona (Lindvall i Kokaia, 2006).

2.6.8 Huntingtonova bolest

Huntingtonova bolest je smrtonosan poremećaj koji je popraćen drhtanjem, spontanim i nekontroliranim pokretima tijela te progresivnom demencijom (Slika 12). Uzrok ovog stanja je odumiranje eksitacijskih neurona sive tvari. U liječenju ove bolesti također se može primijeniti terapija matičnim stanicama kojoj je glavni cilj vratiti ili sačuvati funkcije mozga zamjenom ili zaštitom neurona sive tvari. Istraživanja provedena na štakorima pokazala su da presađivanje fetalnih neurona sive tvari može potpuno oporaviti mozak. Kliničkim ispitivanjima dokazan je i oporavak ljudskog mozga na isti način. Iako nije vidljivo uspostavljanje moždane cirkulacije,

ljudske živčane matične stanice implantirane u mozak štakora pokazuju značajno smanjenje motornih oštećenja uz pomoć trofičkih faktora (Lindvall i Kokaia, 2006).



Slika 12. Prikaz razlike između zdravog mozga i mozga osobe oboljele od Huntingtonove bolesti (izvor: web 10)

2.6.9 Budućnost- cjepiva protiv razvoja karcinoma

Pluripotentne matične stanice su u novije vrijeme značajne za regenerativnu medicinsku primjenu. Rijetka populacija stanica koje grade tumore, nazvane karcinomske matične stanice (engl. *Cancer stem cells*, CSC), odgovorne su za rezistenciju na kemoterapiju, radioterapiju i stvaranje metastaza, razvoj i recidiv karcinoma. U liječenju i prevenciji karcinoma, korištene su brojne tehnike koje ciljaju na CSC. Tako se u novije vrijeme, primjenom pluripotentnih matičnih stanica, razvijaju protutumorska cjepiva. Uzgojem karcinomskih matičnih stanica *in vitro*, moguće je proizvesti velike količine CSC-specifičnih antigena.

Inaktivirane karcinomske matične stanice koriste se za proizvodnju cjepiva protiv karcinoma pluća, kolona i jajnika kod životinja. Dok se nalaze u imunosupresivnom okolišu tumora, stanice raka mogu potisnuti aktivaciju stanica imunološkog sustava. Cjepivo koje se temelji na CSC-specifičnim antigenima može naučiti stanice imunološkog sustava da prepoznaju stanice raka, te da ih uklone. Kao rezultat, imunološki odgovor selektivno je usmjeren prema stanicama tumora pacijenta, dok se istovremeno sprječava imunološki napad na zdrave stanice.

Sličnosti između pluripotentnih matičnih stanica i karcinomskih matičnih stanica uključuju jednake razvojne putove na biološkoj i molekularnoj razini, sličnu aktivaciju inicijalnih signalnih puteva, ekspresiju transkripcijskih faktora, proteinski sastav i metabolizam. Studije i saznanja o embrionalnom razvoju, te njegove sličnosti s razvojnim procesima karcinoma, koji pokazuju da procesi uključeni u rani razvoj embrija sudjeluju i u formiranju karcinoma, pomažu znanstvenicima u istraživanju novih metoda i terapija. Metode liječenja karcinoma će se i dalje poboljšavati primjenom novih saznanja temeljenih na istraživanju specifičnih tumorskih markera, utjecaja embrionalnog mikrokoliša, svojstava matičnosti, puteva pluripotentnosti i razvojem cjepiva (Barati i sur., 2021).

3 Sažetak

Smrt stanice uobičajen je fiziološki proces kojim organizmi gube ostarjele, oštećene i nepotrebne stanice. Kao temelj funkcioniranja višestaničnih organizama, uspostava ravnoteže između konstantnog uništavanja stanica putem programirane stanične smrti ili slučajnom ozljedom i ponovne obnove, ključna je u preživljavanju organizma. Postizanje navedene ravnoteže kompleksan je proces koji zahtjeva brojne kemijske i biološke čimbenike, te posebne uvjete mikrokoliša. Mnogostanični organizmi posjeduju matične stanice kojima nadomještaju stanice izgubljene apoptozom. Matične stanice omogućavaju regeneraciju tkiva i organa, te su osim u suvremenoj staničnoj i molekularnoj biologiji, važne u kliničkoj medicini. Već sada se koriste se u liječenju karcinoma, autoimunih i drugih bolesti koje do sada nisu imale uspješnu alternativnu metodu liječenja. Dosadašnja otkrića i primjena matičnih stanica u transplatacijske i regenerativne svrhe upućuje na činjenicu da će matične stanice i u budućnosti otvarati nove mogućnosti liječenja i biti jedinstvene u medicini.

