

UNIVERZITET U BEOGRADU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Nebojša A. Nikolić

IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA
HUMANIH MATIČNIH ĆELIJA PULPE
MLEČNIH ZUBA

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF DENTISTRY

Nebojša A. Nikolić

ISOLATION AND CHARACTERISATION OF
HUMAN DENTAL PULP STEM CELLS
FROM DECIDUOUS TEETH

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

Mentori:

Naučni savetnik dr Diana Bugarski, Univerzitet u Beogradu, Institut za medicinska istraživanja

Prof. dr Jelena Milašin, Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet

Komisija

Doc. dr Vanja Petrović, Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet

Prof. dr Vesna Danilović, Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet

Prof. dr Pavle Anđus, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Datum odbrane:

ZAHVALNICA

Veliku zahvalnost dugujem mom mentoru, dr Diani Bugarski, naučnom savetniku Instituta za medicinska istraživanja i izuzetnom stručnjaku, koja me je uvela u svet matičnih ćelija i otvorila vidike u tom, danas toliko značajnom polju biomedicinskih nauka.

Takođe, ogromnu zahvalnost dugujem dr Aleksandri Krstić, naučnom saradniku Instituta za medicinska istraživanja, na velikom angažovanju i nesebičnoj pomoći od samog početka izrade doktorske disertacije pa sve do njenih završnih faza.

Izrada disertacije bila je omogućena sredstvima projekta 175062 Ministarstva prosvete i nauke čiji je rukovodilac dr Diana Bugarski.

Veliku zahvalnost dugujem svom komentoru prof. dr Jeleni Milašin kao i svim članovima komisije čiji su saveti takođe doprineli da se ova disertacija realizuje i unapredi.

Zahvalnost iskazujem i svojoj porodici na strpljenju i velikoj i konstantnoj podršci.

SAŽETAK

IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA HUMANIH MATIČNIH ĆELIJA PULPE MLEČNIH ZUBA

U poslednje dve decenije, biologija matičnih ćelija je postala izuzetno važno polje za razumevanje procesa regeneracije tkiva i implementacije principa regenerativne medicine i tkivnog inženjerstva u kliničku praksu. Iako pluripotentni potencijal embrionalnih matičnih ćelija daje najveće mogućnosti za njihovu potencijalnu primenu, pokrenute rasprave o etici takvih istraživanja, kao i usvojena zakonska rešenja u mnogim zemljama su ograničila njihovo korišćenje i usmerili su istraživanja ka pronalasku drugih izvora matičnih ćelija. Adultne matične ćelije su specijalizovane matične ćelije nađene u mnogim tkivima odraslog organizma, u kojima imaju ulogu u održavanju tkivne homeostaze. Izolacija matičnih ćelija iz dentalnih tkiva opisana je prvi put 2000. godine, kada su izolovane matične ćelije iz pulpe stalnih zuba, a kasnije su opisane i matične ćelije izolovane iz pulpe mlečnih zuba (MMZ), matične ćelije iz periodontalne membrane, matične ćelije iz apikalne papile i progenitorske ćelije iz dentalnog folikula. Ove populacije adultnih ćelija ispoljavaju sve osobine mezenhimalnih matičnih ćelija, uključujući sposobnost samoobnove i multipotentni potencijal diferencijacije, što uz laku dostupnost tkiva i rutinskih procedura kojima se ćelije mogu dobiti, otvara nove mogućnosti za kliničku primenu u okviru regenerativne stomatologije i medicine.

Istraživanja obuhvaćena ovom disertacijom imala su za cilj izolovanje, identifikaciju i karakterizaciju multipotentnih mezenhimalnih matičnih ćelija poreklom iz pulpe mlečnih zuba, ispitivanje njihovog oporavka i vijabilnosti nakon krioprezervacije, kao i uticaj mikrookruženja na proliferaciju ovih ćelija.

Dobijeni rezultati su pokazali da se metodom enzimske digestije iz pulpe mlečnih zuba uspešno izoluju mezenhimalne matične ćelije koje nakon krioprezervacije i odležavanja pokazuju visok stepen oporavka i vijabilnosti. One imaju visok klonogeni potencijal,

preko 80% kada su zasejavane u niskim koncentracijama, a proliferativni kapacitet tokom kratkotrajnih kultura pokazao je da se broj ćelija nakon dva dana inkubacije dvostruko povećava, a sedmog dana inkubacije šest puta. Tokom dugotrajnog kultivisanja određivano je vreme dupliranja populacije, koje je iznosilo od 50 do 80 sati i ukazalo da je proliferativni kapacitet MMZ očuvan tokom dugotrajne kultivacije i ekspanzije, da se vreme dupliranja populacije povećava u toku dugotrajne kulture ćelija, ali i da zavisi od početne koncentracije ćelija. MMZ eksprimiraju karakteristične membranske markere, CD105, CD90, CD44 i STRO-1 kao i intracelularne mezenhimalne markere α -SMA i vimentin, a ne eksprimiraju karakteristične hematopoetske markere CD34, CD11b, CD33, CD45 i CD235. MMZ poseduju multipotentni potencijal diferencijacije, jer su nakon kultivacije u odgovarajućim indukcionim medijumima diferentovale u pravcu osteogenih, hondrogenih, adipogenih i miogenih ćelija. Ispitivanjem pojedinačnih efekata IL-17 i bFGF na proliferaciju MMZ utvrđeno je da i IL-17 i bFGF ispoljavaju stimulatorni efekat na rast ovih ćelija, pri čemu je stimulatorni efekat bFGF na proliferaciju MMZ bio jače izražen, a njihova kombinacija je dovela do najvećeg povećanja broja ćelija.

Dobijeni rezultati ukazuju da pulpa mlečnih zuba predstavlja optimalan izvor lako dostupnih adultnih matičnih ćelija sa velikim potencijalom za upotrebu u regenerativnoj medicini i stomatologiji.

Ključne reči:

mesenchymal stem cells, dental stem cells, SHED, tooth regeneration, CFU-F, proliferation, cryopreservation, multilineage differentiation, FGF, IL-17

Naučna oblast: Stomatološke nauke i biološke nauke

Uža naučna oblast: Matične ćelije

UDK broj: 602:611.314.18.018(043.3)

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERISATION OF HUMAN DENTAL PULP STEM CELLS FROM DECIDUOUS TEETH

In the past two decades stem cell biology has become a very important field for the understanding of tissue regeneration and implementation of the principles of regenerative medicine and tissue engineering in clinical practice. Although the pluripotent potential of embryonic stem cells for differentiating into specialized cell types carries the most potential for their use, arguments about the ethics of embryonic stem cell research and current legal regulations in many countries have limited their use and forced researchers to seek out other sources of stem cells.

Adult stem cells are specialized cells found in many tissues, where their role is to keep tissue homeostasis. Stem cells of dental origin were initially isolated in 2000, when stem cells from the pulp of permanent teeth were isolated. Later stem cells from the pulp of exfoliated deciduous teeth (SHED) were isolated, as well as stem cells from the periodontal ligament, apical papilla and dental follicle. They possess the properties of mesenchymal stem cells, including the potential to self-renew and the ability to differentiate into a variety of specialized cell types, which opens new possibilities for clinical procedures in regenerative dentistry and medicine, considering that they are so readily available.

The aim of this dissertation was to isolate, identify and characterise multipotent mesenchymal stem cells from the pulp of deciduous teeth, investigate their recovery and viability after the cryopreservation, and to explore the influence of the microenvironment on the proliferation of these cells.

The results showed that the enzyme digestion method can be used for the successful isolation of stem cells from the pulp of deciduous teeth and that these cells show a high level of recovery and viability after cryopreservation and thawing. They have high

clonogenic potential, above 80%, when cultured in small concentrations, and short-term proliferative potential showed a two-fold increase in cell number after two days of culturing, and six-fold after seven days. During long-term culturing, the population doubling time, which varied from 50 to 80 hours, showed that proliferative capacity was retained in long-term cultivation and expansion, that the population doubling time increased during this period and depended on the number of seeded cells. SHED expressed membrane mesenchymal stem cell markers, CD105, CD90, CD44 and STRO-1, as well as intracellular mesenchymal markers α -SMA and vimentin, but did not show the expression of hematopoietic markers CD34, CD11b, CD33, CD45 and CD235. SHED possesses the multipotent differentiation potential because after cultivation in the appropriate induction medium they differentiated into osteogenic, chondrogenic, adipogenic and myogenic cells. Investigation of the effects of IL-17 and bFGF on the proliferation of SHED showed that both IL-17 and bFGF have a stimulating effect on the proliferation of these cells, where FGF had a stronger stimulating effect, while in combination they showed the highest increase in cell number.

The results of this dissertation show that the pulp of deciduous teeth is an optimal source of easily accessible adult stem cells with a high potential for application in regenerative medicine and dentistry.

Keywords:

mesenchymal stem cells, dental stem cells, SHED, tooth regeneration, CFU-F, proliferation, cryopreservation, multilineage differentiation, FGF, IL-17

Scientific field: Dentistry and biology

Specialized scientific field: Stem cells

UDK number: 602:611.314.18.018(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. MATIČNE ĆELIJE	1
1.1.1. HUMANE EMBRIONALNE MATIČNE ĆELIJE	3
1.1.2. ADULTNE MATIČNE ĆELIJE	7
1.1.2.1. MATIČNE ĆELIJE HEMATOPOEZE	8
1.1.2.2. MEZENHIMALNE MATIČNE ĆELIJE	12
1. 2. MATIČNE ĆELIJE DENTALNOG POREKLA	17
1. 2. 1. MATIČNE ĆELIJE IZ PULPE STALNIH ZUBA	17
1. 2. 2. MATIČNE ĆELIJE IZ PULPE MLEČNIH ZUBA	20
1. 2. 3. MATIČNE ĆELIJE IZ PERIODONTALNE MEMBRANE	22
1. 2. 4. MATIČNE ĆELIJE IZ APIKALNE PAPILE	23
1. 2. 5. PREKURSORSKE ĆELIJE IZ DENTALNOG FOLIKULA	24
1.3. MATIČNE ĆELIJE I TERAPIJA	25
1.3.1. MATIČNE ĆELIJE U TKIVNOM INŽENJERSTVU	26
1.3.2. MATIČNE ĆELIJE U REGENERACIJI TKIVA I KLINIČKE STUDIJE	29
1.4. MATIČNE ĆELIJE DENTALNOG POREKLA I TERAPIJA	32
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	42
3. MATERIJAL I METODE	44
3.1. IZOLACIJA I KULTIVISANJE MMZ	44
3.2. KRIOPREZERVACIJA I ODLEĐIVANJE MMZ	45
3.3. CFU-F (Colony Forming Unit-Fibroblast) TEST	46

3.4. ODREĐIVANJE PROLIFERATIVNOG KAPACITETA ĆELIJA	47
3.5. IMUNOFLUORESCENTNO BOJENJE ĆELIJA	48
3.5.1. PROTOČNA CITOMETRIJA	48
3.5.2. TEST INDIREKTNE FLUORESCENCE ZA DETEKCIJU INTRACELULARNIH ĆELIJSKIH MARKERA	50
3.6. ODREĐIVANJE POTENCIJALA DIFERENCIJACIJE ĆELIJA	50
3.6.1. <i>IN VITRO</i> OSTEOGENA DIFERENCIJACIJA	50
3.6.1.1 ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ALKALNE FOSFATAZE	51
3.6.2. <i>IN VITRO</i> HONDROGENA DIFERENCIJACIJA	51
3.6.2.1. SAFRANIN O BOJENJE	52
3.6.3. <i>IN VITRO</i> ADIPOGENA DIFERENCIJACIJA	52
3.6.3.1. OIL RED O (Sigma-Aldrich) BOJENJE	52
3.6.4. <i>IN VITRO</i> MIOGENA DIFERENCIJACIJA	53
3.7. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA	53
4. REZULTATI	54
4.1. IZOLACIJA I KULTIVISANJE MMZ	54
4.2. KRIOPREZERVACIJA I ODMRZAVANJE MMZ	55
4.3. CFU-F (Colony Forming Unit-Fibroblast) TEST	57
4.4. ODREĐIVANJE PROLIFERATIVNOG KAPACITETA ĆELIJA	59
4.5. IMUNOFENOTIPSKE ANALIZE	61
4.5.1. PROTOČNA CITOMETRIJA	61
4.5.2. IMUNOFLUOROSCENENTNO BOJENJE	64
4.6. <i>IN VITRO</i> DIFERENCIJACIJA MMZ	66
4.6.1. <i>IN VITRO</i> OSTEOGENA DIFERENCIJACIJA	66
4.6.2. <i>IN VITRO</i> HONDROGENA DIFERENCIJACIJA	67
4.6.3. <i>IN VITRO</i> ADIPOGENA DIFERENCIJACIJA	68

4.6.4. <i>IN VITRO</i> MIOGENA DIFERENCIJACIJA	69
4.7. UTICAJ IL-17 i FGF NA PROLIFERACIJU MMZ	70
5. DISKUSIJA	74
6. ZAKLJUČCI	93
7. LITERATURA	95
BIOGRAFIJA AUTORA	108

1. UVOD

1.1. MATIČNE ĆELIJE

Matične ćelije su izvorne ćelije organizma sisara, koje postoje na svakom stepenu razvića od oplođene jajne ćelije do odraslog organizma. U poslednje dve decenije, biologija matičnih ćelija je postala izuzetno važno polje za razumevanje procesa regeneracije tkiva i implementacije principa regenerativne medicine i tkivnog inženjerstva u kliničku praksu. Sam početak istraživanja matičnih ćelija vezuje se za rani dvadeseti vek kada je po prvi put objavljena hipoteza da je jedna matična ćelija prethodnica svih hematopoetskih ćelija i kada su urađeni prvi pokušaji lečenja pacijenata obolelih od teških oboljenja krvi pomoću kostne srži, koja je neuspešno davana pacijentima oralno. Tvorcima nauke o matičnim ćelijama smatraju se Ernest McCulloch i James Till, koji su početkom šezdesetih godina prošlog veka u sada klasičnim eksperimentima (Till i McCulloch, 1961), omogućili prvu funkcionalnu identifikaciju matičnih ćelija u hematopoetskom sistemu i na taj način postavili temelj za dalja istraživanja na adultnim i embrionalnim matičnim ćelijama.

Po opštoj definiciji, matične ćelije predstavljaju nespecializovane ćelije koje imaju sposobnost samoobnavljanja sopstvene populacije i mogućnost diferenciranja u veći broj specijalizovanih ćelija. U ranim fazama embrionalnog razvoja od matičnih ćelija nastaje veliki broj specijalizovanih, zrelih ćelija koje grade tkiva i organe. Međutim, tokom rasta i razvoja, matične ćelije ne nestaju iz organizma, već opstaju u telu i čine rezervu koja omogućava da se svakodnevno vrši oporavak oštećenih ili ostarelih tkiva.

Samoobnavljanje sopstvene populacije i usmerena diferencijacija su karakteristike koje definišu matične ćelije i razlikuju ih od drugih tipova ćelija. Samoobnavljanje je sposobnost matičnih ćelija da se dele tokom dugog vremenskog perioda i stvaraju nove matične ćelije, pri čemu najmanje jedna kćerka ćelija poseduje identičan

potencijal samoobnove i diferencijacije kao majka ćelija. Za rani embrionalni period karakteristične su simetrične deobe ćelija kada matična ćelija daje dve identične kćerke ćelije. Kasnije u toku razvoja, kao i kod odraslog organizma u cilju održavanja homeostaze, matične ćelije se dele asimetrično, pri čemu nastaje po jedna identična kćerka ćelija i druga koja je usmerena ka diferencijaciji.

Druga karakteristična osobina matičnih ćelija je njihova sposobnost da se u odgovarajućim uslovima, prema potrebama organizma, opredeljuju za diferencijaciju u određenom pravcu, produkujući specijalizovane zrele ćelije. Matične ćelije mogu imati različite potencijale diferencijacije, uključujući:

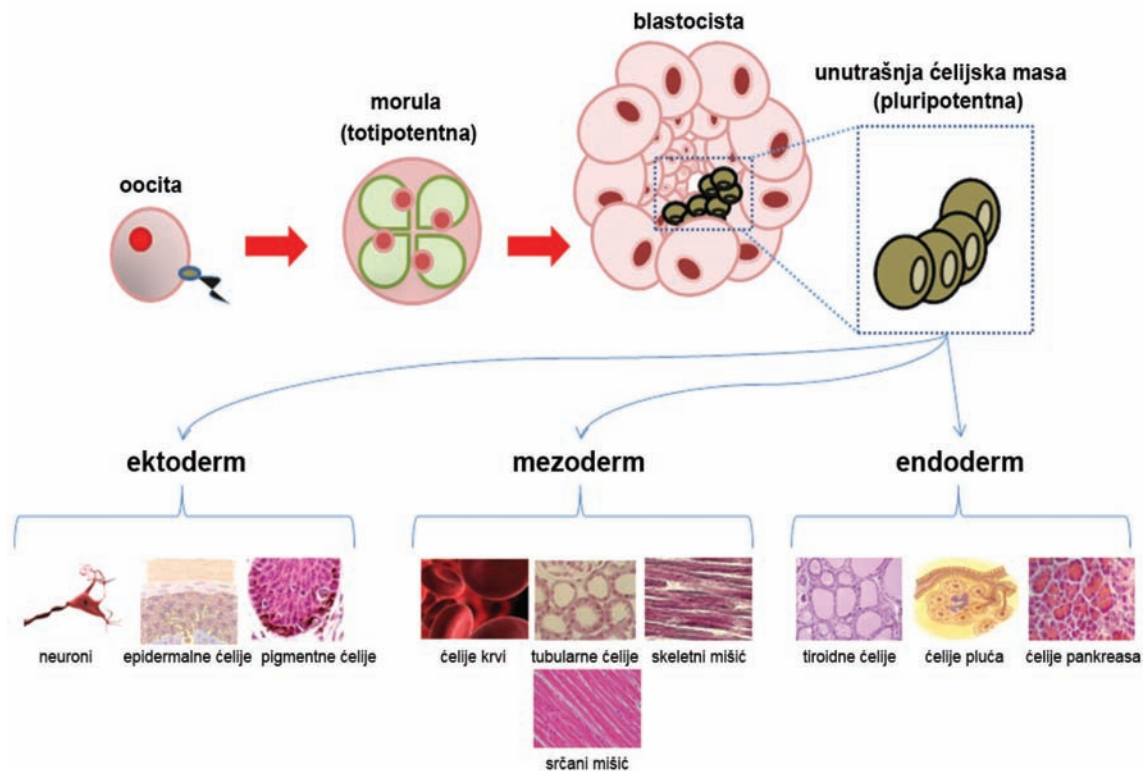
- totipotentnost zigota - matičnih ćelija koje nastaju po oplodjenju i mogu se diferencirati u bilo koji ćelijski tip;
- pluripotentnost embrionalnih matičnih ćelija - matične ćelije potomci totipotentnih ćelija, iz kojih se mogu razviti praktično sva tkiva organizma;
- multipotentnost somatskih matičnih ćelija - fetalne/adultne matične ćelije ili tkivno-specifične matične ćelije, iz kojih nastaju specijalizovana tkiva;
- unipotentnost matičnih ćelija - produkuju samo jedan tip ćelija, ali zadržavaju sposobnost samoobnove.

Matične ćelije koje se danas koriste u istraživanjima se često označavaju i na osnovu tkiva iz koga se izoluju, te na osnovu takve klasifikacije razlikujemo:

- embrionalne matične ćelije koje se dobijaju iz embriona u ranim stadijumima razvoja;
- fetalne matične ćelije koje se izoluju iz tkiva fetusa (nakon abortusa);
- umbilikalne matične ćelije koje se izoluju iz krvi i pihtijastog vezivnog tkiva pupčane vrpce nakon porođaja;
- adultne matične ćelije koje se izoluju iz mnogih tkiva odraslog organizma;
- indukovane pluripotentne matične ćelije (iPS), nova vrsta laboratorijski izvedenih matičnih ćelija, kada se funkcionalno zrele ćelije (n.pr. kože) genetski “reprogramiraju” i stiču osobine embrionalnih matičnih ćelija.

1.1.1. HUMANE EMBRIONALNE MATIČNE ĆELIJE

Embrionalne matične ćelije su pluripotentne ćelije od kojih nastaju gotovo sve ćelije organizma (Vazin i Freed, 2010). Humane embrionalne ćelije izoluju se iz embriona u stadijumu blastociste, koji se formira oko petog dana nakon oplodnje i sastoji se od 50-150 ćelija. To je period u kome ćelije poseduju pluripotentni potencijal, nakon čega u periodu gastrulacije počinje diferencijacija u pravcu tri klicina lista: ektoderm, endoderm i mezoderm, od kojih kasnije nastaje više od 220 tipova ćelija odraslog organizma - ćelije nervnog sistema (neuroni, glija ćelije i oligodendrociti), osteoblasti, hondrociti, keratinociti, endotelne ćelije, ćelije nadbubrežne žlezde, skeletne mišićne ćelije, progenitori hematopoeze, hepatociti, pankreatociti, srčane i mišićne ćelije (Slika 1). Osnovne funkcionalne karakteristike embrionalnih ćelija su: a) sposobnost da u nediferenciranom stanju mogu skoro neograničeno da održavaju proliferativni potencijal (Brandenberger i sar., 2004); b) mogućnost diferencijacije u specifične ćelije sva tri klicina lista. Tanka granica između samoobnavljanja i opredeljenog puta diferencijacije leži u intracelularnim kontrolnim mehanizmima, kao i u signalima specifične mikrosredine.



Slika 1. Pluripotentnost embrionalnih matičnih ćelija. U periodu blastociste embrionalne matične ćelije poseduju pluripotentni potencijal diferencijacije u sva tri klicina lista, ektoderm, mezoderm i endoderm, od kojih kasnije nastaje više od 220 tipova ćelija odraslog organizma (Modifikovano prema: Salem HK, Thiernemann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells*. 2010 Mar 31;28(3):585-96.)

Istraživanja embrionalnih matičnih ćelija započela su šezdesetih godina prošlog veka tokom proučavanja jedne vrste kancera, teratokarcinoma, kada je uočeno da se iz ovog kompleksnog tumora mogu izolovati i pojedinačne nediferencirane i nespecijalizovane ćelije koje su pokazivale sposobnost da diferenciraju u različite ćelijske tipove, i koje su nazvane embrionalnim karcinomskim ćelijama, (Kleinsmith i Pierce, 1964). Dalja istraživanja kod eksperimentalnih životinja dovela su do otkrića embrionalnih matičnih ćelija početkom 80-tih godina. Po prvi put, embrionalne matične ćelije izolovane su iz mišijih embriona kada je i opisana tehnika njihove kultivacije *in vitro* (Evans i Kaufman, 1981; Martin, 1981). Humane embrionalne ćelije prvi put su opisane mnogo

kasnije kada je objavljena metoda njihove izolacije i kultivisanja iz humanih blastocista (Thomson i sar., 1998). Najčešći izvor embrionalnih matičnih ćelija koje se danas koriste u istraživanjima su blastociste koje se odbacuju nakon *in vitro* fertilizacije u procesu vantelesne oplodnje. Iz unutrašnje ćelijske mase blastociste izdvajaju se ćelije koje se zasejavaju *in vitro* u specifičnom diferencijacionom medijumu, u kome se dalje formiraju agregati, koji se nazivaju embrioidna telašca i sastoje se od ćelija sva tri klicina lista (Reubinoff i sar., 2000, Cowan i sar., 2004). U ovim telašcima, koja na određeni način podsećaju na rani embrionalni razvitak, svaka ćelija, u zavisnosti od lokacije, je okružena različitim uslovima mikrosredine, odnosno do nje dopiru različiti autokrini i parakrini signali, koji određuju njenu dalju diferencijaciju u različita tkiva.

Korišćenjem ove metode izolovan je veliki broj linija embrionalnih matičnih ćelija, koje se karakterišu ekspresijom markera embrionalnih matičnih ćelija, imaju visoku telomeraznu aktivnost, normalan kariotip, održan potencijal diferencijacije *in vivo* i *in vitro* i zadržavaju karakteristike nakon dugog perioda kultivisanja. Pluripotentni potencijal diferencijacije ovakvih linija dokazuje se u *in vivo* i *in vitro* uslovima. Dobijanjem teratoma, tumora germinativnih ćelija koji se sastoji iz nekoliko različitih tkiva, nakon transplantacije u imunodeficientnog miša, dokazuje se *in vivo* pluripotentnost (Bosma i sar., 1983). Dobijanjem derivata sva tri klicina lista i formiranjem embrionalnih telašaca u adherentnim kulturama ili u suspenzionim tečnim kulturama dokazuje se *in vitro* pluripotentnost ovih ćelija (Reubinoff i sar., 2000).

Humane embrionalne matične ćelije su sitne ćelije sa velikim nukleusno-citoplazmatskim odnosom i nekoliko sitnih jedaraca, koje rastu u obliku kompaktnih, zaravnjenih kolonija, sa kratkim vremenom dupliranja populacije. Ove ćelije ekspimiraju čitav set membranskih i unutarćelijskih specifičnih markera karakterističnih za nediferencirano stanje - stanje pluripotentnosti. Membranski markeri uključuju embrionalne markere karakteristične za različite stadijume embriogeneze, tzv. SSEA markere (od engl. stage specific embryonic antigen). Antigen SSEA-3 je najsenzitivniji marker najprimitivnijih embrionalnih matičnih ćelija, dok se u toku diferencijacije

povećava ekspresija SSEA-1, a smanjuje ekspresija SSEA-3 i SSEA-4 markera. Ove ćelije pokazuju i ekspresiju antigena odbacivanja tumora TRA (od engl. tumor rejection antigen) i to TRA-1-60 i TRA-1-81, kao i CD9 (od engl. cluster of differentiation-klaster diferencijacije 9), Thy-1 (CD90), kao i HLA-I (histokompatibilni antigen-I) klasu antigena. Unutarćeljski markeri uključuju prisustvo transkripcionih faktora Oct4 (od engl. octamer binding transcription factor 4 – oktamer vezujući transkripcioni faktor 4), Nanog i Sox2 (Carpenter i sar., 2003). Takođe je prisutna i visoka telomerazna aktivnost, kao i izrazita aktivnost alkalne fosfataze (Brandenberger i sar., 2004).

Humane embrionalne matične ćelije eksprimiraju od 2400 do 3000 gena, od čega su 93 gena specifična za ove ćelije i predstavljaju njihov “molekularni potpis”. Tokom diferencijacije dolazi do značajnog menjanja obrasca genske ekspresije (Bhattacharya i sar., 2005). Da bi se obezbedila zaštita oštećenja genoma tokom dugotrajnog kultivisanja, on se mora rutinski analizirati. Smatra se da su hromozomske aberacije koje se javljaju u embrionalnim matičnim ćelijama posledica adaptacije na dugotrajnu kultivaciju, koja dovodi do prekomerne ekspresije gena slične onoj koja se dešava prilikom pojave humanih karcinoma (Baker i sar., 2007).

Iako u kontrolisanim uslovima kultura, ove ćelije mogu neograničeno da rastu i umnožavaju se, poteškoće vezane za njihovo dobijanje i kultivisanje, postojanje rizika nekontrolisanog rasta i diferencijacije, i rizika da nakon transplantacija stvaraju kancerozno tkivo (teratome) *in vivo*, kao i pokrenute rasprave o etici takvih istraživanja i usvojena zakonska rešenja u mnogim zemljama su ograničila njihovo korišćenje. Rizici vezani za njihovu primenu takođe su ukazali da su intenzivna istraživanja i dalje neophodna da bi se ove ćelije uvele u kliničku praksu. Jedan od pravaca istraživanja koja bi mogla da doprinesu značajnom napretku u ovoj oblasti je i otkriće da se funkcionalno zrele ćelije organizma genetski mogu “reprogramirati” i dobiti osobine embrionalnih matičnih ćelija. Ove ćelije, nazvane indukovane pluripotentne matične ćelije (iPS), se dobijaju relativno jednostavnim postupcima uvođenja samo 4 gena „za matičnost“: Oct3/4, Sox2, c-Myc i Klf4 u zrele ćelije, n.pr fibroblaste, pri čemu se indukuje proces

dediferencijacije i ćelije praktično vraćaju u stanje „matičnosti“ (Takahashi i Yamanaka, 2006). Poslednjih godina, intenzivno se radi na usavršavanju tehnika dobijanja iPS ćelija, sa ciljem da se usavrši metodologija koja će biti bezopasna i netoksična za terapijsku primenu.

1.1.2. ADULTNE MATIČNE ĆELIJE

Iako pluripotentni potencijal embrionalnih matičnih ćelija daje najveće mogućnosti za njihovu potencijalnu primenu, pokrenute rasprave o etici takvih istraživanja, kao i usvojena zakonska rešenja u mnogim zemljama su ograničila njihovo korišćenje i usmerili su istraživanja ka pronalasku drugih izvora matičnih ćelija.

Adultne matične ćelije su specijalizovane matične ćelije nađene u mnogim tkivima odraslog organizma, u kojima imaju ulogu u održavanju tkivne homeostaze. One poseduju potencijal samoobnavljanja i diferentovanja u više ćelijskih tipova u okviru tkiva u kome se nalaze, izolovane su iz skoro svih tkiva odraslog organizma: kostna srž, jetra, mozak, srce, zubna pulpa, folikul dlake, koža, mišići, masno tkivo, krv, retina, kornea, epitel gastrointestinalnog trakta. Dugo se smatralo da adultne matične ćelije diferenciranjem mogu da daju samo specijalizovane ćelije tkiva iz koga potiču. Međutim, mnogobrojnim istraživanjima je utvrđeno da je njihova plastičnost mnogo veća, zbog čega su počele da pobuđuju sve veću pažnju stručne javnosti. Svojstvo plastičnosti je karakteristika matičnih ćelija da se, pod uticajem odgovarajuće stimulacije, ćelije mogu usmeriti da diferentuju u specijalizovane ćelije drugačije od tkiva iz koga potiču. Ovo otkriće je umnogome intenziviralo istraživanja usmerena ka potencijalnoj primeni adultnih matičnih ćelija u tkivnom inženjerstvu, ćelijskoj i genskoj terapiji.

Najviše izučavane adultne, tkivno-specifične matične ćelije se nalaze u kostnoj srži, tkivu mezodermalnog porekla, koje predstavlja funkcionalno jedinstvo kompleksnog hematopoetskog sistema ćelija sa sistemom stromalnih ćelija i ćelijskih produkata (molekuli ekstracelularnog matriksa i regulatorni faktori). U kostnoj srži opisana su

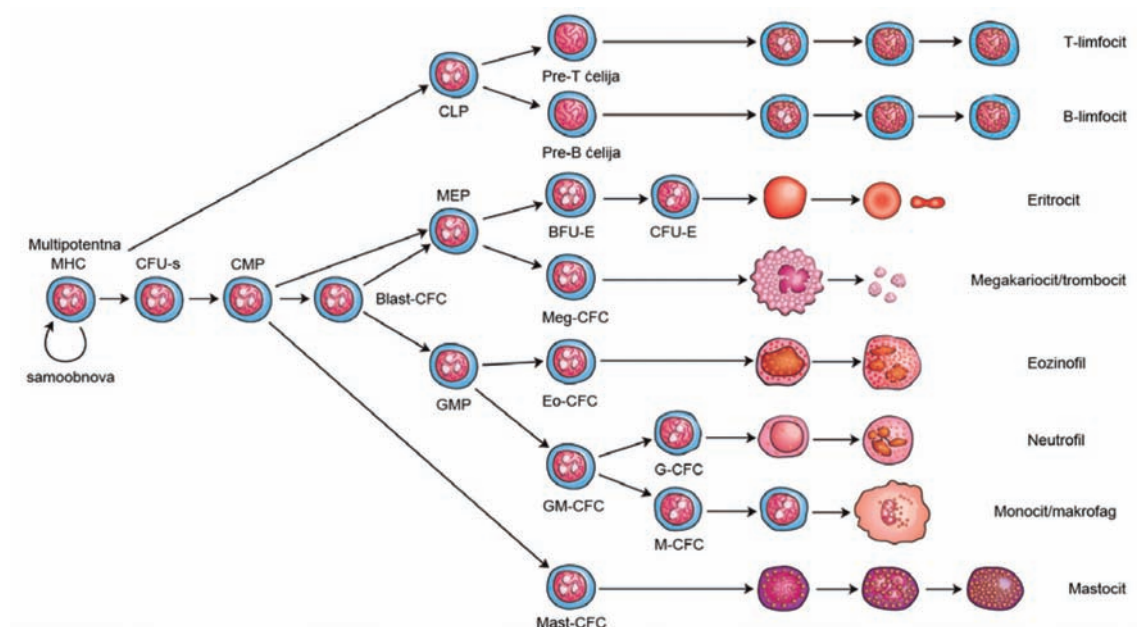
dva tipa multipotentnih matičnih ćelija, matične ćelije hematopoeze i mezenhimalne matične ćelije. Pored ovih matičnih ćelija opisani su i drugi tipovi matičnih ćelija, kao što su ćelije iz epitela gastrointestinalnog trakta i nervne matične ćelije, i pokazana je njihova multipotentnost. Matične ćelije hematopoeze su najbolje okarakterisane matične ćelije i o njihovoj biologiji, regulaciji i razvoju objavljen je veliki broj radova. Takođe, to su za sada jedine matične ćelije koje se rutinski primenjuju u kliničkoj praksi, jer su transplantacije matičnih ćelija hematopoeze standardne procedure lečenja određenih oblika hematoloških i drugih maligniteta (leukemije, limfomi, neuroblastom), određena hematološka oboljenja (aplastična anemija, talasemija, insuficijencija kostne srži) i neke bolesti imunskog sistema (urođene slabosti imunskog sistema i autoimunske bolesti).

1.1.2.1. MATIČNE ĆELIJE HEMATOPOEZE

Hematopoeza predstavlja proces stvaranja različitih tipova zrelih ćelija krvi, koji bez obzira na njihovu morfološku i funkcionalnu raznolikost i specijalizovanost vode poreklo od zajedničke multipotentne matične ćelije hematopoeze. Ograničen životni vek zrelih ćelija krvi zahteva stalno obnavljanje i održavanje konstantnog broja ovih ćelija, koje se odvija zahvaljujući sposobnosti samoobnove, proliferacije i diferencijacije multipotentnih matičnih ćelija hematopoeze (MČH) (Kraft i Weissman, 2005). Ovaj proces se odvija u kostnoj srži, koja obezbeđuje kompleksnu mikrosredinu hematopoeze, a brzina nastanka pojedinih zrelih ćelija krvi, u zavisnosti od potreba organizma, može biti regulisana u svim fazama.

Stvaranje zrelih i funkcionalno sposobnih ćelija krvi obuhvata kontinuirani proces proliferacije, diferencijacije i sazrevanja, u kome od malobrojne populacije primitivnih multipotentnih matičnih ćelija hematopoeze (1 MČH na 100 000 ćelija kostne srži) nastaje niz tranzitnih kategorija manje primitivnih, takođe multipotentnih ćelija, a potom nastaju ćelije opredeljene za više, dve ili samo jednu krvnu lozu (Slika 2). Od matičnih ćelija opredeljenih u pravcu razvoja pojedine loze diferentovanjem nastaju

morfološki prepoznatljive ćelije date loze iz kojih dalje nastaju zrele ćelije krvi. Stoga, u okviru hematopoetskog sistema se na osnovu različitog stepena zrelosti i diferencijacije razlikuju četiri ćelijska odeljka: a) primitivne multipotentne MČH; b) opredeljene MČH – hematopoetski prethodnici ili progenitori; c) ćelije prekursori; d) zrele ćelije krvi.



Slika 2. Opšta šema hematopoeze. Proliferacijom i diferenciranjem malobrojnih multipotentnih MČH zastupljenih u hematopoetskom tkivu, preko niza MČH različitog stepena opredeljenosti, stvaraju se funkcionalno različiti tipovi zrelih ćelija, uključujući neutrofile, monocyte/makrofage, eozinofile, eritrocite, trombocite, mastocite, B i T limfocite. (Modifikovano prema: Metcalf D. Concise Review: Hematopoetic Stem Cells and Tissue Stem Cells: Current Concepts and Unanswered questions. Stem Cells 25: 2390-2395, 2007.)

Multipotentne MČH imaju sposobnost samoobnavljanja, sposobnost diferencijacije u ćelije svih krvnih loza, veliki proliferacioni kapacitet i mogućnost da kompletno restitušu hematopoezu. Najveći deo populacije ovih ćelija ne proliferiše aktivno, već se samo 10-15% ovih ćelija nalazi u S fazi ćelijskog ciklusa (Milenković i sar., 1991), a ostatak se ne nalazi u stanju mirovanja već veoma usporenog ćelijskog ciklusa, u produženoj G1 fazi (Kiel i sar., 2007). Zbog malog broja multipotentnih MČH i

njihove morfološke neprepoznatljivosti, izučavanje mehanizama regulacije njihove samoobnove i diferencijacije je otežano, te je najveći deo saznanja o njima dobijen zahvaljujući razvoju većeg broja *in vitro* i *in vivo* metoda kojima se dokazuju osnovne funkcionalne karakteristike ovih ćelija, i čije je uvođenje predstavljalo prekretnicu u razvoju eksperimentalne i kliničke hematologije. Uspostavljanjem dugotrajnih kultura putem gajenja MČH na sloju stromalnih ćelija, obezbeđena je mikrosredina u kojoj MČH mogu da ispolje svoj kapacitet za samoobnovu, proliferaciju i diferencijaciju. U takvom sistemu tokom najmanje 5 nedelja kultivisanja iz multipotentnih MČH formiraju se kolonije opredeljenih MČH koje se potom dokazuju u sekundarnim kulturama. Razvijeni su i *in vitro* testovi u kojima se identifikacija MČH vrši pomoću formiranja prepoznatljivih kolonija na polučvrstim podlogama. Brojnim *in vitro* testovima potvrđena su i unapređena znanja o MČH dobijena u *in vivo* ispitivanjima.

Veliki napredak u karakterizaciji i izučavanju MČH postignut je zahvaljujući razvoju tehnologije izdvajanja ćelija ćelijskim sorterom (FACS) i fenotipskoj karakterizaciji MČH na osnovu prisustva ili odsustva određenih površinskih antigena. Primitivne MČH ne poseduju antigene ćelijske diferencijacije, tako da se one označavaju kao linijski negativne ćelije, dok opredeljene MČH, ćelije prekursori i zrele ćelije krvi, tokom diferencijacije stiču molekule označene kao antigeni ćelijske diferencijacije i zbog toga nose naziv linijski pozitivne ćelije. Kao ključni marker za izdvajanje MČH čoveka koje se upotrebljavaju za transplantaciju u terapijske i eksperimentalne svrhe, koristi se CD34. To je transmembranski protein za koji se pretpostavlja da učestvuje u međućelijskim kontaktima. Populacija CD34 pozitivnih ćelija je fenotipski i funkcionalno različita, obogaćena multipotentnim MČH, ali i opredeljenim MČH, dok se ekspresija ovog markera konačno gubi na ćelijama prekursorima pojedinih krvnih loza.

Za razliku od multipotentnih MČH, opredeljene MČH gube osobine multipotentnosti, uz zadržavanje ograničene sposobnosti samoobnove, koja se tokom daljeg sazrevanja gubi, a povećava se proliferativna aktivnost. To je takođe heterogena ćelijska populacija koja sadrži opredeljene matične ćelije različitog stepena zrelosti i diferencijacije.

Usmeravanjem matičnih ćelija u pravcu limfopoeze nastaje zajednička opredeljena matična ćelija limfopoeze (Slika 2) od koje nastaju ćelije imunskog sistema - dendritične ćelije, T i B limfociti i NK ćelije, dok usmeravanjem u pravcu mijelopoeze nastaje zajednička opredeljena matična ćelija mijelopoeze, od koje vode poreklo granulociti, eritrociti, monociti i trombociti. Procesima proliferacije, diferencijacije i sazrevanja zajedničke matične ćelije mijelopoeze, razvijaju se zrelije kategorije opredeljenih matičnih ćelija za granulocitno-monocitnu lozu i matične ćelije opredeljene za megakariocitno-eritrocitnu lozu, od kojih dalje nastaju zreliji prethodnici, a onda u daljem toku procesa hematopoeze i morfološki prepoznatljivi progenitori karakteristični za svaku lozu ćelija, od kojih nastaju i funkcionalno zrele ćelije.

Regulacijom procesa hematopoeze obezbeđuje se ravnoteža između procesa samoobnove MČH i njihove proliferacije i diferencijacije u zrelije oblike. I pored mnogobrojnih istraživanja još uvek nije utvrđeno da li dominantnu ulogu u regulaciji ovog procesa, imaju unutrašnji (genetski) faktori, ili spoljašnji - faktori mikrosredine, ali prema savremenom konceptu regulacije hematopoeze, sudbina MČH određena je kombinacijom ovih faktora. Danas je poznato da se u fiziološkim uslovima kontrola produkcije hematopoetskih ćelija ostvaruje lokalno u strogo definisanoj mikrosredini hematopoeze, koja podrazumeva funkcionalno jedinstvo stromalnih ćelija i ćelijskih produkata (molekuli ekstracelularnog matriksa i regulatorni faktori), koji čine kompleksni molekulski milje u kome se ostvaruju specifične interakcije hematopoetskih ćelija i komponenti mikrosredine (Bugarski i sar., 2003). Stromalne ćelije mikrosredine deluju na matične ćelije hematopoeze direktno međjućelijskim interakcijama, kao i produkcijom, deponovanjem ili koncentrovanjem čitavog niza lokalnih citokina i faktora rasta sa hematopoetskim efektima obezbeđujući na taj način gotovo sve činioce neophodne za proliferaciju i diferencijaciju matičnih ćelija hematopoeze. Komponente ekstracelularnog matriksa su uključene u ćelijsku adheziju, vezivanje i prezentaciju različitih citokina i regulaciju ćelijskog rasta, omogućavajući lokalizaciju hematopoetskih ćelija i u kombinaciji sa citokinima imaju presudnu ulogu u formiranju specifičnih niša

(Wilson i Trumpp, 2009). Regulatorni faktori hematopoetske mikrosredine su citokini koji regulišu preživljavanje, proliferaciju i diferencijaciju hematopoetskih ćelija i ćelijski adhezivni molekuli koji su odgovorni za lokalizaciju hematopoeze u kostnoj srži i za posredovanje u fizičkoj vezi između hematopoetskih ćelija i stromalnog tkiva mikrosredine (Bagby i Heinrich, 2000). Takođe i same hematopoetske ćelije učestvuju u regulaciji procesa hematopoeze produkujući citokine koji ispoljavaju autokrino/parakrine efekte (Janowska-Wieczorek i sar., 2001).

1.1.2.2. MEZENHIMALNE MATIČNE ĆELIJE

Krajem šezdesetih godina prošlog veka, Friedenstein sa saradnicima (Friedenstein i sar., 1968), je prvi pretpostavio postojanje multipotentnih prethodnika nehematopoetskih, stromalnih ćelija kostne srži na osnovu originalnog sistema kultivisanja CFU-F (colony-forming unit – fibroblastic) i ukazao na njihovu adherentnu, klonogenu, nefagocitnu i fibroblastnu prirodu. Osamdesetih godina Owen (Owen, 1985) opisuje i definiše “sistem stromalnih ćelija” koji čine ne samo stromalne ćelije kostne srži koje podržavaju hematopoezu, već i mezenhimalne matične ćelije i njihovo potomstvo - ćelije vezivnog tkiva (osteociti, hondrociti, tenociti, adipociti i ćelije glatkih mišića). Sistem je bio definisan na osnovu analogije sa hematopoetskim sistemom ćelija, gde i mezenhimalne matične ćelije prisutne unutar kostne srži poseduju sposobnost samoobnove i diferentovanja u različita vezivna tkiva, uključujući hrskavicu, kost, masno tkivo, fibrozno tkivo i stromu hematopoetske mikrosredine. Ovaj koncept i klonalnost stromalnih ćelija potvrđeni su kasnije u mnogobrojnim radovima koji su opisivali funkcionalne i fenotipske karakteristike ove heterogene ćelijske populacije i postojanje jedne mezenhimalne stem ćelije (Pittenger i sar., 1999). Naziv „mezenhimalne matične ćelije“ (MMĆ) prvi put je upotrebio Caplan 1991. godine, da opiše populaciju ćelija u adultnoj kostnoj srži koje se mogu izolovati, umnožiti u kulturi i stimulisati da se diferenciraju u ćelije tkiva mezodermalnog porekla (Caplan, 1991).

Prema saznanjima koja imamo danas, MMĆ ne nastanjuju samo tkiva mezenhinskog porekla, a njihov potencijal za diferencijaciju prevazilazi tkiva mezodermalnog porekla, jer se, između ostalih, mogu diferencirati i u neurone, ektodermalnog porekla, kao i u ćelije pankreasa, endodermalnog porekla. Stoga, pojam mezenhimalne, iako uveliko prihvaćen, ne odražava pravu prirodu MMĆ. Kako se ove ćelije mogu izolovati iz različitih vezivnih tkiva: tkiva pupčanika, placente, adipoznog tkiva, zubne pulpe, potpornog aparata zuba, periferne krvi, krvi pupčanika, u literaturi se mogu pronaći i drugi nazivi - mezenhimalne stromalne ćelije, multipotentne stromalne ćelije ili multipotentne mezenhimalne matične ćelije (Prockop, 1997). Iako ovi izrazi nisu pravi sinonimi u smislu definicije ili bioloških karakteristika ovih ćelija, oni svi označavaju istu kategoriju ćelija, koje se mogu izolovati i umnožiti *ex vivo* u određenim uslovima, pri čemu zadržavaju sposobnost diferentovanja u različita vezivna tkiva.

Postoje dokazi da su MMĆ do sada uspešno izolovane iz svakog tkiva iz koga je pokušana izolacija (Da Silva Meirelles i sar., 2006). Iako pokazuju velike sličnosti, među ovim ćelijama poreklom iz različitih tkiva postoje i značajne razlike, kako u potencijalu proliferacije pod identičnim uslovima kultivisanja (Kern i sar., 2006) tako i u funkcionalnim osobinama (Stenderup i sar., 2003). Imajući u vidu ove razlike, kao i dostupnost MMĆ iz različitih izvora, neophodno je definisati najbolji izvor ovih ćelija za buduću kliničku primenu. Do danas najviše ispitivane MMĆ vode poreklo iz kostne srži, pri čemu je aspiracija kostne srži izuzetno invazivna metoda, a dobija se samo mali broj MMĆ, oko 1-10 ćelija na 10 000 ćelija sa jedrom (Gronthos i sar., 2003).

Mogućnost njihove upotrebe u terapiji ograničava i smanjenje potencijala diferencijacije, sa povećanjem starosti pacijenta (Stenderup i sar., 2003). Alternativni izvor za autologe terapijske primene bi moglo biti masno tkivo, koje je lako pristupačno i može se dobiti u dovoljnim količinama. MMĆ iz adipoznog tkiva imaju ekvivalentan proliferacioni i diferencijacioni potencijal kao ćelije iz kostne srži (Mizuno, 2009). Krv pupčanika je takođe lako dostupan izvor MMĆ, pri čemu treba istaći da su one izuzetno retke (oko 4 MMĆ na 10 milijardi nukleiranih ćelija), a uspeh izolacije je manji od 30%

(Wagner i sar., 2005). Prethodnih godina je utvrđeno da je i tkivo pupčanika izuzetan izvor MMC, pri čemu ove ćelije mogu da poseduju i veći proliferacioni i diferencijacioni potencijal od MMC iz kostne srži (Magged i sar., 2007).

Usled korišćenja različitih metodologija za izolovanje i ekspanziju MMC iz različitih tkiva od strane različitih laboratorija, postavljalo se pitanje da li je moguće porediti dobijene ćelije i da li su njihove različite osobine posledica korišćenja tih različitih metodologija. Usled nepostojanja univerzalno prihvaćenih kriterijuma za definisanje MMC Komitet za mezenhimalne i tkivne matične ćelije Međunarodnog udruženja za ćelijsku terapiju (engl. The International Society for Cellular Therapy- ISCT) je propisao standarde za definisanje humanih MMC kako za laboratorijska istraživanja, tako i za istraživanja u prekliničkim studijama (Dominici i sar., 2006). Ovi kriterijumi obuhvataju: 1) adherentnost za plastičnu podlogu pri standardnim uslovima kultivisanja; 2) specifičnu ekspresiju površinskih antigena; 3) multipotentni potencijal diferencijacije. Cilj ovih standarda je da se naučnoj zajednici obezbedi, na osnovu najboljih dosadašnjih saznanja, mogućnost definisanja identiteta MMC, uz mogućnost menjanja i usavršavanja standarda praćenjem novih istraživanja u ovoj oblasti.