4 Literatura

- Cooper G. M., Hausman R. E. (2009). The Cell: A Molecular Approach, 5th Edition, Medicinska naklada, Zagreb.
- Karp G. (2013). Cell and Molecular Biology, 7th Edition, Wiley.
- Sengupta V., Sengupta S., Lazo A., Woods P., Nolan A., Bremer N. (2020). Exosomes Derived from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells as Treatment for Severe COVID-19. Stem Cells and Development, 29, 12, 747-754.
- Clara J. A., Monge C., Yang Y., Takebe N. (2019). Targeting signalling pathways and the immune microenvironment of cancer stem cells — a clinical update. Nature Reviews Clinical Oncology, 17, 204-232.
- Foo J. B., Looi Q. H., Chong P. P., Hassan N. H., Yeo G. E. C., Ng C. Y., Koh B., How C. W., Lee S. H. i Law J. X. (2021). Comparing the Therapeutic Potential of Stem Cells and their Secretory Products in Regenerative Medicine. Stem cells international.
- Reddy K. B. (2020). Stem Cells: Current Status and Therapeutic Implications. Genes, 11, 11, 1372.
- Horvitz H. R. (1990). The Caenorhabditis elegans genes ced-3, and ced-4 act cell autonomously to cause programmed cell death. Developmental biology, 138, 33-41.
- Xiong S., Mu T., Wang G., Jiang X. (2014). Mitochondria-mediated apoptosis in mammals. Protein Cell, 5, 737-749.
- Mizushima N. (2007). Autophagy: process and function. Genes and development, 21, 22, 2861-2873.

- Žlender V. (2003). Apoptosis-programmed cell death. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 54, 267-274.
- Alison M. R., Poulsom R., Forbes S. and Wright N. A. (2002). An introduction to stem cells. The Journal of Pathology, 197, 419-423.
- Lindvall O. i Kokaia Z. (2006). Stem cells for the treatment of neurological disorders. Clinical Investigation, 120, 29-40.
- Barati M., Akhondi M., Sabahi Mousavi N., Haghparast N., Ghosi A., Baharvand H., Ebrahimi M. i Hassani S. M. (2021). Pluripotent Stem Cells: Cancer Study, Therapy, and Vaccination. Stem Cell Reviews and Reports, 1-18.
- Wicky B. I. M., Gupta K., Kwan T. O. C., Robinson C. V., Clarke J. (2019). Spontaneous oligomerization of BAK/BAX is suppressed by hetero-dimerization with MCL-1, 10.1101/756874

Mrežne stranice:

- web 1: <https://slidetodoc.com/uvod-u-neuromiine-bolesti-goran-imi-neuromuskularni-sustav/>
- web 2: <https://sh.wikipedia.org/wiki/kaspaza>
- web 3: <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/15/2/420>
- web 4: https://www.researchgate.net/figure/A-generalized-schematic-for-the-mitochondrial-apoptosis-pathway-During-apoptosis-the_fig4_45694972
- web 5: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/616149/fig1/> web 6: <https://hr.weblogographic.com/why-are-stem-cells-important>
- web 7: <https://novosti.tumori.me/ne-hodgkinov-limfom/>

- web 8: https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_Molekularis_terapiak_e_n_book/ch08s02.html
- web 9: <https://hr.differencevs.com/6852789-difference-between-ips-cells-and-embryonic-stem-cells>
- web 10: <https://www.krenizdravo.hr/zdravlje/bolesti-zdravlje/huntingtonova-bolest-uzroci-simptomi-i-lijecenje>