Osobina vezivanja za plastičnu podlogu je dobro poznata karakteristika MMC, dok ekspresija površinskih antigena omogućava i brzu identifikaciju određene ćelijske populacije. Za karakterizaciju MMC, ISCT je propisao pozitivnu ekspresiju CD105, CD73 i CD 90 markera, a u cilju dobijanja ćelijske populacije u kojoj nisu prisutne hematopoetske ćelije, potrebno je pokazati negativnu ekspresiju markera karakterističnih za hematopoetske ćelije: CD45, CD34, CD11b, CD19 i HLA-DR. Jedan od preduslova za početak upotrebe ovih ćelija u terapijske svrhe jeste predvidivost ponašanja nakon aplikacije, a to je moguće postići sa homogenom ćelijskom populacijom, okarakterisanom grupom funkcionalnih ili fenotipskih markera. Razvoj metode protočne citometrije i mogućnosti istovremene analize grupe različitih markera su znatno ubrzali identifikaciju matičnih ćelija za potencijalnu kliničku primenu. Međutim, iako je do danas analiziran veliki broj markera, još uvek ne postoji pojedinačni marker, kao ni grupa markera,

koji bi na siguran način razlikovali MMĆ od ostalih ćelija usled preklapanja njihove ekspresije, pa ISCT podstiče istraživače na ispitivanje što većeg broja markera i njihovih kombinacija u cilju bolje karakterizacije ćelijskih linija. Neka istraživanja su ukazala da se populacije MMĆ iz različitih tkiva mogu izdvojiti/prečistiti uz pomoć određenih markera, kao što je CD133 za ćelije iz krvi pupčanika (Tondreu i sar., 2005), ili SSEA-1 i SSEA-4 za MMĆ iz kostne srži (Gang i sar., 2007).

Biološka osobina koja na najsigurniji način karakteriše MMĆ jeste njihova sposobnost diferencijacije u pravcu tri mezenhimalne ćelijske linije, osteoblaste, hondroците i adipocite, tako da je ISCT to postavila kao treći standard za definisanje humanih MMĆ. Od devedesetih godina prošlog veka, kada je pokazana sposobnost diferencijacije MMĆ u ćelije mezodermalnih linija (Pittenger i sar., 1999), utvrđena je mogućnost njihove diferencijacije i u ćelije ektodermalnog i endodermalnog porekla. Posebnu pažnju pobuđuje diferencijacija MMĆ nakon njihovog naseljavanja u ciljna tkiva, kao i faktori koji kontrolišu ove procese. Dosadašnja saznanja ukazuju da mobilisane MMĆ pod dejstvom lokalnih faktora mogu diferencijovati u najmanje tri pravca: 1) u tkivno specifične ćelije, potrebne za regeneraciju oštećenog tkiva, kao kod infarkta miokarda, gde MMĆ mogu diferencijovati u kardiomiocite, glatko-mišićne ćelije i endotelne ćelije (Gojo i sar., 2003; Psaltis i sar., 2008); 2) u funkcionalne ćelije koje imaju ulogu u stvaranju specijalnog mikrokruženja neophodnog za obnovu tkiva (Petrie Aronin i Tuan, 2010); 3) u regulatorne ćelije koje učestvuju u obnovi i regeneraciji tkiva pomoću sekrecije citokina sa trofičkom i imunomodulatornom funkcijom (Ankrum i Karp, 2010). Okruženje i molekularni mehanizmi koji kontrolišu diferencijaciju MMĆ još uvek nisu razjašnjeni, kao ni specifični markeri pomoću kojih bi se mogla predvideti određena diferencijacija.

Prethodnih godina je pokazano da MMĆ poseduju antiinflamatorne i imunomodulatorne osobine. Nizak stepen ekspresije glavnog histokompatibilnog kompleksa-I, kao i nedostatak ekspresije glavnog histokompatibilnog kompleksa-II kod ovih ćelija, za posledicu imaju izostanak aktivacije alogernih ili ksenogenih

limfocita (Le Blanc i Rindgen, 2007). Takođe, pokazano je da MMC suprimiraju aktivaciju i proliferaciju T i B limfocita (Jones i sar., 2007), kao i da dovode do modulacije mikrosredine u oštećenom tkivu i štite ga oslobađanjem anti-inflamatornih i anti-apoptotičkih molekula (Le Blanc i Rindgen, 2007). Zahvaljujući ovim efektima ispitivana je i mogućnost korišćenja transplantacije MMC u terapiji oboljenja graft protiv domaćina (engl. Graft-Versus-Host-Disease GVHD), kao i nekoliko autoimunskih bolesti, uključujući dijabetes tipa 1 (Florina i sar., 2009), reumatoidni artritis (Bouffi i sar., 2009), sistemski lupus eritematosus (Zhang i sar., 2010) i multipla skleroza (Martino i sar., 2010).

MMC imaju osobinu da putem krvi migriraju do oštećenog i obolelog tkiva i tu ispolje terapijski efekat. Faktori koji dovode do ove migracije nisu još uvek poznati, ali se pretpostavlja da bi to mogli biti specifični receptori i ligandi sekretovani od strane oštećenog tkiva, koji ne samo da ubrzavaju transport, adheziju i infiltraciju MMC, već i obezbeđuju posebno mikrokruženje za samoobnavljanje i održanje multipotentnog potencijala diferencijacije MMC (Chapel i sar., 2003). Pokazano je i da ulogu u prolasku MMC kroz endotel krvnih sudova imaju integrini, selektini i hemokini (Brooke i sar., 2008), nakon čega dolazi do njihove direktne reakcije sa okolnim ćelijama i lučenja trofičkih molekula (Le Blanc i Rindgen, 2007).

Osobina MMC pomoću kojih utiču na tkivnu regeneraciju u velikoj meri je trofički efekat. Nakon naseljavanja u obolelo tkivo MMC počinju da luče brojne trofičke molekule kao što su glikoproteini ekstracelularnog matriksa, citokini i faktori rasta (Ankrum i Karp, 2010), a trofički efekat ispoljavaju i pomoću direktnog kontakta sa ćelijama tkiva u koje su se naselile, pri čemu tačan mehanizam pomoću koga se ovaj efekat ostvaruje nije potpuno razjašnjen (Plotnikov i sar., 2008). Na ovaj način dolazi do smanjenja inflamacije, apoptoze i fibroze oštećenih tkiva kao i do stimulisanja tkivne regeneracije. U akutnim fazama povreda, kada je diferencijacija MMC onemogućena, njihova uloga u regeneraciji tkiva se odvija uglavnom pomoću trofičkog efekta (van Poli i sar., 2008). Danas je ovaj efekat MMC pokazan u modelima različitih oboljenja, kao što su Parkinsonova bolest i infarkt miokarda.

1. 2. MATIČNE ĆELIJE DENTALNOG POREKLA

Izolacija MMĆ iz dentalnih tkiva opisana je prvi put 2000. godine, kada su izolovane matične ćelije iz pulpe stalnih zuba (dental pulp stem cells, DPSCs) (Gronthos i sar., 2000). Kasnije su opisane i matične ćelije izolovane iz pulpe mlečnih zuba (stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHED), matične ćelije iz periodontalne membrane (periodontal ligament stem cells, PDLSCs), matične ćelije iz apikalne papile (stem cells from apical papilla, SCAP) i progenitorske ćelije iz dentalnog folikula (dental follicle progenitor cells, DFPCs). Ove populacije adultnih ćelija ispoljavaju sve osobine mezenhimalnih matičnih ćelija, uključujući sposobnost samoobnove i multipotentni potencijal diferencijacije, što uz laku dostupnost tkiva i rutinskih procedura kojima se ćelije mogu dobiti, otvara nove mogućnosti za kliničku primenu u okviru regenerativne stomatologije i medicine. Međutim, pored sličnosti sa MMĆ, matične ćelije dentalnog porekla ispoljavaju i značajnu heterogenost, što može uticati i na funkcionalna svojstva ćelija. Zubna tkiva su specijalizovana tkiva i ne podležu stalnom remodelovanju, kao što je slučaj sa koštanim tkivom. Iz ovog razloga, matične ćelije poreklom iz zubnih tkiva, razlikuju se u svom potencijalu diferencijacije u odnosu na matične ćelije izolovane iz kostne srži. Takođe, dentalni mezenhim se naziva ektomezenhim zbog njegove rane interakcije sa neuralnim grebenom, što je dodatni razlog različitih osobina dentalnih matičnih ćelija u odnosu na matične ćelije iz kostne srži (Huang i sar., 2009).

1. 2. 1. MATIČNE ĆELIJE IZ PULPE STALNIH ZUBA

Pulpno-dentinski kompleks poseduje prirodni regenerativni potencijal koji kao odgovor na traumu, dovodi do formiranja reparativnog dentina. Povreda ili trauma koja dovodi do odumiranja postmitotičkih odontoblasta indukuje kaskadni kompleks nedovoljno razjašnjenih reakcija koje šalju signale u dubinu tkiva pulpe. To dovodi

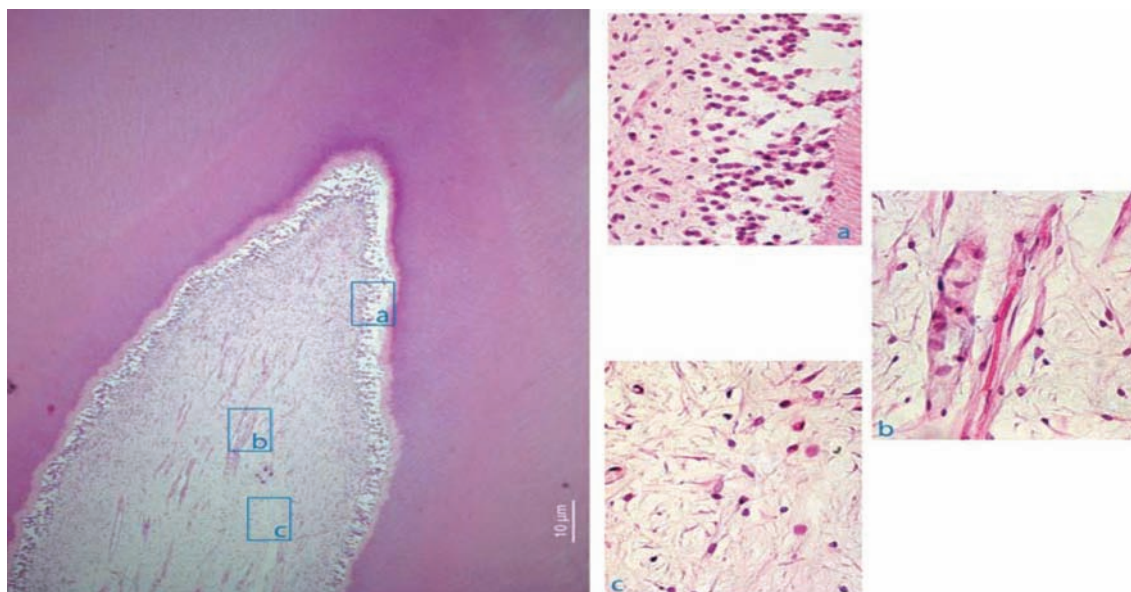
do izuzetne proliferativne aktivnosti u populacijama ćelija koje migriraju na mesto povrede i do stvaranja potpuno diferenciranih novih odontoblasta. Polazeći od ove činjenice Gronthos i sar. su pretpostavili da bi pulpa zuba okružena dentinom, mogla biti slična kostnoj srži koja je takođe okružena mineralizovanim, koštanim tkivom i postavili hipotezu da se u pulpi nalaze mezenhimalne matične ćelije od kojih nastaju novi odontoblasti (Gronthos i sar., 2000). Izolacija je izvršena enzimskim tretmanom pulpnog tkiva, pri čemu su dobijene ćelije okarakterisane kao CFU-F. Dobijene klonogene kolonije, su se razlikovale po gustini i morfologiji ćelija u okviru pojedinačnih kolonija, kao i u potencijalu proliferacije (Gronthos i sar., 2000; Huang i sar., 2009). Noviji eksperimenti su pokazali da prilikom zasejavanja na dentin, pojedine matične ćelije iz pulpe stalnih zuba diferentuju u ćelije slične odontoblastima, sa polarizovanim telom i produžecima koji prodiru u tubule dentina (Huang i sar., 2006a).

Pored sposobnosti diferencijacije u odontoblaste, matične ćelije iz pulpe stalnih zuba u *in vitro* uslovima mogu da diferentuju i u ćelije slične adipocitima i nervnim ćelijama i da eksprimiraju markere karakteristične za ove ćelije (Gronthos i sar., 2002), kao i da diferentuju u pravcu koštanog, hrskavičavog i mišićnog tkiva (Laino i sar., 2005; Zhang i sar., 2006; d'Aquino i sar., 2007).

Takođe je pokazano da prilikom transplantacije matičnih ćelija, izolovanih iz pulpe stalnih zuba i *in vitro* umnoženih na nosaču od hidroksiapatit/trikalcijum fosfata (HA/TCP), u imunokompromitovane miševе, dolazi do formiranja ektopičnog tkiva sličnog pulpno-dentinskom kompleksu (Gronthos i sar., 2000, Batouli i sar., 2003). Za subpopulacije heterogenih matičnih ćelija izolovanih iz pulpe stalnih zuba pokazano je i da mogu da formiraju vaskularizovano tkivo slično pulpi okruženo ćelijama sličnim odontoblastima koje stvaraju dentin sa dentinskim tubulima i eksprimiraju dentinsijalofosfoprotein (od engl. Dentin- Sialo- Phosphoprotein- DSPP). Eksperimenti *in vivo*, kada su matične ćelije izolovane iz pulpe stalnih zuba i kultivisane na dentinskom nosaču, transplantirane u imunokompromitovane miševе, pokazali su da dolazi i do deponovanja reparativnog dentina na površini nosača (Batouli i sar., 2003). Prilikom

transplantacije ovih ćelija u hipokampus miševa pokazano je da ove ćelije indukuju proliferaciju i diferencijaciju endogenih neuralnih ćelija (Huang i sar., 2008b).

Niše matičnih ćelija (stem cells niche) u pulpi zuba još uvek su predmet mnogih debata i istraživanja, ali je ukazano da u okviru mikrosredine pulpe zuba postoji nekoliko njihovih lokalizacija, u kojima se kao odgovor na traumu aktiviraju matične ćelije (Slika 3) (Sloan i Waddington., 2009). Niša bi se mogla okarakterisati kao specijalizovano mesto u okviru mikrosredine neophodno ćelijama za održanje njihove "matičnosti"- "stemness"-a (Schofield i sar., 1978). To je trodimenzionalna struktura koja sadrži elemente koji učestvuju u regulaciji proliferacije matičnih ćelija, kontrolišu sudbinu njihovih progenitora i štite ih od iscrpljivanja i smrti (Scadden i sar., 2006; Jones i Wagers, 2008). Iako su istraživanja u ovoj oblasti još na samom početku, do sada je utvrđeno da postoji više lokalizacija niša, i ukazano je da ćelije koje ih čine mogu da vode poreklo od neuralnog grebena, ali i da mogu imati mezenhimalno poreklo (Sloan i Waddington., 2009). Novija istraživanja ukazala su da su niše najvećim delom lokalizovane u perivaskularnim delovima pulpe, te da se jedan od načina za otkrivanje niša matičnih ćelija u pulpi sastoji u merenju povećanja ekspresije Notch molekula, koje se javlja kao posledica povrede pulpe. Notch je važan signalni molekul koji kontrolišu sudbinu matičnih ćelija za koji je pokazana povećana ekspresija nakon povređivanja pulpe u subodontoblastnoj zoni, zatim u dubljim delovima pulpe kao i u perivaskularnoj regiji, što govori o postojanju nekoliko oblasti bogatih matičnim ćelijama (Lovschal i sar., 2005).



Slika 3. Niše matičnih/progenitorskih ćelija u okviru pulpe zuba. a) niša u zoni bogatoj ćelijama-subodontoblastna zona; b) perivaskularna niša; c) Notch-2 pozitivne ćelije u centralnoj zoni pulpe. (Sloan AJ, Waddington RJ. Dental pulp stem cells: what, where, how? Int J Paediatr Dent. 2009 Jan;19(1):61-70.)

1. 2. 2. MATIČNE ĆELIJE IZ PULPE MLEČNIH ZUBA (MMZ)

MMZ su prvi put izolovane 2003. godine od strane Masako Miure i saradnika, koji su pokazali da se u pulpi mlečnih zuba nalazi izuzetan izvor adultnih matičnih ćelija za potencijalnu kliničku primenu. Prilikom izolacije, primenjena je ista metodologija kao i prilikom izolovanja matičnih ćelija iz pulpe stalnih zuba, uz korišćenje enzimske digestije pulpe pomoću kolagenaze i dispaze, pri čemu je dobijeno oko 12 do 20 ćelija iz svakog zuba, sposobnih da formiraju adherentne kolonije. Potencijal proliferacije MMZ je bio veći od onog utvrđenog za paralelno testirane MMĆ izolovane iz pulpe stalnih zuba i kostne srži.

U eksperimentima Miure i saradnika, *in vitro* umnožene MMZ, ekspimirale su rane mezenhimalne markere, CD146, kao i STRO-1 antigen (samo 9% ćelija). Takođe, pokazana je i ekspresija stromalnih i vaskularnih markera, alkalne fosfataze (engl.

Alkalyne Phosphatase-ALP), fibroblastnog faktora rasta (engl. Fibroblast Growth Factor- FGF), i endostatina. Prilikom *in vitro* kultivisanja u odgovarajućim medijumima MMZ su diferentovale u koštano, masno i hrskavičavo tkivo, potvrđujući karakteristično svojstvo MMĆ. Pokazana je i ekspresija DSPP, što je dokazalo i sposobnost MMZ da diferentuju u funkcionalne odontoblaste (Miura i sar., 2003).

MMZ imaju i mogućnost diferencijacije u pravcu nervnih ćelija. Nakon indukcije u odgovarajućem medijumu dolazi do ekspresije više markera nervnih ćelija, a MMZ gube morfologiju fibroblasta i razvijaju multicitoplazmatske nastavke (Morszeck i sar., 2009).

Nakon transplantacije u imunokompromitovanog miša MMZ se diferencijiraju u odontoblaste, ali za razliku od matičnih ćelija iz pulpe stalnih zuba ne dolazi do formiranja kompletnog pulpno-dentinskog kompleksa (Miura i sar., 2003). Još jedna razlika je u tome što MMZ indukuju ćelije domaćina na diferencijaciju u osteoblaste. Utvrđena je heterogenost prilikom poređenja različitih kolonija, koje su vodile poreklo od pojedinačnih ćelija. Nakon transplantacije ovih klonova, samo jedna četvrtina pokazuje potencijal formiranja dentina, dok svi indukuju ćelije domaćina da se diferenciraju u osteoblaste. Razlike postoje i u količini novoformiranog koštanog tkiva - 40% kolonija dovodi do stvaranja značajne, a 60% indukuje stvaranje samo ograničene količine koštanog tkiva (Miura i sar., 2003).

Za MMZ je takođe pokazano da se razlikuju u ekspresiji 4386 gena u poređenju sa matičnim ćelijama iz pulpe stalnih zuba pri čemu pokazuju viši stepen ekspresije gena koji učestvuju u regulaciji proliferacije ćelija, formiranja ekstracelularnog matriksa, sintezi nekoliko faktora rasta, kao što su FGF i bTGF (od engl. Transforming Growth Factor-beta- transformišući faktor rasta beta) (Nakamura i sar., 2009).

U dosadašnjim istraživanjima najveća pažnja je posvećena diferencijaciji MMZ u pravcu koštanog tkiva, pri čemu je utvrđeno da retinoična kiselina i deksametazon indukuju osteogenezu ovih ćelija (Chadipiralla i sar., 2010). U nekim od objavljenih radova pokazano je da se selekcijom ćelija sa pozitivnom ekspresijom STRO-1 i

CD34 markera dobija populacija ćelija sa izuzetnim potencijalom diferencijacije u pravcu koštanog tkiva, koja prilikom *in vitro* kultivisanja u odgovarajućem medijumu dovodi do stvaranja trodimenzionalnih koštanih ljuspica, a nakon transplantacije u imunokompromitovanog miša do formiranja lamelarne kosti sa prisutnim osteocitima (Laino i sar., 2006). Subpopulacija CD34 i CD117 pozitivnih MMZ takođe pokazuje povećanu diferencijaciju u osteoblaste, formiranje depozita kalcijuma kao i mineralizovane nodule *in vitro* (Shen i sar., 2010). Prvi korak ka kliničkoj upotrebi MMZ je ispitivanje njihove upotrebe u reparaciji koštanih defekata kritične veličine na imunodeficientnim miševima. Ćelije su transplantirane na nosačima od HA/TCP i došlo je do zarastanja defekata novostvoranom kosti (Seo i sar., 2008). Za razliku od ostalih MMĆ u ovakvim eksperimentima, MMZ nisu regrutovale hematopoetske elemente kostne srži domaćina koji obično uzimaju učešća u reparaciji kosti (Seo i sar., 2008). U prekliničkim studijama na modelu velikih životinja, MMZ izolovane iz mlečnih zuba mini svinja korišćene su za reparaciju mandibularnih defekata kritične veličine. S obzirom da je pokazano da ove ćelije dovode do uspešnog popunjavanja koštanih defekata, zaključeno je da predstavljaju optimalan izvor ćelija za potencijalnu kliničku primenu u reparaciji oštećenja orofacijalne regije (Zheng i sar., 2009).

1. 2. 3. MATIČNE ĆELIJE IZ PERIODONTALNE MEMBRANE

U periodontalnoj membrani nalaze se mnogobrojni tipovi ćelija koje se mogu diferencirati u cementoblaste i osteoblaste. Enzimskim tretmanom ovog tkiva pokazano je i prisustvo prekursorskih, klonogenih ćelija sa osobinom održavanja tkivne homeostaze i karakteristikama MMĆ (Seo i sar., 2004).

Prilikom *in vitro* karakterizacije, matične ćelije izolovane iz periodontalne membrane su ispoljavale markere karakteristične za MMĆ, STRO-1, CD45, CD90, CD105, CD166, kao i ekspresiju skleraksisa, transkripcionog faktora specifičnog za tetive (Seo i sar., 2004). Stepenn njegove ekspresije je znatno viši nego kod matičnih ćelija iz pulpe zuba.

Čitav niz markera, uključujući alkalnu fosfatazu, MEPE, koštani sijaloprotein (engl. Bone Sialoprotein- BSP), osteokalcin (OCN) i TGF β karakterističnih za cementoblaste i osteoblaste je dokazan kod ovih ćelija (Seo i sar., 2004). Pod definisanim uslovima kultivisanja ove ćelije su diferentovale u pravcu koštanog, hrskavičavog i masnog tkiva (Xu i sar., 2009).

Nakon transplantacije u imunokompromitovane miševe, dolazi do formiranja kompleksa cement-periodontalna membrana, što je značajna razlika u odnosu na ćelije iz pulpe (Wang i sar., 2011). Tkivo koje nastaje iz matičnih ćelija iz periodoncijuma je kolagen tip I pozitivno, a kolagena vlakna se vezuju za cementoblaste imitirajući pripoj Šarpejevih vlakana. Smatra se da u okviru matičnih ćelija iz periodoncijuma postoje subpopulacije ćelija koje mogu stvarati cementoblaste i cementocite, kao i ćelije koje formiraju kolagen. Nakon transplantacije humanih matičnih ćelija iz periodoncijuma u miševe sa periodontalnim defektima, dolazi do formiranja periodontalne membrane, a utvrđena je i njihova uloga u formiranju okolne kosti (Seo i sar., 2004).

1. 2. 4. MATIČNE ĆELIJE IZ APIKALNE PAPILE

Apikalna papila predstavlja meko tkivo na apeksu stalnih zuba u razvoju (Sonoyama i sar., 2006, 2008), a između nje i pulpe se nalazi zona bogata ćelijama (Rubio i sar., 2005). Pokazano je da u *in vitro* uslovima matične ćelije izolovane iz apikalne papile podležu odontogenoj i adipogenoj diferencijaciji (Sonoyama i sar., 2006; Abe i sar., 2007). Ono što je posebno interesantno je da su ove ćelije, i bez specifične neurogene stimulacije (Abe i sar., 2007), kao i nakon specifičnog usmeravanja eksprimirale nekoliko neuralnih markera: β III tubulin, GAD, NeuN, nestin, GFAP, neurofilament M (Sonoyama i sar., 2008).

Razlika između apikalne papile i pulpe zuba je u tome što je papila prekurzorsko tkivo radikularne pulpe. Iz ove činjenice se može izvući zaključak da su matične ćelije iz apikalne papile slične matičnim ćelijama iz kojih nastaju odontoblasti odgovorni za

nastanak korenskog dentina. U ovom momentu nije razjašnjeno da li se po prelasku papile u radikularnu pulpu, matične ćelije iz apikalne papile nastanjuju u pulpi stalnih zuba, ili su to dve različite i odvojene populacije matičnih ćelija. Prilikom njihovog poređenja *in vitro* pokazane su razlike u ekspresiji osteo/dentinogenih markera pri čemu su MMC iz apikalne papile u manjem procentu ekspimirale DSPP, MEPE, TGFβRII, FGFR3, Flt-1, Flg i MUC18 u odnosu na MMC iz pulpe stalnih zuba (Sonoyama i sar., 2008).

Prilikom transplantacije ovih ćelija na HA/TCP nosaču u imunokompromitovane miševe, dolazi do formiranja karakterističnog pulpno-dentinskog kompleksa (Sonoyama i sar., 2008).

S obzirom na dobro poznatu ulogu apikalne papile u formiranju korena zuba, moglo bi se zaključiti da matične ćelije iz apikalne papile predstavljaju izvor primarnih odontoblasta odgovornih za formiranje korenskog dentina, dok su matične ćelije iz pulpe stalnih zuba izvor odontoblasta koji formiraju reparativni dentin (Sonoyama i sar., 2008).

1. 2. 5. PREKURSORSKE ĆELIJE IZ DENTALNOG FOLIKULA

Dentalni folikul je ektomezenhimalno tkivo koje okružuje zametak zuba prilikom nicanja. Ovo tkivo sadrži prekursorske ćelije koje formiraju cement, periodontalnu membranu i alveolarnu kost, a izolovane su iz folikula impaktiranih umnjaka (Morsceck i sar., 2010; Kemoun i sar., 2007; Yao i sar., 2008). Prilikom enzimske digestije folikula, ove ćelije daju mali broj klonogenih kolonija koje adheriraju za plastičnu podlogu (Morsceck i sar., 2005).

MMC u folikulu pokazuju ekspresiju površinskih markera karakterističnih za nediferencirane ćelije, kao što su Notch-I, Nestin i STRO-1 (Morsceck i sar., 2010; Kemoun i sar., 2007; Yao i sar., 2008). Samo mali broj ćelija adherira za plastičnu podlogu i daje CFU-F, ispoljavajući ekspresiju kolagena tipa I, BSP, osteokalcina i

receptora FGF - FGFR (Morsczeck i sar., 2005). Prilikom *in vitro* karakterizacije, ove ćelije pokazuju sposobnost diferencijacije u pravcu koštanog tkiva, a posle 5 nedelja stimulacije deksametazonom dolazi do formiranja strukture slične membranskom tkivu (Kemoun i sar., 2007). *In vivo*, prekursorske ćelije iz dentalnog folikula ispoljavaju ekspresiju STRO-1 i BMP (od engl. Bone Morphogenetic Protein – morfogenetski koštani protein), kao i ekspresiju dva putativna markera cementoblasta (Kemoun i sar., 2007).

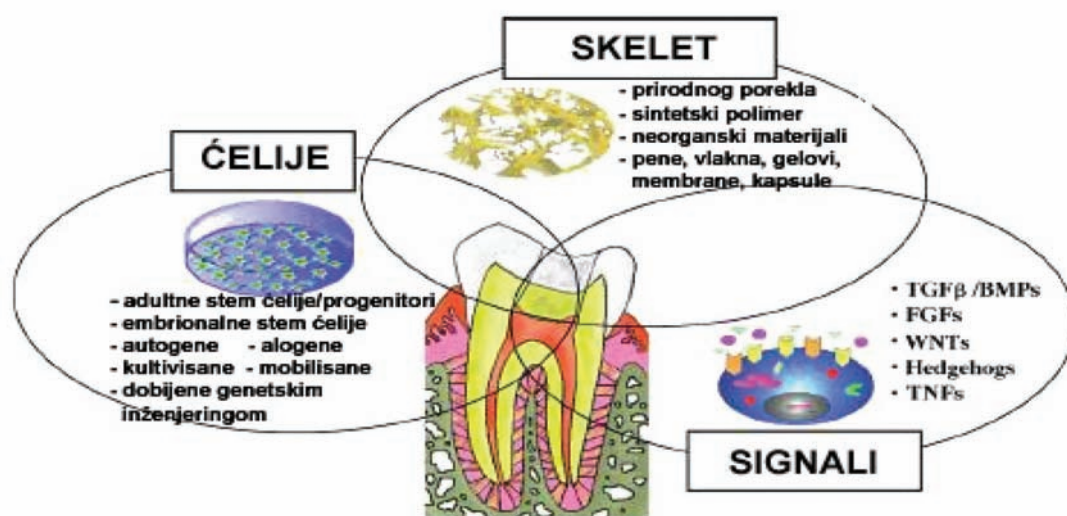
Nakon transplantacije prekursorskih ćelija iz dentalnog folikula u imunokompromitovanog miša, dolazi do formiranja tvrdog i fibroznog tkiva (Morsczeck i sar., 2010). Ovi transplantati pokazuju ekspresiju humano specifičnih transkripta za humani BSP, OCN i kolagena tipa I. U transplantima nije primećeno formiranje dentina, cementa ili kosti. Autori su to objasnili malim brojem ćelija u originalnim kulturama (Morsczeck i sar., 2010).

1.3. MATIČNE ĆELIJE I TERAPIJA

U poređenju sa embrionalnim matičnim ćelijama MMC imaju nekoliko prednosti, kao što su nedostatak etičkih i zakonskih prepreka, laka dostupnost i niska imunogenost. Takođe, one u *in vitro* uslovima imaju visok kapacitet proliferacije uz zadržavanje nediferenciranog stanja (Meireles Lda i sar., 2008). Ove osobine čine MMC idealnim ćelijskim kandidatima za upotrebu u tkivnom inženjerstvu, regenerativnoj medicini i personalizovanom terapijskom pristupu mnogih oboljenja. U protekloj deceniji je publikovan veliki broj studija o upotrebi MMC u terapijske svrhe, pri čemu je utvrđeno da se njihov efekat ne oslanja samo na sposobnost diferencijacije, već i na osobini da menjaju lokalno okruženje, aktiviraju endogene progenitorske ćelije i sekretuju različite faktore sa pozitivnim terapijskim dejstvom.

1.3.1. MATIČNE ČELIJE U TKIVNOM INŽENJERSTVU

U početku se tkivno inženjerstvo zasnivalo na zasejavanju tkivno specifičnih ćelija na prirodne ili sintetisane nosače, dok se vođena regeneracija tkiva (engl. guided tissue regeneration) bazirala na upotrebi nosača i bioaktivnih faktora u cilju aktiviranja lokalnih ćelija za reparaciju tkiva. Savremeni pristup tkivnog inženjerstva je kombinacija ova dva koncepta, uz korišćenje mnogobrojnih materijala, bioaktivnih molekula, tehničkih metoda, pri čemu je najveći napredak napravljen uvođenjem matičnih ćelija (Slika 4) (Robey i Bianco, 2006). Sve veći broj dostupnih izvora ovih ćelija kao i razvoj metoda za ex vivo sintezu tkiva i organa, dovodi do revolucionarnih promena u terapiji mnogih oboljenja, pri čemu razumevanje biologije matičnih ćelija zauzima centralno mesto. Poseban značaj predstavlja napredak u inženjerstvu tkiva koja imaju malu sposobnost samoobnove, kao što je nervno ili zubno.



Slika 4. Elementi u tkivnom inženjerstvu dentina: matične ćelije, ćelijski nosači i signalni molekuli. (Modifikovano iz: Nakashima M. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. Cytokine & Growth Factor Reviews. 2005 16:369–376.)

Danas su matične ćelije izolovane iz skoro svakog organa adultnog organizma. Međusobno se razlikuju po dostupnosti, broju, plastičnosti, mogućnosti ekspanzije i potencijala za kliničku primenu. Postoje tri pristupa u upotrebi matičnih ćelija za regeneraciju tkiva:

1. izolacija ovih ćelija, *ex vivo* ekspanzija i transplantacija;
2. *in vitro* sinteza tkiva ili organa pre transplantacije;
3. dizajn supstanci i/ili uređaja za *in vivo* aktiviranje lokalnih ili udaljenih matičnih ćelija domaćina.

U prvom pristupu, ćelije se pre transplantacije umnožavaju *in vitro*, a zatim aplikuju samostalno ili u kombinaciji sa pogodnim nosačima (Bianco i Robey, 2006). Osnovni preduslov ove metode je optimiziranje uslova kultivisanja, kao i održavanje željenog procenta ovih ćelija u okviru celokupne ćelijske populacije, a sama priroda tkiva koje se rekonstruiše, prvenstveno mogućnost samoobnove, određuje i uspeh terapije (Preston i sar., 2003).

Način aplikovanja ovih ćelija je predmet mnogobrojnih istraživanja. Mnogi tipovi matičnih ćelija imaju osobinu da se nakon infuzije u cirkulaciju, nasele u obolelo ili povređeno tkivo i učestvuju u njegovoj regeneraciji (Chamberlain i sar., 2007; Chapel i sar., 2003). U slučajevima rekonstrukcije trodimenzionalnih struktura, kao što su tkivo jetre i pankreasa, radi se na pronalaženju načina za lokalnu aplikaciju ćelija u kombinaciji sa određenim nosačima.

Oblast koja izuzetno brzo napreduje je *ex vivo* sinteza tkiva i organa pre transplantacije. Ćelije se zasejavaju na ćelijske nosače, a ceo proces se odvija u bioreaktorima. Ćelijski nosači mogu biti prirodni i sintetički, moraju biti biokompatibilni, bioresorptivni, neimunogeni, a uloga im je da omoguće adekvatno zasejavanje ćelija, njihovu ekspanziju, migraciju i diferencijaciju (Hutmacher i sar., 2007). Najčešće se izrađuju od prečišćenih proteina ekstracelularnog matriksa (ECM), kao što su kolagen, fibronektin, a mogu biti i od devitalizovanog ECM, kao što je submukoza tankog creva, mokraćna bešika i sl, a sve više se upotrebljavaju i sintetički materijal (Bugarski i sar.,

2005). Ovi nosači moraju davati signale za sintezu tkiva i organa, kao i za obnavljanje niša matičnih ćelija, zbog čega često sadrže i faktore rasta. Bioreaktori predstavljaju aparate u kojima se obavlja sinteza tkiva na nosačima i imaju ulogu da omoguće najpogodnije uslove sredine za taj razvoj. U zavisnosti od složenosti novostvorenih tkiva, bioreaktori mogu biti jednostavni, kao što su perfuzioni, koji služe za sintezu malog broja ćelijskih slojeva, do izuzetno složenih u kojima se stvaraju trodimenzionalna tkiva i organi (Freed i Vunjak-Novaković, 2000). Oni pored dotoka nutrijenata imaju i funkciju da omoguće preživljavanje ćelija u uslovima stvaranja sistema koji imaju značajnu masu, pri čemu je najvažnije pitanje što bržeg uspostavljanja adekvatne vaskularizacije. Ovo se postiže ili dodavanjem angiogenih faktora, ili korišćenjem ćelija koje dovode do stvaranja krvnih sudova.

Većina tkiva u organizmu poseduje izvestan stepen potencijala regeneracije, međutim on uglavnom nije dovoljan za potpunu rekonstrukciju tkiva. Pronalaženje načina na koji bi se mogle stimulisati lokalne ili udaljene matične ćelije da pospeše taj proces, predstavlja jednu od najinspirativnijih oblasti tkivnog inženjerstva. Ovo bi moglo biti ostvareno na nekoliko načina, kao što su transdiferencijacija i reprogramiranje, ili aplikovanjem faktora rasta na adekvatnim nosačima, u cilju aktivacije matičnih ćelija. Izučavanje biologije tih ćelija i faktora koji ih indukuju, od ključne je važnosti za uspešnu kliničku primenu ovih tehnika (Bianco i Robey, 2001).

Dosadašnji pokušaji aktivacije lokalnih ćelija, pokazali su se neuspešni uglavnom zbog kratkog polživota faktora rasta, kao i zbog nedostatka adekvatnih nosača. Prilikom pokušaja rekonstrukcije velikih defekata, dolazilo je do iscrpljivanja kapaciteta matičnih ćelija, zbog čega je obnavljanje niša od vitalnog značaja. Reakcije koje se dešavaju u tkivu nakon traume, kao što je slučaj kod povreda kičmene moždine, deluju inhibitory na proces aktivacije matičnih ćelija, pa je zbog toga izuzetno važno obratiti pažnju i na taj aspekt (Sakai i sar., 2012).

Upotreba citokina je postala uobičajena procedura u mobilisanju hematopoetskih ćelija kostne srži u perifernu krv, pri čemu nije trenutno poznato da li se i drugi tipovi

matičnih ćelija mogu na taj način aktivirati, što bi se moglo iskoristiti u terapijskim procedurama (Case i sar., 1997).

1.3.2. MATIČNE ĆELIJE U REGENERACIJI TKIVA I KLINIČKE STUDIJE

U protekloj deceniji objavljeno je više predkliničkih i kliničkih studija koje su uključivale MMC za terapiju različitih oboljenja. Ova istraživanja su pobudila veliko interesovanje i nadu za rešavanje brojnih indikacija koje su do sada bile nerešive.

U terapiji oboljenja srca MMC mogu ispoljiti pozitivne efekte u nekoliko segmenata kao što su smanjenje veličine polja infarkta i ožiljnog tkiva, obnova snage srčane radnje, povećanje gustine kapilarne mreže koja ishranjuje srčani mišić, kao i poboljšanje kompletne funkcije komora srca (Psaltis i sar., 2008), a postoje dokazi da MMC mogu imati terapijske efekte na modelima srčanih aritmija i dilatacije srca (Chin i sar., 2010). Terapijska funkcija MMC se ostvaruje pomoću: 1) direktne diferencijacije MMC u kardiomiocite, ćelije glatkih mišića i endotelne ćelije (Gojo i sar., 2003); 2) sekrecije različitih faktora rasta i citokina od strane MMC koji ispoljavaju trofički efekat (Caplan i Dennis, 2006); 3) smanjenja inflamacije na mestu infarkta pomoću imunosupresivne funkcije MMC (Du i sar., 2008); 4) stimulacije endogenog oporavka (Paul i sar., 2009). Do terapijske primene MMC u terapiji srčanih oboljenja biće potrebno odgovoriti na mnoga nerešena pitanja, kao što su njihova diferencijacija u kardiomiocite *in vivo* koja nije u potpunosti razjašnjena i rastumačiti mehanizme koji kontrolišu naseljavanje MMC u polje infarkta miokarda. Kako se u patološkom tkivu zahvaćenom infarktoma dešavaju zapaljenske reakcije, ishemija i fibroza koji narušavaju preživljavanje ćelija, potrebno je optimizovati protokole transplantacije MMC u cilju prevencije njihove apoptoze i omogućavanja optimalnog terapijskog efekta. Takođe, nepoznanicu predstavlja i dugotrajna efikasnost i bezbednost transplantacije MMC pa su studije sa praćenjem funkcionalnih, histoloških i drugih parametara neophodne u cilju bezbedne terapijske primene MMC kod srčanih oboljenja.

Velika su i očekivanja od MMC u terapiji dijabetesa. Nedavna istraživanja na modelima šećerne bolesti su to potvrdila, pri čemu je pokazano da MMC iz kostne srži nakon intravenske aplikacije naseljavaju pankreas i smanjuju nivo šećera u krvi (Ezquer i sar., 2008). Slični rezultati su dobijeni i upotrebom MMC iz krvi i tkiva pupčanika (Chao i sar., 2008), kao i iz pulpe zuba (Govindasamy i sar., 2011). Tačni mehanizmi još uvek nisu razjašnjeni, a smatra se da do smanjenja nivoa šećera dolazi zbog stvaranja novih beta ćelija, sekrecije molekula sa trofičkim efektom koji deluju na lokalne prekursorske ćelije u cilju diferencijacije u nove beta ćelije kao i direktne diferencijacije transplantiranih MMC u beta ćelije (Xie i sar., 2009).

Smatra se da će MMC imati ključnu ulogu u budućim terapijama oboljenja centralnog i perifernog nervnog sistema, kao što su povrede kičmene moždine (Himes i sar., 2006), moždanog udara i Parkinsonove bolesti (Park i sar., 2008), autoimunog encefalomijelitisa (Zhang i sar., 2006), amiotrofičke lateralne skleroze (Choi i sar., 2010), multiple sistemske atrofije (Lee i Park, 2009). Neuroprotektivni efekti MMC se sprovode pomoću najmanje dva mehanizma: produkcijom različitih trofičkih faktora koji doprinose oporavku neurobiheviornalnih funkcija i dovode do endogene stimulacije (Wakabayashi i sar., 2010) i naseljavanjem u nervno tkivo i ispoljavanjem imunoregulatornih funkcija koje dovode do smanjenja apoptoze i poboljšanja neuralnih funkcija.

U poređenju sa drugim oboljenjima, upotreba MMC u terapiji oboljenja jetre je mnogo manje ispitivana. Dosadašnja istraživanja su pokazala da MMC poseduju potencijal za eventualnu primenu u ovoj oblasti, jer je u predkliničkim studijama došlo do njihove diferencijacije u hepatocyte *in vivo* (Chamberlain i sar., 2007), kao i do smanjenja fibroze jetre pomoću sekrecije molekula koji sprečavaju ove procese (Wang i sar., 2009).

Prethodne, predkliničke, studije su pokazale da transplantacija MMC dovodi do povećanja angiogeneze kombinovane sa povećanim protokom krvi i kapilarnom gustinom u ishemičnim ekstremitetima (Al-Khalidi i sar., 2003; Xu i sar., 2010), stoga su započete i kliničke studije u cilju reparacije krvnih sudova. Angiogeni potencijal se

ostvaruje pomoću nekoliko mehanizama: 1) diferencijacijom MMC u endotelne ćelije, koje dovode do stvaranja novih krvnih sudova; 2) oslobađanjem angiogenih faktora koji podstiču lokalne progenitorske ćelije na umnožavanje; 3) parakrinim dejstvom na lokalne vaskularne ćelije. Dosadašnje kliničke studije su pokazale izuzetne rezultate, pri čemu je nakon autologne transplantacije MMC iz kostne srži došlo do poboljšanja perfuzije nogu kod 80% posto pacijenata i na taj način sprečena amputacija (Amann i sar., 2009; Prochazka i sar., 2009).

Dosadašnje studije su pokazale da se u budućnosti može očekivati napredak u terapiji reumatoloških oboljenja uz pomoć MMC. Kod reumatoidnog artritisa ove ćelije dovode do supresije proliferacije i aktivacije T-ćelija i proinflamatornih citokina, a do povećanja sekrecije interleukina koji imaju pozitivan terapijski efekat (Chen i Tuan, 2008). Osteoartritis zahvata uglavnom hrskavicu i kost, dovodeći do progresivnih i velikih oštećenja ovih tkiva. Mogućnost hondrogene diferencijacije, kao i antiinflamatorni potencijal koji poseduju, čine MMC mogućom terapijom izbora ovog oboljenja. Različiti su pristupi i tehnike primene ovih ćelija, pri čemu jedan pristup ispituje sintezu zgloba upotrebom odgovarajućih ćelijskih nosača i matičnih ćelija u biorektoru (Chen i Tuan, 2008), a drugi način predstavlja direktnu aplikaciju MMC u oštećene zglobove. Problem predstavlja nedovoljno naseljavanje lokalno ili sistemski aplikovanih MMC u cilju terapije ili prevencije artritisa (North i sar., 2008), a trenutne studije pokazuju da se efekat ovih ćelija zasniva na njihovom trofičkom, antiinflamatornom i imunosupresivnom delovanju. Pored reumatoidnog i osteoartritisa ispituju se i mogućnosti primene MMC u različitim koštano-zglobnim defektima, pri čemu se ove ćelije u okruženju domaćina diferenciraju u hondrocite i osteoblaste i stvaraju hrskavičavi ekstracelularni matriks i na taj način ostvaruju terapijski efekat (Jorgensen i sar., 2004).

Nedavno su MMC upotrebljene u regeneraciji kože i zarastanju rana uz ubrzanu epitelizaciju, angiogenezu i zatvaranje kožnih defekta (Wu i sar., 2007), a transplantacijom MMC je uspešno izvršena i regeneracija znojnih žlezda (Sheng i sar., 2009).

Velika očekivanja su u terapiji oboljenja graft-protiv-domaćina i od prve primene u

ovoj oblasti (Le Blanc i sar., 2004) urađen je veliki broj studija, sa različitim rezultatima. Zbog toga je potrebno detaljno odrediti parametre za transplantaciju, kao što su vreme, doza i frekvencija.

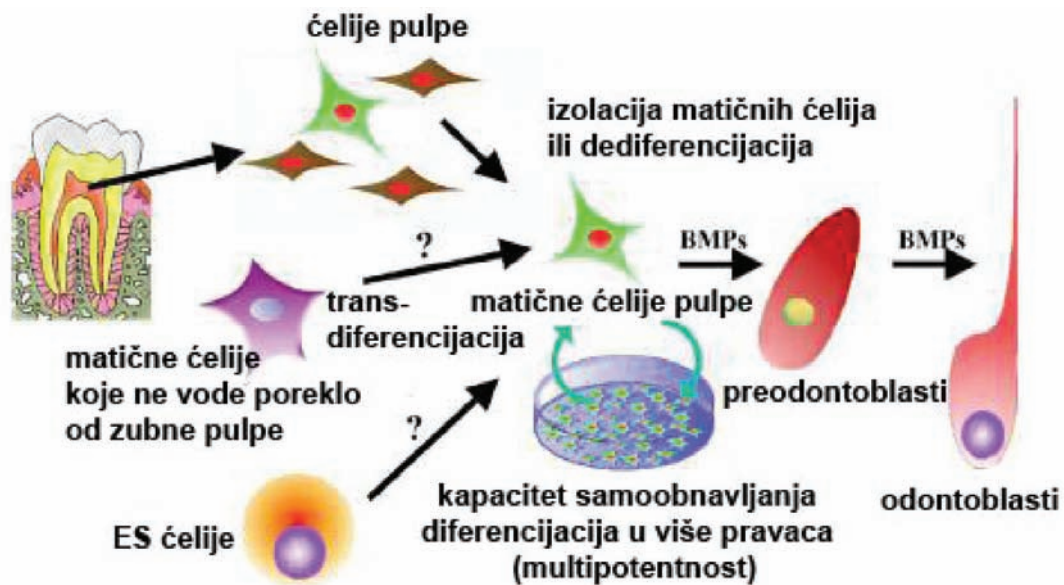
Kao zaključak se može reći da je u proteklih tri decenije došlo do izuzetnog napretka u istraživanjima MMĆ u vezi sa njihovom potencijalnom kliničkom primenom. Iako su širom sveta u toku kliničke studije na različitim nivoima i različitog obima, neophodno je istaći da rutinska primena ovih ćelija još uvek nije moguća zbog niza nepoznanica koje treba rešiti. Jedno od pitanja jeste koji je osnovni mehanizam pomoću koga MMĆ obavljaju svoje funkcije, da li je to njihova diferencijacija, trofički efekat ili anti-inflamatorni i imunomodulatorni mehanizam? Koliko je vreme preživljavanja MMĆ *in vivo*? Koje su optimalne doze za različita oboljenja, koji je najadekvatniji način aplikacije, u kojoj fazi povrede ili oboljenja? Pitanje koje treba rešiti jeste i funkcionalna zavisnost od fenotipskih karakteristika, kao i određivanje uloge pojedinih markera u diferencijaciji, trofičkom efektu i naseljavanju MMĆ. Primećeno je različito ponašanje istih MMĆ u *in vitro* i *in vivo* uslovima, a mehanizmi koji kontrolišu ove fenotipske preobražaje još uvek nisu poznati. Nedostatak velikih kliničkih studija, izvedenih po strogo propisanim standardima i uslovima, onemogućava poređenje rezultata, tako da je potrebno stvoriti uslove, kako zakonske, tako i praktične, kako bi se što pre izvršio prenos dosadašnjih i budućih saznanja u bezbednu i delotvornu kliničku praksu. Iako je potrebno uložiti još mnogo napora, sa sigurnošću se može reći da će terapije bazirane na MMĆ dovesti do smanjenja mortaliteta i poboljšati kvalitet života pacijenata obolelih od mnogih teških oboljenja.

1.4. MATIČNE ĆELIJE DENTALNOG POREKLA I TERAPIJA

Pronalaženje optimalnog izvora matičnih ćelija je jedan od osnovnih ciljeva tkivnog inženjerstva i regenerativne medicine. To podrazumeva da su ćelije lako dostupne, da se lako izoluju i karakterišu, da ih ima u dovoljnom broju ili da se u laboratoriji brzo

umnožavaju, da imaju široki potencijal diferencijacije i da tokom vremena u kulturi zadržavaju svoje osobine i normalan kariotip. Slobodno se može reći da su matične ćelije iz pulpe, posebno mlečnih zuba trenutno jedan od najoptimalnijih izvora MMC sa svim potrebnim karakteristikama. Istraživanja ka potencijalnoj kliničkoj upotrebi ovih ćelija imaju dva pravca: 1) upotreba u tkivnom inženjerstvu dentalnih tkiva i regenerativnoj stomatologiji; 2) zbog veoma širokog potencijala diferencijacije ispituju se mogućnosti za upotrebu ovih ćelija u regenerativnoj medicini i terapiji oboljenja različitih tkiva i organa.

Uspeh u regeneraciji i tkivnom inženjerstvu pojedinih tkiva izuzetno zavisi od mogućnosti i potencijala samoobnove datih tkiva. Zub, posmatran kao celovit organ, kao i njegovi sastavni delovi, spada u tkiva sa malim stepenom samoobnove, tako da tkivno inženjerstvo dentalnih tkiva podrazumeva kompleksne procedure. Sadašnji terapijski postupci u endodontskom tretmanu pulpe zuba su izuzetno radikalni i u najvećem broju slučajeva podrazumevaju kompletno uklanjanje ovog tkiva, dok nadoknada oštećenih tvrdih zubnih struktura podrazumeva upotrebu veštačkih materijala. Parodontopatija, kao jedno od najčešćih oboljenja savremenog čoveka, predstavlja najčešći uzrok gubitka svih zuba, a kao jedina terapija bezubosti trenutno predstavlja korišćenje različitih veštačkih materijala.



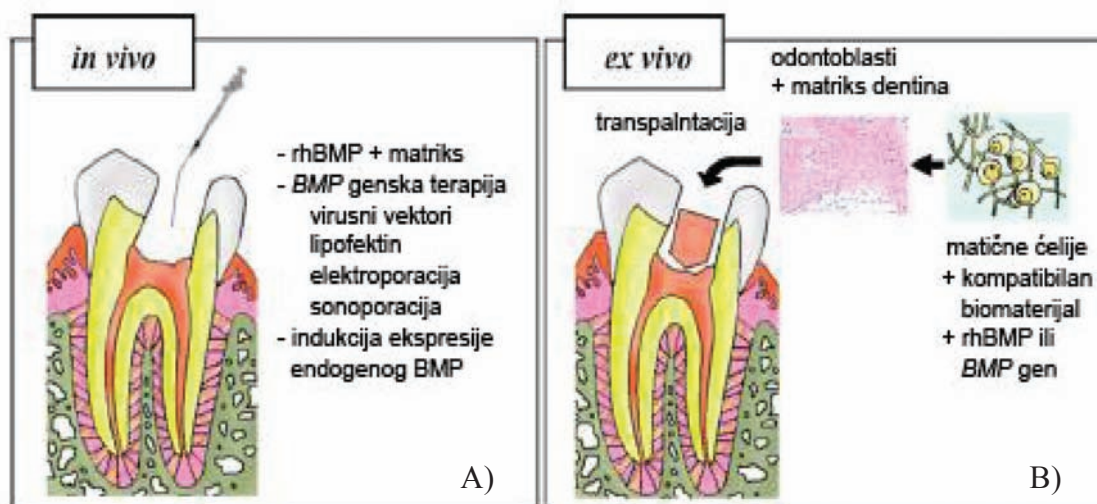
Slika 5. Matične ćelije i signali za regeneraciju dentina. U cilju regeneracije dentina ispituje se upotreba različitih matičnih ćelija koje se uz pomoć BMP proteina ili gena diferenciraju u odontoblaste. (Modifikovano iz: Nakashima M. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2005 16:369–376.)

Krajnji cilj regenerativne konzervativne stomatologije i endodoncije u terapiji oboljenja pulpe bio bi regeneracija pulpo-dentinskog kompleksa. Elementi na kojima se bazira tkivno inženjerstvo ovog kompleksa obuhvataju matične ćelije, odgovarajuće ćelijske nosače i induktivne koštane morfogenetske proteine, kao što su BMPs. Matične ćelije koje se koriste u ispitivanjima su mezenhimalne ćelije iz pulpe, autologe ili alogene, zatim embrionalne matične ćelije, ćelije dobijene genetskim inženjeringom, *in vitro* umnožene pa transplantirane, ili mobilisane *in situ*. Induktivni morfogenetski signali, koji dovode do diferencijacije matičnih ćelija u odontoblaste, najčešće pripadaju familiji BMP. Ekstracelularni matriks dentina služi za vezivanje, proliferaciju i diferencijaciju ćelija, a kao ćelijski nosači sa ovom funkcijom mogu se koristiti prirodni i veštački materijali, kao i njihove kombinacije. Oni moraju biti biokompatilni, biorazgradljivi, sa

tačno određenim mehaničkim osobinama i vremenom razgradnje, a najčešće se koriste hidroksiapatit, trikalcijumfosfat, kolagen, fibronektin, alginati, polilaktidi, kao i mnogi drugi (Galler i sar., 2011).

U terapiji dubokog karijesa prekrivanjem pulpe kalcijum hidroksidom dešavaju se slični procesi, pri čemu ćelije iz dubljih tkiva pulpe migriraju ka leziji pod uticajem faktora rasta i diferencijacije oslobođenih iz okolnog dentina, a funkciju ćelijskog nosača za koji se ćelije vezuju predstavlja osteodentin. Dalje se ove ćelije diferenciraju u odontoblaste i formiraju tubularni dentin (Schröder, 1985).

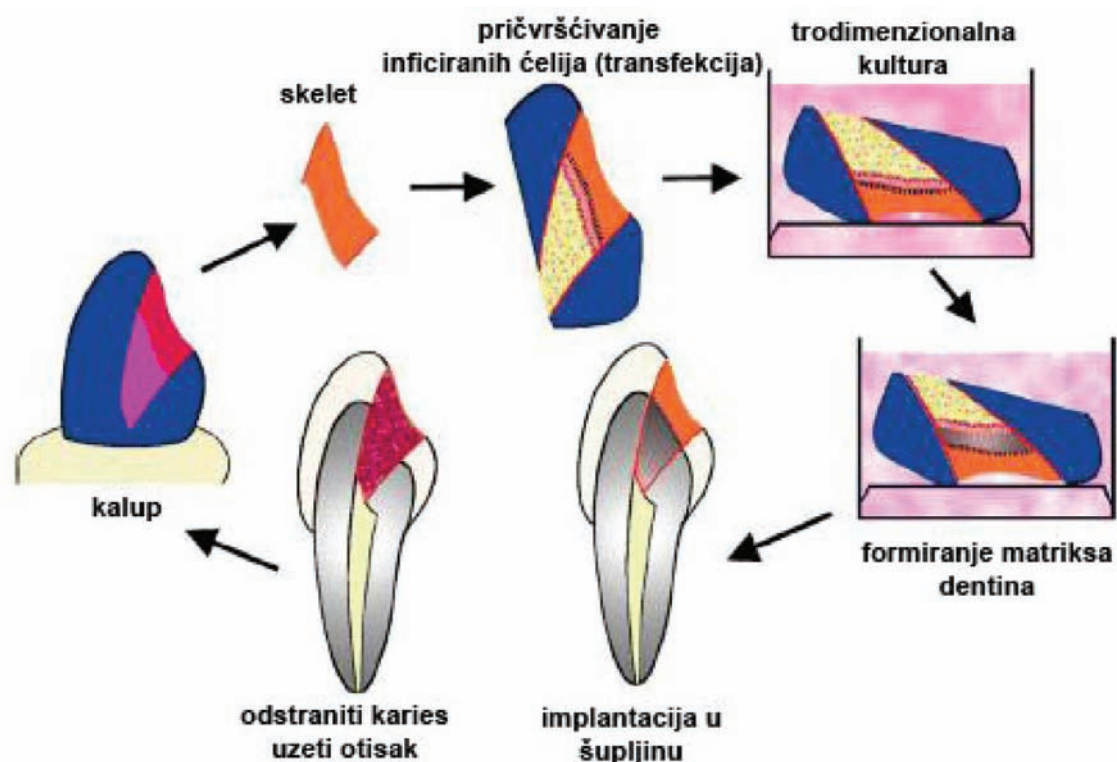
Postoje dva pravca istraživanja u tkivnom inženjerstvu pulpo-dentinskog kompleksa: 1) *in vivo* metoda, gde se podstiče regeneracioni potencijal pulpe direktnom aplikacijom BMP proteina ili transferom BMP gena na odgovarajućem nosaču na eksponirano tkivo pulpe; 2) *in vitro* metoda, gde se prvo vrši izolovanje matičnih ćelija iz pulpe, njihova diferencijacija u odontoblaste pomoću BMP proteina ili transfekcije BMP genom, a zatim transplantacija na eksponiranu pulpu (Slika 6) (Nakashima, 2005).



Slika 6. Dva pravca istraživanja za regeneraciju pulpe i dentina. A) *In vivo* aktivacija lokalnih matičnih ćelija prisutnih u pulpi; B) *In vitro* umnožavanje matičnih ćelija i njihova transplantacija na odgovarajućem nosaču. (Modifikovano iz: Nakashima M. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. Cytokine & Growth Factor Reviews. 2005 16:369–376.)

BMP morfogenetski proteini su multifunkcionalni faktori rasta koji pripadaju superfamilji TGF- β i imaju ključnu ulogu u embrionalnom razvoju zuba, kontrolišući procese inicijacije, morfogeneze, citodiferencijacije i sekrecije ekstracelularnog matriksa (Åberg i sar., 1997). Utvrđeno je da BMP-2 ima ključnu ulogu u regeneraciji dentina, stimulišući diferencijaciju matičnih ćelija pulpe u odontoblaste (Saito i sar., 2004). Slične efekte ima i BMP-7 dovodeći do reparativne dentinogeneze i mineralizacije pulpe (Sloan i sar., 2000), dok BMP-4 iz ektoderma u toku embrionalnog razvoja deluje na aktivaciju mezenhima (Vainio i sar., 1993). Utvrđeno je takođe da prilikom aplikacije BMP na eksponiranu pulpu može doći do formiranja ili osteodentina ili tubularnog dentina u zavisnosti od nosača na kojima su aplikovani (Nakashima, 1994).

Činjenica da je poluživot ovih faktora rasta kratak kompromituje direktnu aplikaciju BMP proteina na eksponiranu pulpu u cilju indukcije reparacije dentina (Nakashima, 1994), a primena *in vivo* terapije u jako inflamiranoj pulpi nije efikasna (Rutherford, 2001), tako da se u takvim slučajevima koristi alternativni pristup. *In vitro* se izvrši transfekcija matičnih ćelija iz pulpe BMP genima, ili se na njih deluje BMP proteinima, a zatim se one na odgovarajućem nosaču transplantiraju na eksponiranu pulpu, nakon čega dolazi do stvaranja osteodentina i kasnije depozicije tubularnog dentina (Slika 7) (Nakashima i sar., 2005). Ćelije transfektovane BMP genima direktno učestvuju u ovim procesima, a različiti faktori rasta i diferencijacije se zadržavaju u matriksu i postepeno oslobađaju iz transplantata indukujući diferencijaciju pulpnih ćelija. U toku inflamacije pulpe i primene *ex vivo* genske terapije dolazi do pozitivne reakcija ćelija pulpe na eksperimentalnim životinjama, psima, tako da se ova metoda nameće kao terapija izbora u razvoju bioloških endodontskih tretmana (Nakashima i sar., 2005).



Slika 7. Sinteza tubularnog dentina za kliničku primenu. Matične ćelije pulpe tretirane sa BMP proteinom ili transfektovane BMP genom, transplantirane na odgovarajućem nosaču na eksponiranu pulpu, u cilju diferencijacije u odontoblaste i formiranja tubularnog dentina. (Modifikovano iz: Nakashima M. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2005 16:369–376.)

Inženjerstvo celog zuba predstavlja najvažniji cilj regenerativne stomatologije. Da bi on bio ostvaren potrebno je rekonstruisati procese koji se dešavaju tokom embrionalnog razvoja zuba, pri čemu međusobne reakcije između oralnog epitela, koji je ektodermalnog porekla, i ektomezenhima, koji vodi poreklo od neuralnog grebena, dovode do razvoja zuba kroz nekoliko razvojnih stadijuma: stadijum pupoljka, kape, zvona i klice. Kontrolni mehanizmi ovih procesa su izuzetno kompleksni tako da njihovo razumevanje predstavlja preduslov uspešnog inženjerstva zuba.

Generalno bi se dosadašnje metode mogle podeliti u dve grupe, pri čemu se u prvoj koriste različite matične ćelije i ćelijski nosači, dok drugi pristup kombinuje ćelije

različitog porekla sa različitim tkivima. Prilikom prvog pokušaja sinteze celog zuba korišćene su embrionalne ćelije svinje iz najranijeg stadijuma razvića zuba, stadijuma pupoljka, u kombinaciji sa PLGA nosačem i transplantirane u imunodeficientnog miša (Young i sar., 2002). Dobijene su sve strukture zuba sem periodoncijuma. Ista grupa autora je upotrebom PDGA kao ćelijskog nosača uspela da dobije i periodoncijum a transplantacija je izvršena u omentum atimičnog pacova (Young i sar., 2005). Veća mineralizacija dentina se dobija upotrebom embrionalnih ćelija pacova iz perioda pupoljka, na nosaču od svilenog fibroina (Xu i sar., 2008), dok se organizovane dentalne strukture, nakon transplantacije u mandibulu pacova, stvaraju korišćenjem adultnih ćelija iz zametka zuba pacova na PLGA nosaču (Dualibi i sar., 2008). Kao prelazno rešenje ka sintezi kompletnog zuba, a kao alternativa trenutno upotrebljavanim metalnim implantima, mogla bi biti sinteza korena i periodontalne membrane. Upotrebom kombinacije matičnih ćelija iz periodoncijuma i apikalne papile, na nosaču od hidroksiapatit/trikalcijumfosfata na modelu mini-svinje sintetisan je koren zuba i potporni aparat i na njima je moguća izrada keramičke krune (Nakahara i Ide, 2007).

Generalni problem kod tehnika koje koriste ćelijske nosače jeste nemogućnost postizanja odgovarajuće veličine zuba, a uzrok bi mogli biti ili korišćenje animalnog modela ili transfera mase u biorektoru (Ohazama i sar., 2004). Kod animalnih modela se uglavnom prvo vrši ektopična transplantacija malih nosača sa ćelijama u cilju njihovog sazrevanja *in vivo*, u renalnoj kapsuli ili omentumu. Nakon toga se vrši transplantacija u vilicu u cilju razvoja zubnih struktura. U *in vitro* tehnikama se uglavnom koriste perfuzioni bioreaktori koji bi trebalo da omoguće razmenu materija u okviru nosača ali se kao problem javlja dobijanje zuba smanjene veličine u odnosu na prirodne.

U cilju reprodukovanja embrionalnih intrakcija između oralnog epitela i ektomezenhima koriste se različite kombinacije ćelija i tkiva: 1) intaktni oralni epitel i ćelije ektomezenhima; 2) intaktni ektomezenhim i ćelije epitela; 3) razgradnja i epitela i ektomezenhima i kombinacija dobijenih ćelija (Ohazama i sar., 2004; Yamamoto i sar., 2003; Ye i sar., 2005). Izvršena je uspešna sinteza zametka zuba, njegova transplantacija

u vilicu pacova i nicanje potpuno funkcionalnog zuba (Ikeda i sar., 2009). Mastikatorna funkcija, kao i tvrdoća zuba i njegov senzorni sistem su potpuno odgovarali normalnom zubu, tako da ovaj model sinteze zametka određenog organa i njegova transplantacija mogu biti korišćeni kao tehnika za razvoj tkivnog inženjerstva drugih organa.

Translacija ovih bazičnih istraživanja u kliničku praksu ima mnoge poteškoće. Korišćenje embrionalnih ćelija podrazumeva etičke i zakonske prepreke u mnogim zemljama. Komplikovanost i cena ovakvih tehnika čini ih neprihvatljivim za rutinsku upotrebu, tako da se može reći da sadašnji razvoj poznavanja biologije matičnih ćelija, biomaterijala i tehnički razvoj predstavljaju dobru osnovu za dalji razvoj regenerativne stomatologije.

Drugi pravac ispitivanja potencijalne kliničke primene MMĆ iz pulpe zuba jeste u regenerativnoj medicini i terapiji oboljenja različitih organa.

S obzirom da MMĆ iz pulpe zuba vode poreklo iz neuralnog grebena, izvršena je njihova uspešna diferencijacija u sve ćelije nervnog tkiva, tako da su i očekivanja u ovoj oblasti najveća. Nakon transplantacije ovih ćelija na animalnom modelu kompletnog preseka kičmene moždine, potpuno se oporavlja lokomotorna funkcija, dok se samo delimični oporavak dešava nakon aplikacije MMĆ iz kostne srži (Sakai i sar., 2012). Matične ćelije iz pulpe pokazuju tri glavne neuroregenerativne funkcije: 1) inhibiraju apoptozu neurona, astrocita i oligodendrocita uzrokovanih povredom; 2) sprečavaju dejstvo inhibitora rasta aksona; 3) nadoknađuju izgubljene ćelije diferencijacijom u zrele oligodendrocite. Na ovaj način one pokazuju mogućnost upotrebe u budućoj terapiji neurodegenerativnih oboljenja kao što su Alchajmerova i Parkinsonova bolest. Kod eksperimentalnih životinja prisutno je značajno poboljšanje simptoma Parkinsonove bolesti jer nakon transplantacije u striatum pacova sa Parkinsonovom bolešću dolazi do delimičnog poboljšanja bihevioralnih poremećaja (Wang i sar., 2010).

Subpopulacija ćelija iz pulpe mlečnih i stalnih zuba okarakterisana grupom specifičnih površinskih antigena, ima veliki potencijal diferencijacije u pravcu koštanog tkiva, veći od ćelija iz kostne srži, koje su do sada smatrane najoptimalnijim izvorom

ćelija za terapiju ovih oboljenja (Laino i sar., 2006). Aplikacijom MMĆ iz pulpe u koštane defekte kritične veličine mini svinja dolazi do potpune regeneracije koštanog tkiva (Zheng i sar., 2009).

Imunomodulatorni efekat matičnih ćelija iz pulpe mlečnih zuba se zasniva na uticaju na T i B limfocite, kao i prirodne ćelije ubice, tako da se potencijalno mogu upotrebljaviti u terapiji nekih autoimunih oboljenja kao što je graft-protiv-domaćina i sistemski lupus eritematosus (Yamaza i sar., 2010). Praćeno je njihovo *in vitro* dejstvo na ćelije imunog sistema, T-helper 17 ćelije koje su odgovorne za patogenezu autoimunih oboljenja i T regulatorne ćelije koje imaju preventivnu ulogu preko supresije proliferacije i produkcije proinflamatornih citokina i imunih ćelija. Pokazano je da MMZ dovode do poboljšanja odnosa T regulatornih i T-helper 17 ćelija, kao i do smanjenja broja T-helper 17 ćelija u perifernoj krvi (Yamaza i sar., 2010).

Uspeh svake terapije zavisi od uspostavljanja adekvatne vaskularizacije, tako da su ćelije sa potencijalom diferencijacije u pravcu endotelnih ćelija sastavni deo koncepta tkivnog inženjerstva. MMĆ iz pulpe zuba imaju sposobnost diferencijacije u endotelne ćelije *in vitro* i nakon transplantacije u imunokompromitovane miševе, što otvara mogućnost potencijalne primene ovih ćelija u regeneraciji različitih tkiva (Sakai i sar., 2010).

Ispituje se i primena MMZ u regeneraciji tkiva jetre. Dodatkom u medijum za kultivisanje faktora za hepatičnu diferencijaciju, MMZ su bile pozitivne na ekspresiju markera specifičnih za hepatocite (Ishkitiev i sar., 2010). U njima su pronađene i značajne količine insulina. Isti potencijal je dokazan za matične ćelije iz pulpe mlečnih i stalnih zuba (Ishkitiev i sar., 2010), a najnovija istraživanja su pokazala mogućnost dobijanja ćelija pankreasa iz ćelija pulpe što daje nadu pacijentima obolelim od dijabetesa (Govindasamy i sar., 2011).

Skorašnja saznanja o biologiji embrionalnih i adultnih matičnih ćelija su privukla izuzetnu pažnju javnosti i doveli do očekivanja terapijskih procedura u bliskoj budućnosti. Iako su neke kliničke primene ovih ćelija već prisutne, ili će uskoro biti,

potrebno je uložiti još mnogo napora u istraživanjima njihovih bioloških osobina. Bez obzira na ove probleme, na osnovu dosadašnjih saznanja može se zaključiti da su matične ćelije dentalnog porekla izuzetan izvor lako dostupnih mezenhimalnih matičnih ćelija, sa velikim potencijalom za buduću primenu u regenerativnoj medicini.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Istraživanja obuhvaćena ovom disertacijom imala su za cilj izolovanje, identifikaciju i karakterizaciju multipotentnih mezenhimalnih matičnih ćelija poreklom iz pulpe mlečnih zuba. U poslednjih 15 godina, mezenhimalne matične ćelije različitog stepena multipotentnosti izolovane su iz gotovo svih adultnih tkiva, a najnovija istraživanja ukazuju na prisustvo adultnih matičnih ćelija i u tkivima dentalnog porekla. Međutim, i pored intenzivnih istraživanja u ovoj oblasti, karakteristike i funkcionalna svojstva mezenhimalnih matičnih ćelija izolovanih iz zubne pulpe nisu još u potpunosti razjašnjeni. Pored toga, imajući u vidu da su matične ćelije u osnovi heterogene ćelijske populacije koje sadrže opredeljene matične ćelije različitog stepena zrelosti i diferencijacije, kao i da danas ne postoji jedinstven protokol, niti univerzalni fenotipski test kojim se može pokazati da su ćelije izolovane iz različitih tkiva upravo mezenhimalne matične ćelije, neophodno je identifikovati i okarakterisati svaku izolovanu populaciju ćelija. Takođe, optimizacija procesa dobijanja, kultivisanja i identifikacije ovih ćelija su neophodan uslov i za njihovu dalju diferencijaciju u pravcu funkcionalnog tkiva, prvo u *in vitro* uslovima, a zatim i *in vivo*. Proliferacija i diferencijacija MMZ je delom određena komponentama mikrosredine kao što su različiti citokini i faktori rasta. Poznavanje efekata citokina na MMZ omogućava manipulisanje ćelijama u svrhu prilagođavanja funkcija MMZ za potencijalnu kliničku primenu. Poznato je da bFGF i proinflamatorni citokin, IL-17, deluju kao faktori rasta MMĆ izolovanih iz kostne srži miša i čoveka. Međutim, pojedinačni i udruženi efekti bFGF i IL-17 na funkcionalna svojstva MMĆ izolovanih iz pulpe mlečnih zuba čoveka do sada nisu ispitani.

Polazeći od ovih činjenica postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja obuhvaćenih ovim radom:

1. Izolovanje i kultivisanje ćelija iz pulpe mlečnih zuba, njihova krioprezervacija i određivanje vijabiliteteta nakon odleđivanja;

2. Određivanje klonogenog potencijala pomoću CFU-F testa, ispitivanje kratkotrajnog proliferativnog kapaciteta izolovanih ćelija kao i određivanje vremena dupliranja populacije tokom dugotrajnog kultivisanja;
3. Karakterizacija mezenhimalnih matičnih ćelija određivanjem imunofenotipa izolovanih ćelija dokazivanjem pozitivne ekspresije mezenhimalnih markera (STRO-1, CD44H, CD90, CD105, vimentin i α -SMA) i negativne ekspresije markera hematopoetskih ćelija (CD34, CD11b, CD45, CD33, CD235a);
4. Određivanje multipotentnog potencijala diferencijacije mezenhimalnih matičnih ćelija u pravcu stvaranja ćelija različitih mezenhimalnih tkiva (koštanog, masnog, hrskavičavog i mišićnog);
5. Ispitivanje uticaja mikrookruženja na ponašanje mezenhimalnih matičnih ćelija pomoću određivanje efekata IL-17 i bFGF na proliferaciju izolovanih ćelija.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. IZOLACIJA I KULTIVISANJE MMZ

Mlečni sekutići su ekstrahovani u lokalnoj anesteziji, prema uputstvu Etičkog komiteta Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, uz potpisanu saglasnost roditelja pacijenata. Pulpno tkivo je odvojeno od zuba pomoću pogodnih instrumenata, ekskavatora i nerv igala.

Izolovano tkivo pulpe je stavljano u Dulbecco-ov modifikovani Eagle-ov medijum (DMEM- Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma St. Louis, MO, USA) sa dodatim 10% Fetalnim Goveđim Serumom (10% Fetal Bovine Serum-FBS) (FBS, PAA Laboratories, Linz, Austria) i u njemu transportovano do laboratorije za izolaciju u periodu kraćem od 2 sata. Posle desetominutnog centrifugiranja na 1800 obrtaja po minutu (opm) i uklanjanja supernatanta, tkivo pulpe je postavljano u rastvor koji je sadržao 3mg/ml kolagenaze tip I (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) u fosfatnom fiziološkom rastvoru (PBS-Phosphate-Buffered Saline, PAA Laboratories, Linz, Austria), sa 20% FBS. Nakon inkubacije od 45 minuta na 37°C, ćelijskoj suspenziji je dodavan rastvor PBS sa 2% FBS, i suspenzija je pasažirana kroz mrežicu sita. Dobijene jednoćelijske suspenzije su ispirane i nakon toga je vršeno brojanje ćelija pod mikroskopom u Spencer-ovoj komori nakon razblaživanja ćelijske suspenzije Türk-ovim rastvorom (Superlab, Beograd, Srbija). Na osnovu nađenog ukupnog broja ćelija podešavana je odgovarajuća koncentracija ćelija za kultivaciju.

Kao što je prethodno opisano za MMĆ izolovane iz pulpe stalnih zuba (Gronthos i sar., 2000), i MMZ su izolovane na osnovu njihove osobine da adheriraju na plastičnu podlogu. U našim eksperimentima ćelije dobijene iz jednog zuba su zasejavane u 25cm² plastične boce za kultivaciju ćelija (Sarstedt, Numbrecht, Germany) u koncentraciji od 0,1 - 1 x 10⁴ ćel/cm² u medijumu za kultivaciju koji je sadržavao DMEM, 20% FCS,

300 μM vitamina C (Sigma, St Louis, MO, USA), 100 U/ml penicilin/streptomcina (PAA Laboratories, Linz, Austria). Ovako pripremljene ćelijske kulture su inkubirane na temperaturi od 37°C , u vlažnoj atmosferi od 5% CO_2 . Nakon 3 dana, neadherentne ćelije su uklanjane i dodavan je novi medijum koji je pri daljoj kultivaciji ćelija menjan svakih 2-3 dana. Ćelije su kultivisane do momenta postizanja subkonfluentnosti (80-90% prekrivenosti površine). Ove adherentne ćelije su označene kao nulta pasaža (P_0), a svaka naredna označavana je odgovarajućim rednim brojem. Za postupak pasažiranja, adherentne ćelije su ispirane dva puta rastvorom PBS-a bez Ca^{2+} i Mg^{2+} i odlepljivane od podloge inkubiranjem sa rastvorom 0,25 % tripsina/1mM EDTA (PAA Laboratories, Linz, Austrija) u trajanju 5–10 minuta na 37°C . U cilju prekidanja ove reakcije i inaktivacije tripsina, ćelijama je dodavan medijum za kultivaciju sa FBS, a odlepljene ćelije su prebacivane u epruvete i centrifugirane na 1800 opm u trajanju 10 minuta. Nakon toga određivan je broj vijabilnih ćelija istom procedurom kojom se vrši brojanje ćelija, ali je umesto Túrko-ovog rastvora korišćen 0,4 % rastvor Tripan plavog (Gibco BRL, Invitrogen, San Diego, CA, SAD), koji bojeći samo mrtve ćelije, zbog narušene građe njihove membrane na jednostavan način omogućuje detektovanje živih, nebojenih ćelija. Ćelije su nakon ovog postupka ponovo zasejavane za sledeći postupak pasažiranja u 25 cm^2 plastične boce za kultivaciju ćelija u koncentraciji od 1×10^4 ćel/ cm^2 .

3.2. KRIOPREZERVACIJA I ODLEĐIVANJE MMZ

Za potrebe daljih ispitivanja, izolovane MMZ su čuvane u tečnom azotu, i korišćene nakon odmrzavanja i odgovarajućeg *in vitro* kultivisanja. Ćelije su zamrzavane na sledeći način: nakon odlepljivanja od podloge sa rastvorom tripsin/EDTA i odgovarajućih ispiranja, ćelije su resuspendovane u koncentraciji od 1 - 2 $\times 10^6$ ćel/ml u hladnom medijumu koji se sastojao od 90% FBS sa dodatkom 10% krioprotektivnog agenta DMSO (dimetil-sulfoksid-DMSO, Sigma–Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Ovako rastvorene ćelije su

razlivane u prethodno ohlađene krio-epruvete i postavljane u posude za zamrzavanje koje sadrže izopropanol i odmah su prebacivane na -70°C , preko noći. U toku sledećih 24 h krio-epruvete su postavljane u tankove sa tečnim azotom na -196°C .

Pre upotrebe ćelije su odmrzavane u vodenom kupatilu na 37°C u toku 1-2 minuta. Krioprotektivni agens je brzo, ali nežno uklanjan, prebacivanjem ćelijske suspenzije u konusne epruvete za centrifugiranje sa medijumom za kultivaciju i centrifugiranjem na 1500 opm tokom 10 minuta. Nakon odlivanja supernatanta, ćelije su resuspendovane u medijumu za kultivaciju i određivan je njihov vijabilitet i oporavak, brojanjem ćelija u Spencer-ovoj komori nakon razblaživanja u rastvoru Tripan plavog. Na osnovu utvrđenog broja živih ćelija u suspenziji podešavana je odgovarajuća koncentracija ćelija za dalju kultivaciju.

Vijabilitet ćelija je određivan kao odnos između broja živih i ukupnog broja ćelija u uzorku, a brojanje je rađeno u triplikatima. Oporavak ćelija određivan je kao odnos između broja živih ćelija u odmrznutom uzorku i ukupnog broja zamrznutih ćelija.

3.3. CFU-F (Colony Forming Unit-Fibroblast) TEST

CFU-F test korišćen je za određivanje klonogenog potencijala izolovanih MMZ. Za izvođenje ovog testa ćelije su zasejavane u plastične ploče za kulturu tkiva sa 6 otvora, površine $9,5\text{ cm}^2$, u koncentraciji od 10, 50 i 100 ćelija po otvoru u medijumu za kultivaciju, a za svaku eksperimentalnu grupu postavljane su najmanje dve kulture. Svakih 2-3 dana ćelijama je dodavan svež medijum, a nakon 14 dana kultivisanja na 37°C u atmosferi sa 5% CO_2 , kultura ćelija je prekidana, fiksiranjem i bojenjem. Ukratko, ćelije su ispirane 2 puta PBS-om, fiksirane ledeno hladnim metanolom (Superlab, Beograd, Srbija) 5 minuta na sobnoj temperaturi i bojene 0,3% kristal ljubičastim (Carlo-Erba reagents, Milan, Italy) 15 minuta. Ćelije su na kraju ispirane 2 puta destilovanom vodom i preparati osušeni na vazduhu. Broj formiranih kolonija određivan je brojanjem pod inverznim mikroskopom na uveličanju 40 puta, pri čemu

je kao jedna kolonija podrazumevana grupacija ćelija koja sadrže više od 50 ćelija. Eksperimenti su ponavljani najmanje 2 puta a rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti svih merenja.

3.4. ODREĐIVANJE PROLIFERATIVNOG KAPACITETA ĆELIJA

Za određivanje proliferativnog kapaciteta MMZ u kratkotrajnim kulturama, ćelije iz pasaža P2 i P3, zasejavane su u duplikatu u plastične ploče za kulturu tkiva sa 6 otvora u koncentraciji od 4×10^4 ćelija po otvoru i inkubirane na 37°C u vlažnoj atmosferi od 5% CO_2 . Nakon 2., 4. i 7. dana inkubacije, ćelije su prikupljane nakon postupka odlepljivanja sa tripsin-EDTA, i odgovarajućih ispiranja i određivani su broj i vijabilnost.

Za potrebe eksperimenata u kojima je ispitivan efekat IL-17 i FGFb na proliferativni kapacitet matičnih ćelija izolovanih iz zubne pulpe, ćelije su zasejavane u duplikatu u plastične ploče za kulturu tkiva sa 24 otvora u koncentraciji 1×10^4 ćelija po otvoru u DMEM medijumu sa 10% FCS i 300 μM vitamina C, u prisustvu IL-17 (0, 5, 50 ng/ml) i/ili bFGF (1ng/ml) tokom 2, 4 i 7 dana na 37°C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO_2 . Po isteku inkubacije, u svakoj eksperimentalnoj grupi ćelije su tretirane rastvorom tripsin-EDTA i ispirane nakon čega je određivan broj vijabilnih ćelija. Test je urađen najmanje 3 puta za svaku eksperimentalnu grupu.

Za određivanje proliferativnog kapaciteta MMZ u dugotrajnim kulturama, ćelije iz pasaža P2 i P3, zasejavane su u duplikatu u plastične ploče za kulturu tkiva sa 6 otvora u koncentracijama 1×10^4 , 5×10^4 i 1×10^5 ćelija/otvoru i inkubirane su na 37°C u vlažnoj atmosferi od 5% CO_2 do postizanja konfluentnosti. Nakon procesa odvajanja od podloge sa rastvorom tripsin-EDTA, vršeno je brojanje ćelija, koje su ponovo zasejavane u istim koncentracijama, 1×10^4 , 5×10^4 i 1×10^5 ćelija po otvoru. Ova procedura je ponavljana pri svakoj pasaži u periodu od 24 dana. Iz dobijenih podataka izračunavano je vreme dupliranja populacije (VDP) prema sledećoj formuli

$$\text{VDP} = \frac{(T-T_0) \lg 2}{(\lg N_t - \lg N_0)}$$

gde VDP predstavlja vreme dupliranja populacije, T0 je vreme početka kultivisanja, T je vreme završetka, dok N0 i Nt predstavljaju broj ćelija na početku, odnosno na kraju kultivisanja.

3.5. IMUNOFLUORESCENTNO BOJENJE ĆELIJA

Za imunofenotipsku analizu ekspresije markera potrebnih za karakterizaciju mezenhimalnih matičnih ćelija korišćeni su test direktne i test indirektna fluorescencija, a rezultati su analizirani metodom protočne citometrijske analize ili su očitavani na mikroskopu.

3.5.1. PROTOČNA CITOMETRIJA

Za analizu ekspresije markera pomoću metode protočne citometrijske analize korišćene su ćelije iz pasaža P3 do P6. Nakon postizanja konfluentnosti i odvajanja od podloge, za test direktne fluorescencije 2×10^5 ćelija inkubirano je u mraku 30 minuta na 4 °C sa monoklonskim antitelima specifičnim za markere humanih mezenhimalnih i hematopoetskih ćelija:

CD34 (antigen hematopoetskih progenitorskih ćelija; konjugovan fikoeritriinom-*phycoerythrin*, PE) (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark);

CD11b (Mac-1 α ; konjugovan fluorescein izotiocijanatom -*fluorescein isothiocyanate*, FITC), (Biosource Invitrogen, Camarillo, CA, USA);

CD45 (uobičajen leukocitni antigen/ marker ćelija hematopoetskog porekla; FITC konjugovan) (Biosource Invitrogen, Camarillo, CA, USA);

CD33 (Sialic Acid-Binding Immunoglobulin-Like Lectin 3; SIGLEC 3; površinski marker veoma ranih hematopoetskih ćelija iz kostne srži; Fluorescein konjugovan) (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA);

CD105 (endoglin; R-PE konjugovan), (Biosource Invitrogen, Camarillo, CA, USA);

CD235a (glikoforin A; PE konjugovan) (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA);

CD44H (PE konjugovan) (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA);

CD90 (Thy-1/Thy-1.1; PE konjugovan) (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Za određivanje nivoa nespecifičnog vezivanja korišćena su odgovarajuća fluorohrom-konjugovana izotipska kontrolna antitela.

Za detekciju vezivanja nekonjugovanog **STRO-1** antitela (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) korišćen je test indirektno fluorescencije, jer je nakon inkubacije 30 minuta na 4 °C u mraku, dodavano sekundarno antitelo FITC-obeleženi kozji anti-mišiji IgM (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) koje je sa ćelijama inkubirano 30 minuta na 4 °C u mraku. Za određivanje nivoa nespecifičnog vezivanja korišćena su kontrolna antitela istog izotipa (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA)

Protočna citometrija je rađena na protočnom citometru CyFlow SL (Partec, Münster, Germany), opremljenim laserom snage 20mW koji emituje svetlost talasne dužine 488 nm (plava). Citometar je kalibrisan pomoću kalibracionih kuglica od 3 µm (Partec, Münster, Germany) prema uputstvu proizvođača. Rezultati su analizirani pomoću softvera Partec FlowMax 2.4 (Partec, Münster, Germany) i prikazani u vidu tačkastih dijagrama prednjeg i bočnog rasipanja i histograma fluorescencije. Histogram fluorescencije je definisan apsolutnim brojem registrovanih događaja na linearnoj skali ordinate i relativnim vrednostima intenziteta fluorescencije svakog pojedinačnog događaja izraženim brojevima kanala fluorescencije (0-1024) na logaritamskoj skali apscise. Procenat pozitivnih ćelija je određivan postavljanjem granične vrednosti fluorescencije na osnovu izotipske kontrole tako da su kao pozitivne brojane ćelije koje su imale intenzitet fluorescencije viši od 98% ćelija izotipske kontrole. Analizirano je najmanje 10.000 ćelija po uzorku.

3.5.2. TEST INDIREKTNE FLUORESCENCE ZA DETEKCIJU INTRACELULARNIH ĆELIJSKIH MARKERA

Za test indirektne fluorescence 2×10^4 MMZ ćelija je zasejavano na plastičnim ljusticama (Sarstedt, Numbrecht, Germany) i kultivisano 24 časa. Nakon fiksiranja ćelija sa rastvorom 4% formaldehida u PBS-u, ćelijski monoslojevi su tretirani PBS rastvorom sa 0,1% TritonX u toku 2 minuta u cilju permeabilizacije ćelijske membrane, a zatim su inkubirani 1 sat na sobnoj temperaturi sa mišjim anti-vimentin i mišjim anti- α -SMA (alpha-Smooth Muscle Actin) antitelima (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Nakon odgovarajućih ispiranja, ćelije su inkubirane sa kozjim anti-mišjim-FITC sekundarnim antitelom (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) i 1 μ g/ml DAPI (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) u toku sat vremena na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon ispiranja, uzorci su analizirani i fotografisani pomoću epi-fluorescentnog mikroskopa Axioskop 2 plus i digitalne kamere AxioCam MRc5 (Carl Zeiss GmbH, Göttingen, Germany).

3.6. ODREĐIVANJE POTENCIJALA DIFERENCIJACIJE ĆELIJA

Za utvrđivanje potencijala diferencijacije MMZ, ćelije iz pasaže P3 su zasejavane u plastične ploče za kulturu tkiva sa 24 otvora, površine 2 cm² po otvoru u koncentraciji od 4000 ćel/cm² i kultivisane u medijumu za kultivaciju do postizanja subkonfuentnosti. Nakon toga, bazalni medijum je zamenjivan medijumima za indukciju specifičnog diferentovanja u cilju usmeravanja MMZ ka stvaranju odgovarajućih ćelija različitih mezenhimalnih tkiva. Kao kontrole su korišćene paralelne inkubacije ćelija u osnovnom medijumu za kultivaciju.

3.6.1. *IN VITRO* OSTEOGENA DIFERENCIJACIJA

Medijum za indukciju osteogene diferencijacije sastojao se od DMEM u koji je

dodavano 10 nM deksametazona (Applichem, Darmstadt, Germany), 200 μ M vitamina C, 10 mM β -glicerofosfata (Sigma–Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 100 U/ml penicilin/streptomicina, 1% HEPES (PAA Laboratories, Linz, Austria) i 10% FBS. Ćelije su inkubirane u medijumu 21 dan, na temperaturi od 37°C i vlažnosti 5% CO₂. Medijum je menjan 3 puta nedeljno. Osteogena diferencijacija je analizirana merenjem aktivnosti alkalne fosfataze.

3.6.1.1 ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ALKALNE FOSFATAZE

Aktivnost ćelijske alkalne fosfataze je određivana 6. i 7. dana kultivacije ćelija u medijumu za indukciju osteogene diferencijacije. Jednoslojne ćelijske kulture su ispirane dva puta fiziološkim rastvorom, fiksirane 30 sekundi na sobnoj temperaturi sa 0,2 ml/ otvoru 3,7% formaldehida u 90% etanolu i bojene sa 300 μ l 5-bromo-4-hlor-3-indolil fosfat/nitro plavim tetrazolinom (BICP/NBT, Sigma – Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Ćelije su inkubirane do pojave plave boje karakteristične za krajnji produkt reakcije supstrata sa alkalnom fosfatazom. Reakcija je prekinuta ispiranjem sa fiziološkim rastvorom. Nakon toga ćelije su fotografisane na svetlosnom mikroskopu.

3.6.2. *IN VITRO* HONDROGENA DIFERENCIJACIJA

Za indukciju hondrogene diferencijacije korišćen je medijum koji se sastojao od DMEM sa dodatkom 5 ng/ml transformišućeg faktora rasta- β 1 (TGF- β 1; R & D Systems, Minneapolis, MN, USA), 200 μ M vitamina C, 10 nM deksametazona, 100 U/ml penicilin/streptomicina, 1% HEPES i 1% FBS. Ćelijske kulture su inkubirane dodatnih 21 dan, sa promenom medijuma na svakih 3 dana. Na kraju inkubacije vršeno je bojenje sa Safranin O.

3.6.2.1. SAFRANIN O BOJENJE

Dvadesetjedan dan nakon indukcije hondrogene diferencijacije ćelijske kulture su ispirane dva puta PBS rastvorom i fiksirane hladnim metanolom 5 minuta. Nakon toga ćelije su ispirane dva puta destilovanom H₂O i bojene 0,01% rastvorom Fast Green boje (Merck, Darmstadt, Germany) 3 minuta. Višak boje je uklanjan, i dodavan je rastvor 1% CH₃COOH u trajanju od 10-15 sekundi. Nakon toga kulture su bojene 0,1% rastvorom Safranin O (Merck, Darmstadt, Germany) 6-7 minuta i na kraju ispirane H₂O i fotografisane na svetlosnom mikroskopu.

3.6.3. *IN VITRO* ADIPOGENA DIFERENCIJACIJA

Za adipogenu diferencijaciju kulture subkonfluentnih ćelija su inkubirane u medijumu za indukciju adipogene diferencijacije u toku 4 nedelje. Medijum se sastojao od DMEM sa dodatkom 100 µg/ml isobutil-metilksantina (IBMX; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 1 µM deksametazona, 10 µg/ml insulina (Actrapid, Novonordisc, Bagsvaerd, Denmark), 100 U/ml penicilin/streptomicina, 1% HEPES i 10% FBS. Medijum je menjan tri puta nedeljno, a prisustvo intracelularnih lipidnih vakuola, koji potvrđuju adipogenu diferencijaciju, je utvrđivano bojenjem pomoću Oil Red O .

3.6.3.1. OIL RED O (Sigma-Aldrich) BOJENJE

Nakon indukcije adipogene diferencijacije, kulture MMĆ su ispirane dva puta rastvorom PBS-a i fiksirane 10% formalinom u PBS-u u toku 15 minuta. Nakon toga, ćelije su ispirane dva puta destilovanom H₂O i bojene 0,2 % rastvorom Oil red O (Merck, Darmstadt, Germany) 2 sata. Na kraju, ćelije su ispirane destilovanom H₂O i fotografisane na svetlosnom mikroskopu.

3.6.4. IN VITRO MIOGENA DIFERENCIJACIJA

Za indukciju miogene diferencijacije, MMC su kultivisane u odgovarajućem medijumu koji se sastojao od DMEM sa 5% konjskim serumom (PAA Laboratories, Linz, Austria), 50 μ M hidrokortizona (Galenika, Beograd, Serbia), 0,1 μ M deksametazona i 2% FBS. Čelije su kultivisane 16 dana sa promenom medijuma na svakih 2-3 dana. Za ispitivanje miogene diferencijacije ćelije su ispirane PBS-om, fiksirane ledenim metanolom 5 minuta na sobnoj temperaturi i bojene 0,3% rastvorom boje kristal-ljubičasto (Carlo-Erba reagents, Milan, Italy) u toku 15 minuta. Preparati su zatim ispirani destilovanom vodom i pomoću svetlosnog mikroskopa ispitivano je prisustvo miotubula.

3.7. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

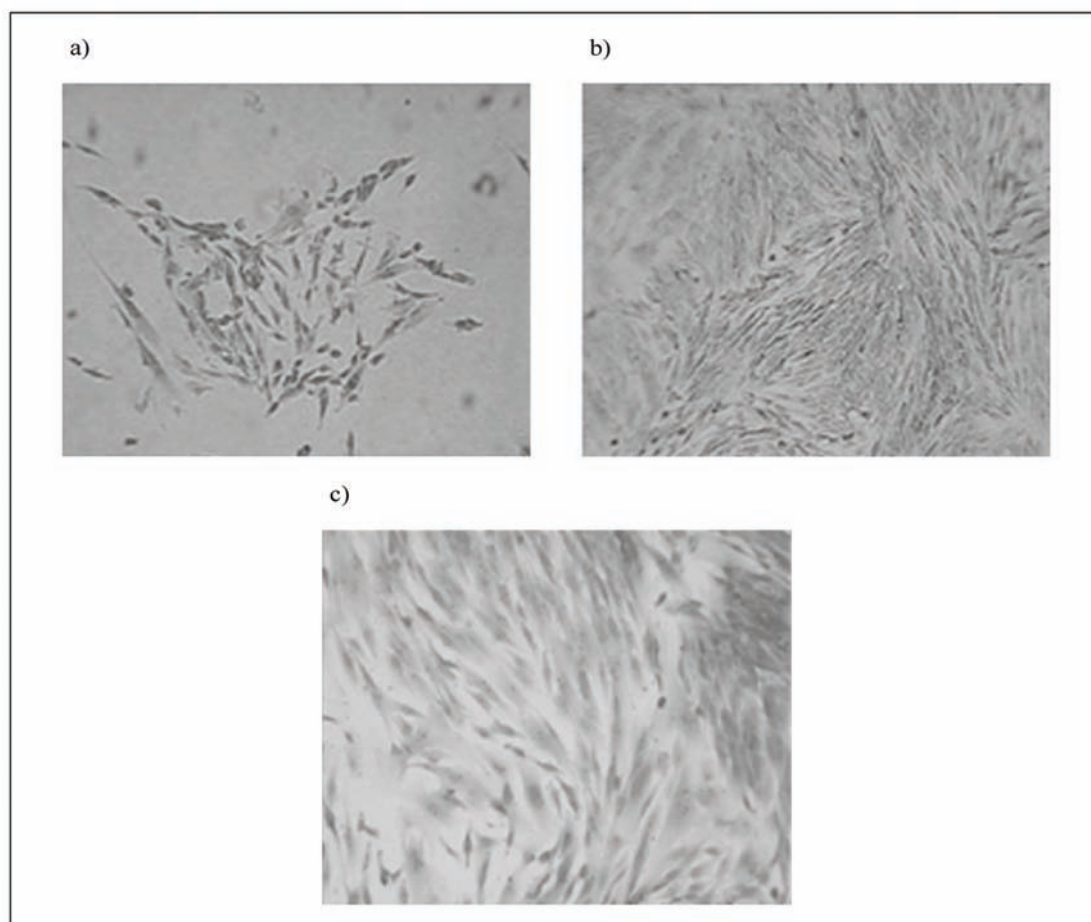
Izračunavani su standardni numerički parametri – srednja vrednost i standardna greška dobijenih rezultata. Značajnost nađenih razlika za svaki od ispitivanih parametara između eksperimentalnih i kontrolnih grupa određivana je pomoću Student t-testa primenom Origin PC programa. Statistički značajnom je smatrana verovatnoća manja od 0,05.

4. REZULTATI

4.1. IZOLACIJA I KULTIVISANJE MMZ

Prilikom odvajanja preostalog tkiva pulpe ekstrahovanih mlečnih zuba, primećena je razlika u boji pulpnog tkiva. Krvarenje i crvena boja su bili prisutni kod zuba sa manjim stepenom luksacije i sa manjom resorpcijom korena, dok je siva boja i izostanak krvarenja primećena kod luksiranih zuba sa većom korenskom resorpcijom. Kod ovih prvih je uspešno izvršena izolacija primarnih ćelijskih kultura, dok je kod druge grupe siva boja bila pokazatelj avitalnosti pulpe usled resorpcije mlečnih korenova. Kod takvih zuba nije bilo moguće izolovati vitalne ćelije, ili je njihov broj bio izuzetno mali i nedovoljan za dalju ekspanziju.

Dejstvom kolagenaze na tkivo pulpe dobijene su jednoćelijske suspenzije koje su kultivisane u tečnom medijumu, pri maloj gustini ($0.1 - 1 \times 10^4$ ćel/cm²), u zavisnosti od broja dobijenih ćelija iz uzorka. Dva do tri dana nakon početka kultivisanja ćelije su počele da stvaraju agregate (Slika 8a), a da adheriraju za plastičnu podlogu nakon nekoliko sati. Većina ćelija je imala fibroblastni, vretenast oblik (Slika 8c). Nakon 7-10 dana od početka kultivisanja uočene su kolonije koje su se sastojale od oko 50 ćelija, a oko 20. dana ćelije su dostigle 80-90% konfluentnosti i bile spremne za prvu pasazu (Slika 8b). Nakon početnog kultivisanja ćelije su znatno brže proliferisale dostižući 80% konfluentnosti obično za 7-8 dana, zadržavajući vretenast oblik i bez primećenih promena u morfologiji tokom dugotrajnog kultivisanja. Takođe nije ustanovljena pojava spontane diferencijacije, i tokom više od 10 pasaža ćelije su zadržale nepromenenu sposobnost proliferacije.



Slika 8. Morfološke karakteristike MMZ. (a) MMZ počinju da formiraju male kolonije; (b) MMZ koje su dostigle 80-90% konfluentnosti; (c) Tipičan vretenast, fibroblastni oblik ćelija. Uveličanje 4x (a, b) i 10x (c).

4.2. KRIOPREZERVACIJA I ODMRZAVANJE MMZ

Osobine i vijabilnost ćelija nakon krioprezervacije su izuzetno važne za njihovu potencijalnu kliničku primenu. Zbog toga je posle svake pasaže deo ćelija zamrzavan. Nakon različitih vremenskih intervala i odmrzavanja proveravana je vijabilnost i oporavak ćelija. U Tabeli 1 predstavljeni su reprezentativni uzorci kako ćelija čuvanih na -70°C , tako i ćelija čuvanih u tečnom azotu (LN2) na -196°C , u periodu od 40 do preko 200 dana. Prikazani rezultati pokazuju da se MMZ ćelije mogu uspešno čuvati

na niskim temperaturama, jer su i vijabilnost i oporavak odmrznutih ćelija bili u zadovoljavajućim granicama. Naime, vijabilnost MMZ čuvanih na -70°C kretala se po njihovom odmrzavanju u opsegu od 85% do 95% pri čemu je oporavak odmrznutih ćelija iznosio od 53% do 92%. Slično je i po odmrzavanju ćelija čuvanih u tečnom azotu vijabilnost MMZ iznosila od 80% do 98%, dok se oporavak ovako čuvanih ćelija kretao u opsegu od 53% do 97%.

Tabela 1. Vijabilnost i oporavak MMZ nakon zamrzavanja.

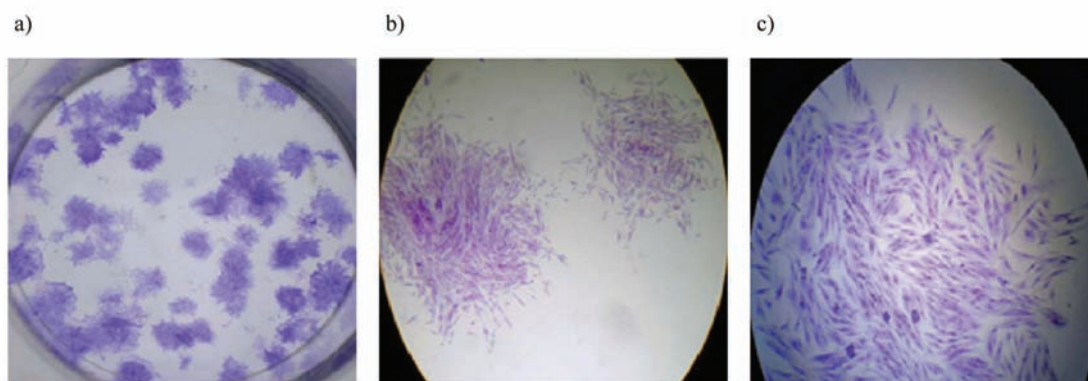
Pasaža	Zamrznuto broj ćelija	Čuvanje		Odmrznuto broj ćelija	Vijabilitet %	Oporavak %
		temp.	Dani			
P1	$1,1 \times 10^6$	-70°C	110	1×10^6	85	90,9
P2	1×10^6	LN_2	205	$7,75 \times 10^5$	86	77,5
P2	$1,5 \times 10^6$	-70°C	110	8×10^5	91	53,3
P3	$1,1 \times 10^6$	-70°C	115	1×10^6	95	90,9
P3	$1,3 \times 10^6$	-70°C	100	1×10^6	93	76,9
P3	$1,1 \times 10^6$	LN_2	200	$1,025 \times 10^6$	98	93,2
P4	$1,5 \times 10^6$	-70°C	40	$1,375 \times 10^6$	88	91,7
P4	$1,5 \times 10^6$	-70°C	50	$1,25 \times 10^6$	93	83,3
P6	$1,65 \times 10^6$	LN_2	50	$1,6 \times 10^6$	82	96,9
P6	1×10^6	LN_2	50	$5,25 \times 10^5$	80	52,5
					89,1	80,7
					$\pm 5,86/1,86$	$\pm 16,1/5,1$

LN_2 -tečni azot

4.3. CFU-F (Colony Forming Unit-Fibroblast) TEST

Za ispitivanje proliferacije i klonogenog kapaciteta izolovanih MMZ korišćen je standardni *in vitro* test sistem za identifikaciju mezenhimalnih matičnih ćelija, CFU-F test (Slika 9). Nakon 14 dana u kulturama, ćelije iz različitih pasaža produkovale su multiple kolonije različitih veličina (Slika 9a), a u okviru svake kolonije pojedinačne ćelije su imale karakterističnu vretenastu/fibroblastnu morfologiju (Slika 9c).

U našim eksperimentima CFU-F test je optimizovan za kvantifikaciju mezenhimalnih matičnih ćelija u uzorcima ćelija izolovanih iz pulpe mlečnih zuba. U Tabeli 2 prikazana je frekvencija ćelija koje imaju sposobnost stvaranja kolonija u zavisnosti od ukupnog broja razlivenih ćelija, koja se u proseku kretala od oko 8 CFU-F kolonija na 10 zasejanih ćelija, do preko 40 CFU-F kolonija na 100 zasejanih ćelija. Utvrđena linearna zavisnost između broja razlivenih ćelija i broja rezultirajućih CFU-F kolonija ukazuje na pouzdanost određivanja broja CFU-F u primenjenom opsegu koncentracija ćelija. Međutim, ukoliko se posmatra efikasnost stvaranja kolonija, definisana kao procenat CFU-F izvedenih kolonija na 100 zasejanih ćelija, klonogeni potencijal MMZ bio je daleko viši i izraženiji kada su ćelije zasejavane u niskim koncentracijama po jedinici površine.



Slika 9. CFU-F test. (a) Multiple kolonije nakon 14 dana u kulturi; (b) Klonogene kolonije koje vode poreklo od pojedinačnih ćelija; (c) Pojedinačna kolonija MMZ sa karakterističnim fibroblastnim oblikom ćelija. Uveličanje 2.5x (b) i 4x (c).

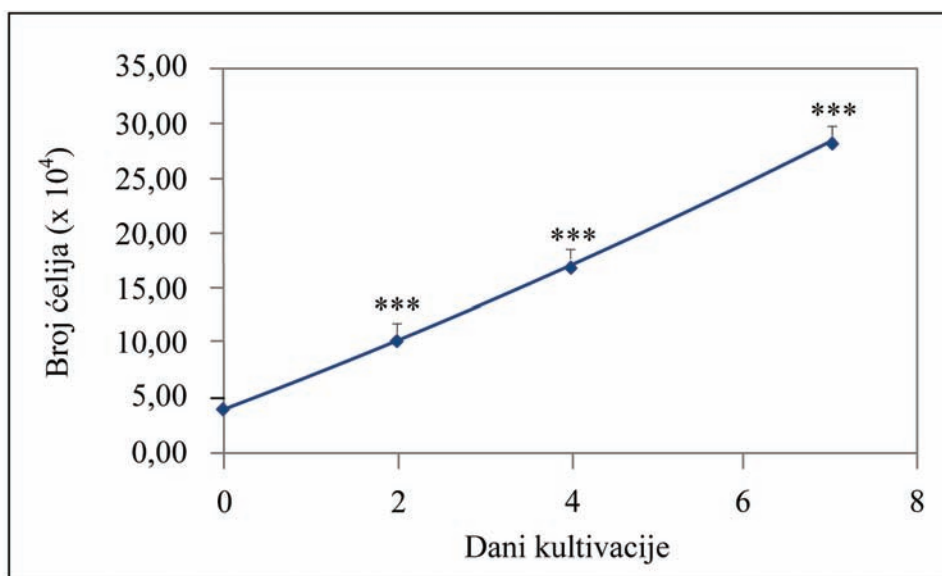
Tabela 2. Zavisnost između broja razlivenih ćelija i broja rezultirajućih CFU-F kolonija.

	Zasejane ćelije		
	10	50	100
Broj CFU-F	8,25 ± 3,22	29,5 ± 4,29	40,25 ± 7,98
% efikasnosti	82,50	59,00	40,25

MMZ su zasejavane u niskim koncentracijama (10, 50 i 100 ćelija/otvoru ploča za kultivaciju) i nakon 14 dana CFU-F kolonije su bojene rastvorom kristal-ljubičastog. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija za tri eksperimenta, od kojih je svaki izveden u duplikatu.

4.4. ODREĐIVANJE PROLIFERATIVNOG KAPACITETA ĆELIJA

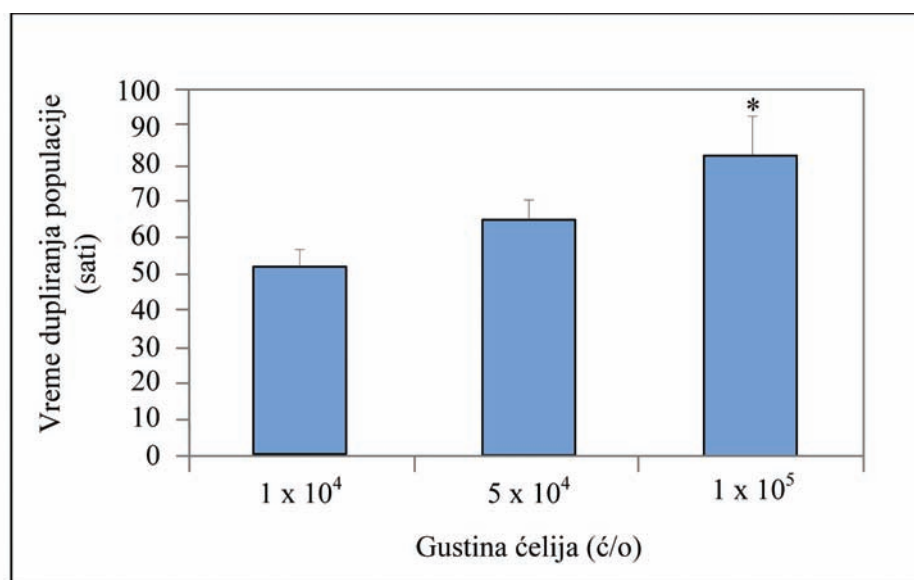
Određivanje proliferacije MMZ u kratkotrajnim kulturama, odnosno određivanje njihovog broja u kulturama do 7. dana inkubacije, ukazalo je na visoki proliferativni kapacitet MMZ ćelija, s obzirom da je već drugog dana inkubacije broj ćelija u kulturama bio dvostruko povećan, dok je sedmog dana inkubacije broj ćelija u kulturama bio i preko šest puta viši u odnosu na početni broj ćelija (Grafikon 1).



Grafikon 1. Određivanje proliferativnog kapaciteta MMZ u kratkotrajnim kulturama. MMZ (4×10^4 /otvoru ploče za kultivaciju) su gajene u standardnom medijumu, a 2., 4. i 7. dana su odlepljene tripsinizacijom i brojane. Urađeno je 5 eksperimenata u duplikatu, a rezultati su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Statistički značajna razlika u odnosu na početni broj ćelija u kulturi prema t-testu: *** $p < 0.001$.

Određivanje proliferativnog kapaciteta ćelija tokom dugotrajnog kultivisanja obuhvatalo je praćenje proliferacije ćelija zasejanih u tri različite koncentracije, 1×10^4 , 5×10^4 i 1×10^5 ćelija/otvoru plastičnih ploča za kulturu tkiva. Ćelije su kultivisane do postizanja konfluentnosti i brojane pri svakoj narednoj pasaži tokom 24 dana.

Prema formuli navedenoj u "Materijalu i metodama" izračunavano je vreme dupliranja populacije. Dobijeni rezultati su pokazali da se vreme dupliranja populacije povećava u toku dugotrajne kulture ćelija, ali i da zavisi od početne koncentracije ćelija u kulturi (Grafikon 2). Naime, tokom datog perioda ćelije zasejane u većoj koncentraciji, 1×10^5 ćelija/otvoru, su imale značajno veće vreme dupliranja populacije (oko 80 sati) u odnosu na ćelije zasejane pri manjoj koncentraciji, 1×10^4 ćelija/otvoru koje su proliferisale znatno brže, jer je njihovo vreme dupliranja populacije bilo oko 50 sati ($p < 0.05$).



Grafikon 2. Određivanje proliferativnog kapaciteta MMZ tokom dugotrajnog kultivisanja. MMZ su kultivisane (1×10^4 , 5×10^4 i 1×10^5 ćelija/otvoru) u standardnom medijumu do postizanja konfluentnosti i brojane pri svakoj narednoj pasaži tokom 24 dana. Vreme dupliranja populacije je računato po formuli predstavljenoj u "Materijalu i metodama". Rezultati su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija za tri eksperimenta urađena u duplikatu. Statistički značajna razlika prema t-testu za vrednosti dobijene u kulturama sa 1×10^5 zasađenih ćelija u odnosu na vrednosti dobijene u kulturama sa 1×10^4 zasađenih ćelija: * $p < 0.05$.

4.5. IMUNOFENOTIPSKE ANALIZE

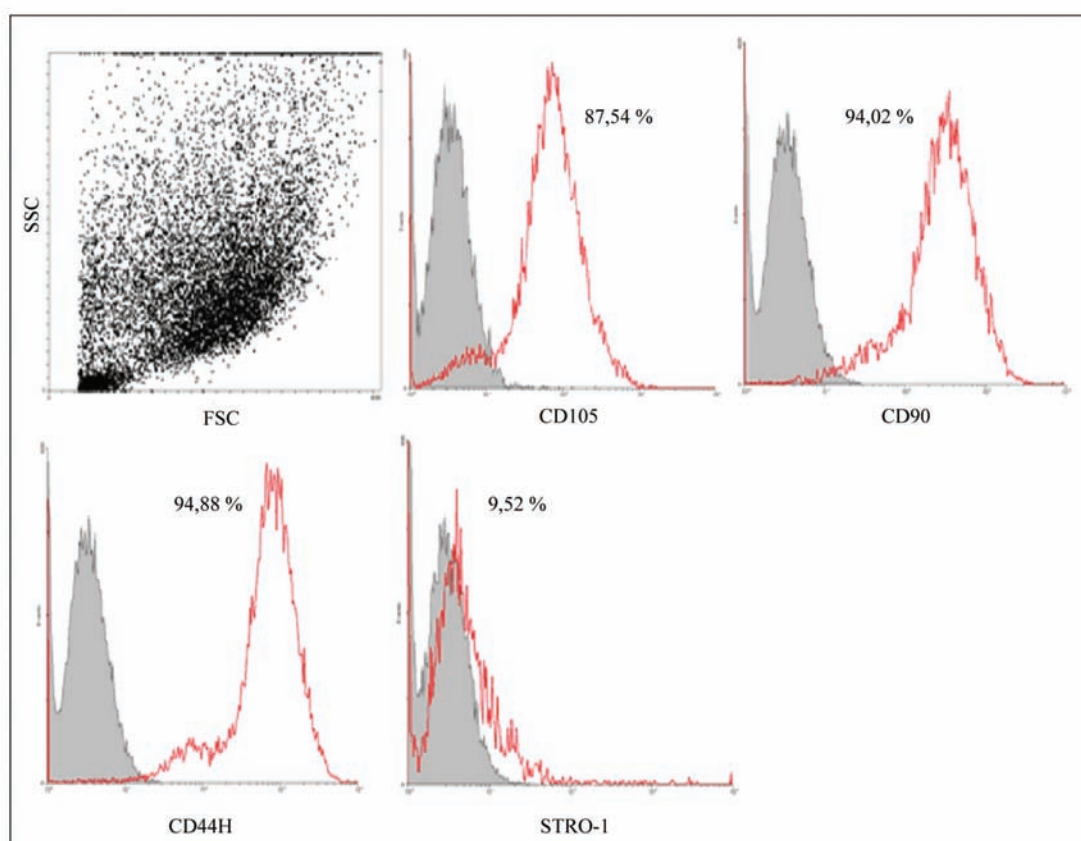
Imunofenotipska karakterizacija mezenhimalnih matičnih ćelija je jedan od tri minimalna kriterijuma predložena od strane ISCT u cilju definisanja ovih ćelija izolovanih iz različitih izvora u različitim laboratorijama. Usled nepostojanja pojedinačnog markera, kao ni grupe markera, koji bi nedvosmisleno definisali MMĆ, ISCT je u cilju uspostavljanja standarda, kako u laboratorijskim, tako i prekliničkim studijama, predložio grupu površinskih antigena, uključujući CD105, CD73, CD90 i CD44, koji se trenutno koriste za karakterizaciju MMĆ. U cilju dobijanja pročišćene populacije MMĆ, kao dodatni kriterijum predloženo je ispitivanje negativne ekspresije hematopoetskih markera koji se najčešće mogu naći u heterogenoj populaciji MMĆ. Polazeći od ovih preporuka, u našim istraživanjima smo ispitivali ekspresiju površinskih i intracelularnih ćelijskih markera imunofluorescentnim bojenjem, a rezultati su očitavani na mikroskopu ili metodom protočne citometrije.

4.5.1. PROTOČNA CITOMETRIJA

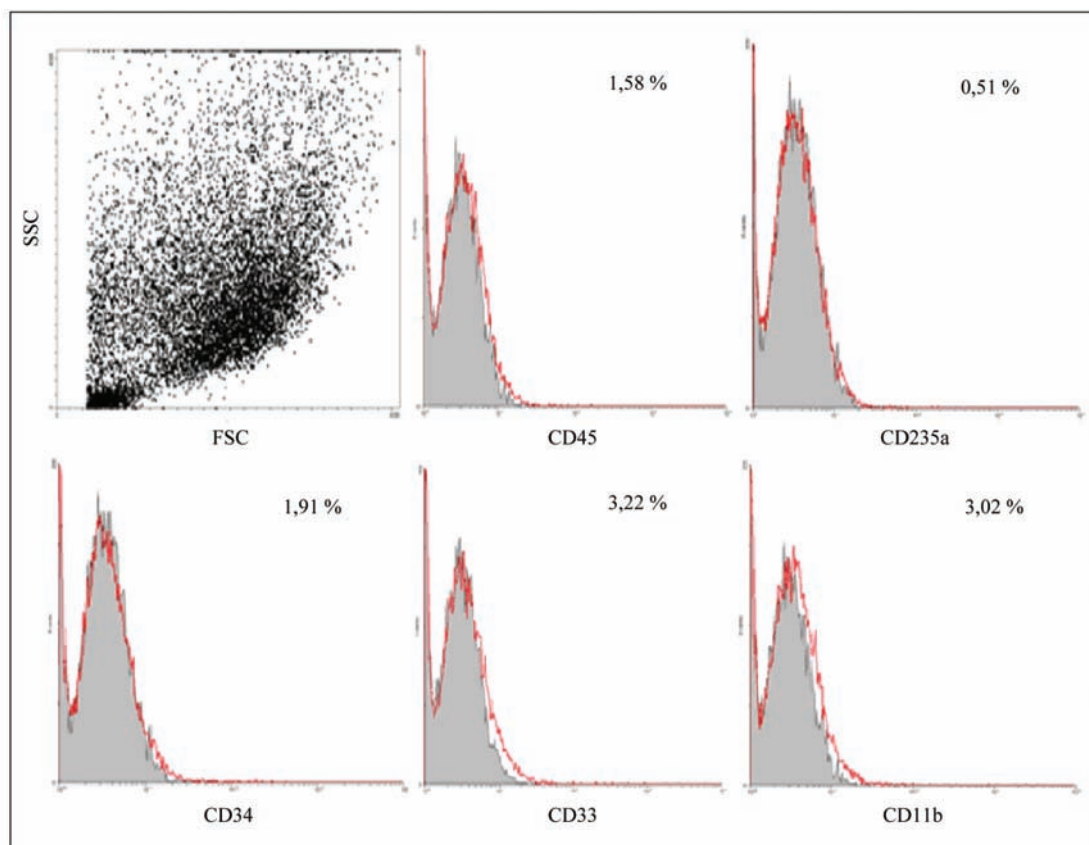
U cilju ispitivanja pozitivne ekspresije površinskih markera MMĆ i odsustva ekspresije markera hematopoetskih ćelija na izolovanim MMZ, korišćen je test direktne imunofluorescencije, a rezultati očitavani protočnom citometrijom. Naime, MMZ iz pasaža P3 i P6 inkubirane su sa monoklonskim antitelima specifičnim za markere humanih mezenhimalnih i hematopoetskih ćelija. Jedan od površinskih markera predložen od strane ISCT za identifikaciju MMĆ je CD105, poznat kao endoglin. Ovaj membranski glikoprotein može biti ekspimiran i na endotelnim ćelijama, zatim na aktiviranim makrofagima, fibroblastima i glatko mišićnim ćelijama. Rezultati dobijeni u našim eksperimentima pokazali su da MMZ ekspimiraju ovaj antigen u opsegu od 55% do 87% ćelija (Slika 9). Drugi marker predložen od strane ISCT za identifikaciju MMĆ je CD90, poznat kao Thy-1, koji igra važnu ulogu u razvoju i funkcionisanju nervnog

sistema, a mogu ga eksprimirati stromalne i fibroblastne ćelijske linije, aktivirani endotel, kao i tumorske ćelije limfoidnog i nervnog porekla. Rezultati dobijeni analizom ekspresije ovog markera pokazali su da je u populaciji izolovanih MMZ zastupljeno 80% do 94% CD90 pozitivnih ćelija (Slika 9). Kao treći pozitivan stromalni marker analiziran je CD44 koji inače ima ulogu u međućelijskim interakcijama, ćelijskoj adheziji i migraciji. Rezultati dobijeni u sklopu ove teze pokazali su da je CD44 eksprimiran na 88% do 95% MMZ ćelija. Pored toga, u našim eksperimentima ispitana je i ekspresija još jednog pozitivnog stromalnog markera, STRO-1, koji se često koristi za dobijanje prečišćene populacije MMĆ iz kostne srži. U ovim ispitivanjima utvrđeno je da oko 10% izolovanih MMZ eksprimira STRO-1 (Slika 9).

Sledeći preporuke ISCT, ispitana je i ekspresija markera karakterističnih za hematopoetske ćelije kako bi isključili mogućnost prisustva hematopoetskih ćelija u heterogenoj populaciji izolovanih MMZ. Stoga smo analizirali ekspresiju CD34, antigena hematopoetskih progenitorskih ćelija, i u našim eksperimentima utvrdili da je u populaciji izolovanih MMZ svega 1.7% do 1.9% ćelija CD34 pozitivno (Slika 10). CD11b ili integrin alfa M, eksprimiran je na leukocitima, uključujući monocite, granulocite, makrofage, kao i na prirodnim ćelijama ubicama, a u sklopu ove teze u analiziranim uzorcima MMZ pokazano je da samo 1.1% do 3% ćelija eksprimira ovaj antigen. Pored toga, ispitivana je i ekspresija CD33, ili Siglec-3, transmembranskog receptora eksprimiranog na ćelijama mijeloidne linije, za koji je u našim eksperimentima utvrđeno da je eksprimiran na 0.4% do 3.2% MMZ. Analizom ekspresije CD45 markera, uobičajenog leukocitnog antigena, u uzorcima izolovanih MMZ pokazano je prisustvo 0.2% do 1.6% CD45+ ćelija. Osim toga, za CD235a ili glikoforin A, koji predstavlja glikoprotein membrane eritrocita, u našim eksperimentima utvrđeno je da se ovaj antigen eksprimira na samo 0.5% do 0.7% MMZ ćelija (Slika 10). Na osnovu analize ekspresije površinskih antigena i pokazane pozitivne ekspresije stromalnih markera, CD105, CD90, CD44 i STRO-1, te odsustva ekspresije hematopoetskih markera CD34, CD11b, CD33, CD45 i CD235, može se zaključiti da izolovane MMZ u pogledu imunofenotipskih karakteristika ispunjavaju kriterijume da bi se definisale kao MMĆ.



Slika 9. Pozitivna ekspresija stromalnih markera na MMZ. Protočnom citometrijom analizirana je ekspresija CD105, CD90, CD44, i STRO-1 na MMZ iz pasaže P6 nakon inkubacije sa odgovarajućim specifičnim antitelima konjugovanim sa FITC ili PE. Prikazani su reprezentativni histogrami fluorescencije. Sivo ispunjeni histogrami predstavljaju nespecifičnu fluorescenciju za bojenje kontrolnim izotipskim antitelima, a prazni, crveni histogramski plotovi prikazuju fluorescenciju za navedene ćelijske površinske antigene.

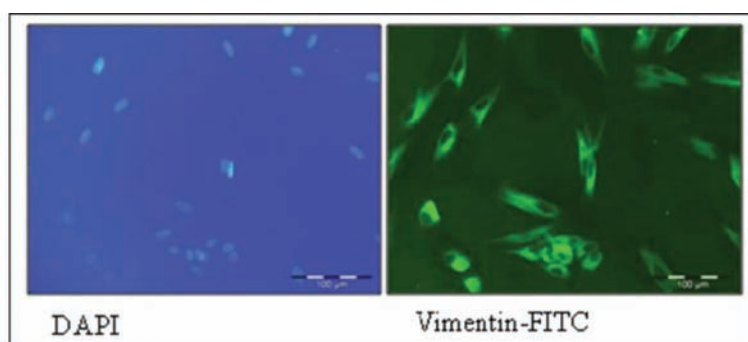


Slika 10. Negativna ekspresija hematopoetskih markera na MMZ. Protočnom citometrijom analizirana je ekspresija CD45, CD235a, CD34, CD33, i CD11b, na MMZ iz pasaže P6 nakon inkubacije sa odgovarajućim specifičnim antitelima konjugovanim sa FITC ili PE. Prikazani su reprezentativni histogrami fluorescencije. Sivo ispunjeni histogrami predstavljaju nespecifičnu fluorescenciju za bojenje kontrolnim izotipskim antitelima, a prazni, crveni histogramski plotovi prikazuju fluorescenciju za navedene ćelijske površinske antigene.

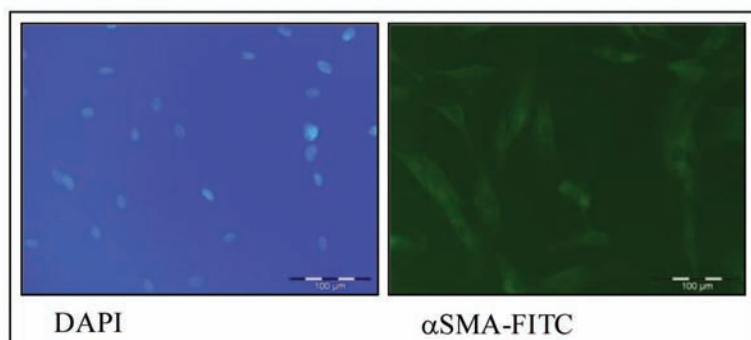
4.5.2 IMUNOFLUOROSCENTNO BOJENJE

U cilju kompletnije fenotipske karakterizacije MMZ, sledeći preporuke ISCT za ispitivanje što većeg broja markera MMĆ, u našim eksperimentima smo ispitali ekspresiju intracelularnih markera u populaciji izolovanih MMZ. Vimentin ima ulogu u citoskeletnoj organizaciji i ćelijskoj morfologiji i koristi se kao specifični marker

MMĆ, dok α -SMA učestvuje u ćelijskoj pokretljivosti, strukturi i integritetu. Za njihovu vizuelizaciju korišćeno je indirektno imunofluorescentno bojenje sa mišjim anti-vimentin i mišjim anti- α -SMA antitelom i anti-mišjim FITC sekundarnim antitelom (zeleno), dok su sva jedra bojena pomoću DAPI (plavo). Na osnovu rezultata dobijenih u sklopu ove teze dokazana je pozitivna ekspresija oba analizirana intracelularna proteina, kako vimentina (Slika 11a), tako i α -SMA (Slika 11b) u izolovanim MMZ, što dodatno potvrđuje da njihove imunofenotipske karakteristike odgovaraju odlikama MMĆ.



a)



b)

Slika 11. Imunofluorescentno bojenje MMZ za vimentin (a) i α -SMA (b). Pozitivno citoplazmatsko bojenje intracelularnih markera MMĆ indirektnom fluorescencijom pomoću mišjih anti-vimentin i mišjih anti- α -SMA antitela, kao i anti-mišjih FITC sekundarnih antitela (zeleno). Jedra su bojena pomoću DAPI (plavo). Za analizu bojenja je korišćen imunofluorescentni mikroskop (400x uvećanje).

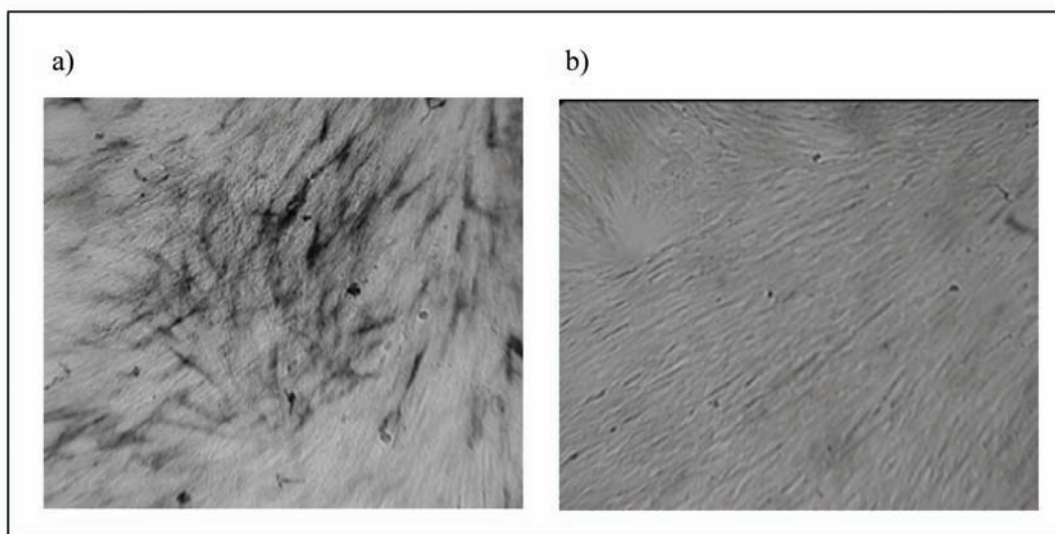
4.6. IN VITRO DIFERENCIJACIJA MMZ

Multipotentni potencijal diferencijacije MMĆ je biološko svojstvo koje na jedinstven način karakteriše ove ćelije, pa je stoga njegovo određivanje takođe jedan od neophodnih kriterijuma definisanja ovih ćelija izolovanih iz različitih izvora u različitim laboratorijama. Uprkos mnogim pokušajima za karakterizaciju MMĆ pomoću imunofenotipskih analiza, njihova sposobnost diferencijacije u osteocite, hondrocite i adipocite, ćelije tri različita tipa vezivnih tkiva (koštanog, hrskavičavog i masnog), predstavlja funkcionalnu osobinu koja potvrđuje njihovu multipotentnost i nedvosmisleno pravi razliku između MMĆ i ćelija koje imaju sposobnost diferencijacije u pravcu samo jedne ćelijske loze.

Koristeći preporuke ISCT, u našim istraživanjima za ispitivanje diferencijacionog potencijala MMZ korišćene su ćelije dobijene nakon pasaže P3 koje su usmeravane da diferentuju u pravcu osteogenih, hondrogenih, adipogenih i miogenih ćelija uz pomoć odgovarajućih indukcionih medijuma za kultivaciju. Kao potvrdu diferencijacije, korišćene su citohemijske analize.

4.6.1. IN VITRO OSTEOGENA DIFERENCIJACIJA

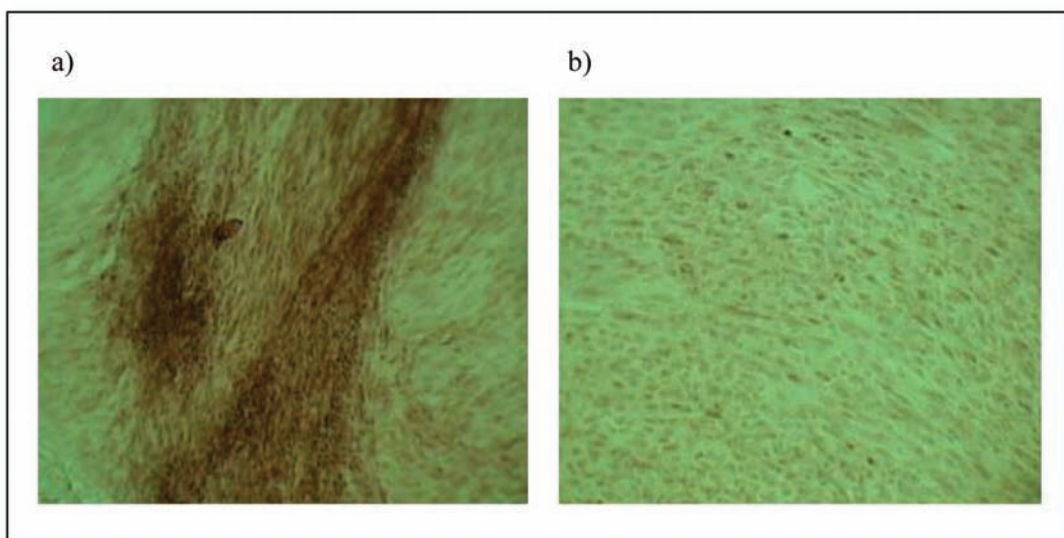
Kapacitet osteogene diferencijacije je ispitivan pomoću detekcije ekspresije alkalne fosfataze koja je karakteristična za ranu fazu osteogeneze. Za indukciju osteogene diferencijacije korišćen je specifičan osteogeni medijum, koji pored FCS i deksametazona, sadrži β -glicerofosfat. Nakon 7 dana kultivisanja pokazano je da je došlo je do znatnog povećanja ekspresije alkalne fosfataze (Slika 12a) u kulturama MMZ gajenim u osteogenom medijumu u odnosu na kontrolu gajenu u standardnom medijumu za ćelijske kulture (Slika 12b). Na taj način dokazano je da MMZ izolovane u eksperimentima izvedenim u sklopu ove teze imaju potencijal da se diferenciraju u osteoblaste, ćelije koštanog tkiva.



Slika 12. Osteogena diferencijacija MMZ. a) MMZ gajene 7 dana u osteogenom medijumu sa β -glicerofosfatom. Alkalna fosfataza u ćelijama je detektovana bojenjem sa BCIP/NBT; b) MMZ gajene 7 dana u standardnom medijumu (kontrola). Prisustvo alkalne fosfataze nije detektovano. Uveličanje 10x (a, b).

4.6.2. *IN VITRO* HONDROGENA DIFERENCIJACIJA

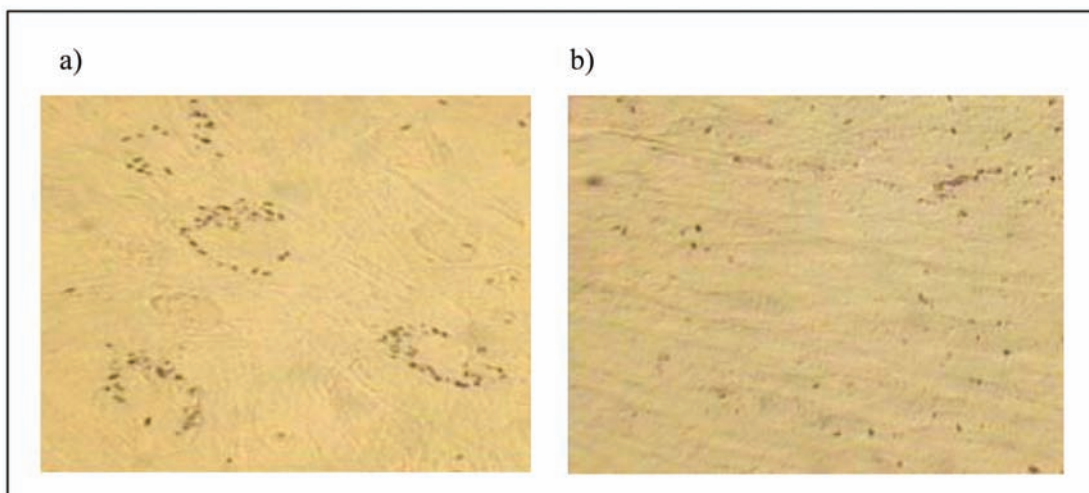
Za ispitivanje kapaciteta hondrogene diferencijacije MMZ su kultivisane 21 dan u specifičnom hondrogenom medijumu koji pored FCS i deksametazona sadrži TGF- β 1. Kapacitet hondrogene diferencijacije ovih ćelija određivan je pomoću detekcije sinteze proteoglikana specifičnih za hrskavičavo tkivo putem bojenja sa Safranin O bojom. Kao što se iz prikazanih rezultata na Slici 13 može uočiti MMZ gajene 21 dan u specifičnom hondrogenom medijumu koji sadrži TGF- β 1 obojile su se bojom Safranin O potvrđujući prisustvo proteoglikana (Slika 13a), dok u kontroli istim bojenjem nije detektovano prisustvo proteoglikana (Slika 13b). Na osnovu ovih rezultata zaključeno je da analizirane MMZ pored potencijala za diferencijaciju u ćelije koštanog tkiva mogu da se diferenciraju i u hondroците, ćelije hrskavičavog vezivnog tkiva.



Slika 13. Hondrogena diferencijacija MMZ. a) MMZ gajene 21 dan u hondrogenom medijumu sa TGF- β 1. Pozitivno bojenje proteoglikana pomoću Safranin O; b) MMZ gajene 21 dan u standardnom medijumu (kontrola). Prisustvo proteoglikana nije detektovano. Uveličanje 10x (a, b).

4.6.3. *IN VITRO* ADIPOGENA DIFERENCIJACIJA

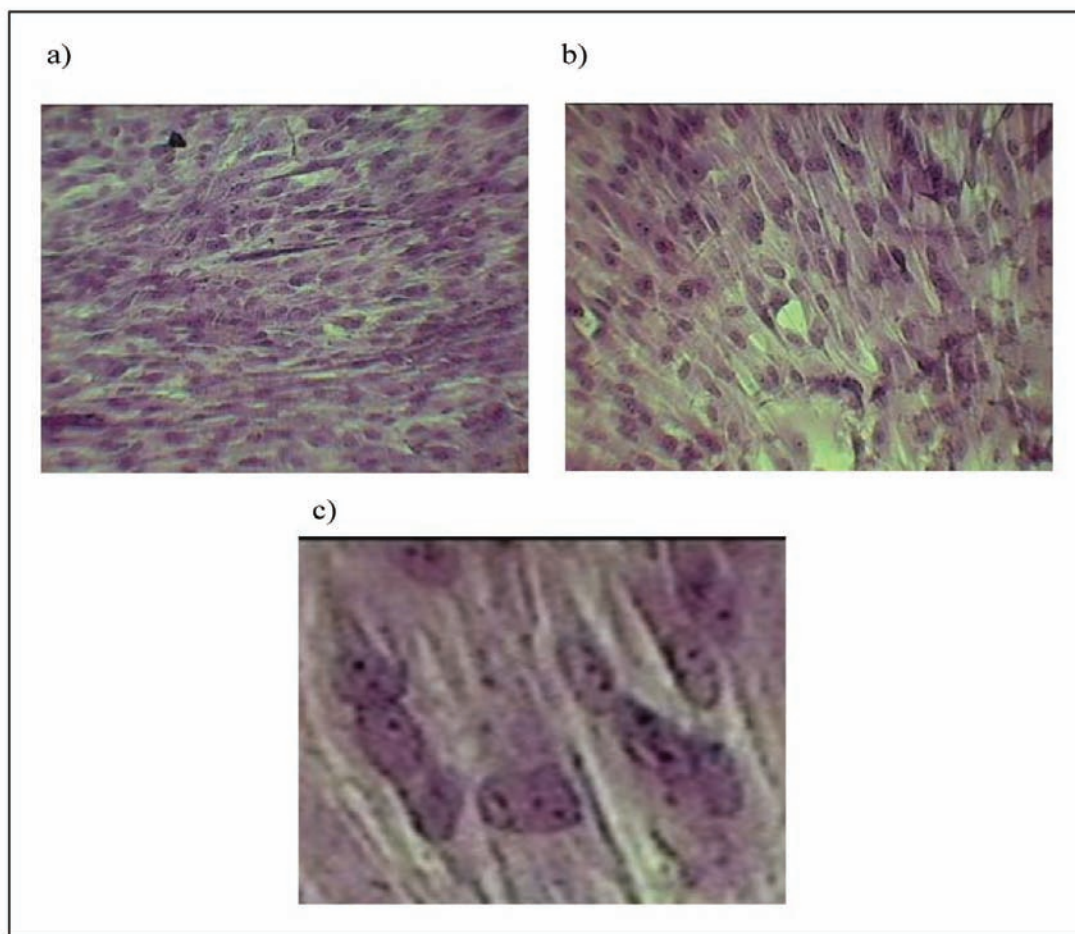
Potencijal MMZ za adipogenu diferencijaciju ispitivan je pomoću detekcije intracelularnih lipidnih vakuola i promene ćelijske morfologije. Za indukciju adipogeneze korišćen je specifičan adipogeni medijum koji pored FCS i deksametazona sadrži izobutil-metilksantin u kojem su ćelije gajene tokom 28 dana. Dobijeni rezultati su pokazali da su MMZ nakon 28 dana inkubacije u specifičnom adipogenom medijumu sa izobutil-metilksantinom promenile svoju morfologiju i poprimile izgled adipocita u čijoj citoplazmi su detektovane lipidne kapi bojenjem pomoću Oil Red O (Slika 14a). S druge strane, u kulturama MMZ gajenim tokom 28 dana u kontrolnom medijumu nisu uočene promene u ćelijskoj morfologiji, niti je detektovano prisustvo lipidnih vakuola (Slika 14b). Dobijeni rezultati ukazali su da analizirane MMZ imaju kapacitet da se diferenciraju i u ćelije masnog tkiva, adipocite.



Slika 14. Adipogena diferencijacija MMZ. a) MMZ gajene 28 dana u adipogenom medijumu sa izobutilmetilksantinom. Pozitivno bojenje lipidnih vakuola pomoću Oil Red O; b) MMZ gajene 28 dana u standardnom medijumu (kontrola). Prisustvo lipidnih vakuola nije detektovano. Uveličanje 20x (a, b).

4.6.4. *IN VITRO* MIOGENA DIFERENCIJACIJA

Kapacitet miogene diferencijacije MMZ u ovom radu je ispitan analizom ćelijske morfologije i detekcije višejedarnih miotubula nakon bojenja kristal violet bojom. Pri tome je za miogenu diferencijaciju upotrebljen odgovarajući miogeni medijum koji pored FCS i deksametazona sadrži konjski serum i hidrokortizon. Rezultati dobijeni u sklopu ove doktorske disertacije potvrdili su i potencijal MMZ za miogenu diferencijaciju s obzirom da je u kulturama ovih ćelija nakon 16 dana inkubacije u miogenom medijumu detektovano formiranje višejedarnih miotubula (Slika 15a i 15c) čije prisustvo nije utvrđeno u kontrolnim kulturama MMZ gajenim u standardnom medijumu (Slika 15b).



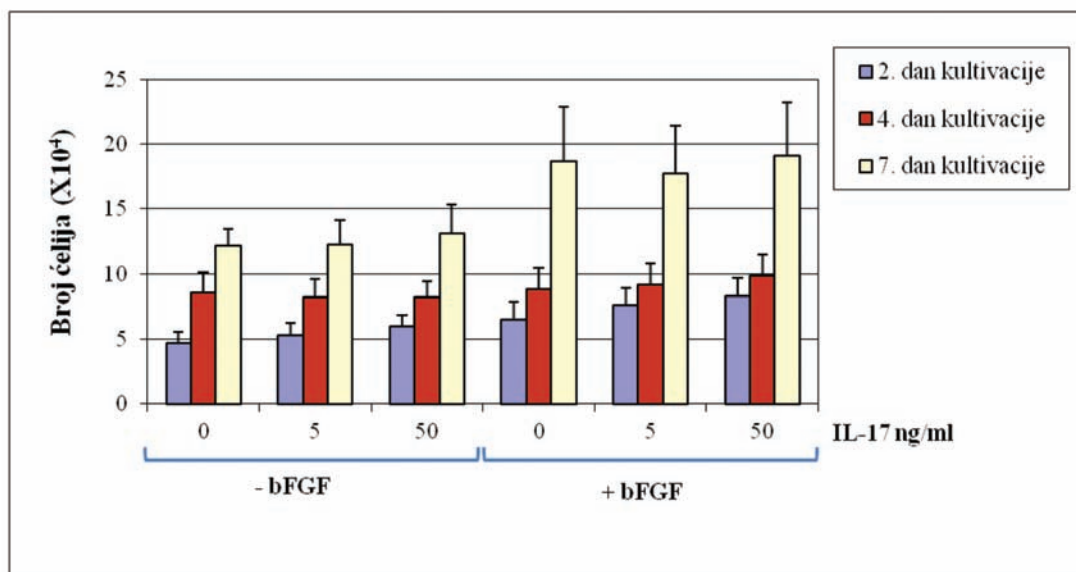
Slika 15. Miogena diferencijacija MMZ. a, c) MMZ gajene 16 dana u miogenom medijumu. Višejedarne miotubule detektovane kristal violet bojenjem; b) MMZ gajene 16 dana u kontrolnom medijumu. Prisustvo višejedarnih miotubula nije detektovano. Uveličanje 10x (a, b) i 40x (c).

4.7. UTICAJ IL-17 i FGF NA PROLIFERACIJU MMZ

Kako je za terapijsku primenu potrebno umnožavanje inicijalno malog broja mezenhimalnih matičnih ćelija dobijenih iz pulpe mlečnih zuba, optimiziranje uslova kultivisanja je bio jedan od ciljeva ovog istraživanja. U prethodnim eksperimentima smo pokazali da MMZ poseduju visok proliferativni potencijal kako tokom kratkotrajnog tako i tokom dugotrajnog kultivisanja. Poznato je da IL-17 i bFGF učestvuju u regulaciji

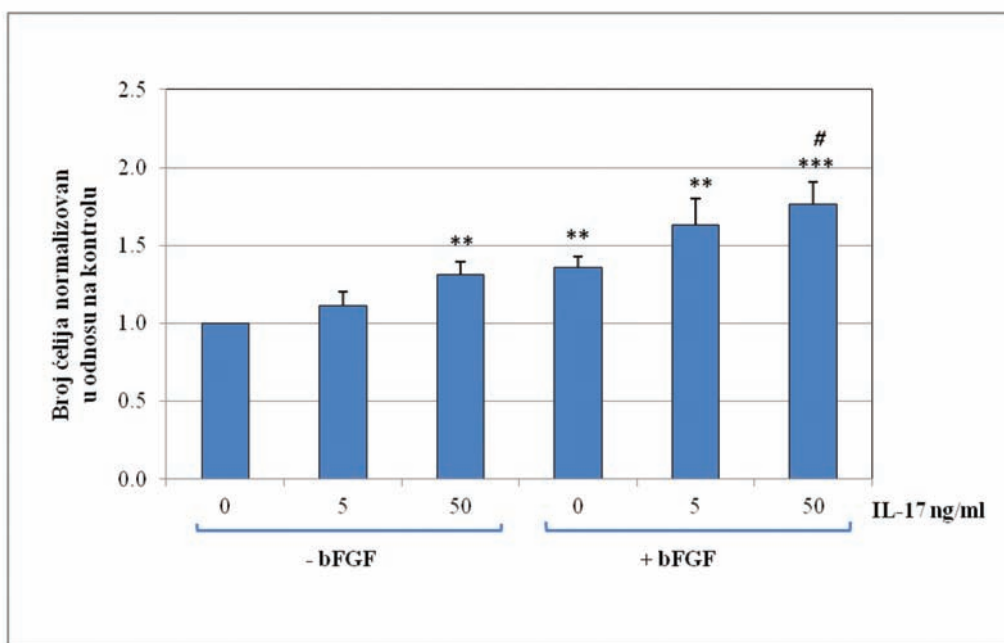
proliferacije različitih tipova ćelija, uključujući i stromalne matične ćelije. Polazeći od ove činjenice, pretpostavili smo da bi sličan efekat mogli da imaju i na proliferaciju MMZ.

U ovom radu ispitani su pojedinačni efekti bFGF (1 ng/ml) i različitih koncentracija IL-17 (5 ili 50 ng/ml), kao i njihovo kombinovano dejstvo na rast MMZ tokom kratkotrajnog kultivisanja, pri čemu su ćelije brojane nakon 2, 4 i 7 dana (Grafikon 3), dok su kontrolu predstavljale ćelije kultivisane bez bFGF i IL-17. Dobijeni rezultati su pokazali da pojedinačno primenjeni bFGF i IL-17 ispoljavaju stimulatorni efekat na rast MMZ. Pri tome je utvrđeno da bFGF indukuje porast broja MMZ, u odnosu na njihov broj u kontrolama inkubiranim bez bFGF i IL-17, za 38% drugog dana, odnosno za 54% sedmog dana kultivacije. S druge strane, u poređenju sa ovim efektom bFGF, stimulatorni efekat IL-17 na proliferaciju MMZ je bio slabiji, imajući u vidu da je povećanje broja MMZ indukovano sa 50 ng/ml IL-17 u odnosu na kontrolu iznosilo 26% drugog dana, odnosno 8% sedmog dana kultivacije. Međutim, najveći porast broja ćelija pokazan je u kulturama MMZ gajenim u prisustvu oba biološki aktivna molekula, bFGF i IL-17, pri čemu je kombinacija bFGF i veće koncentracije IL-17 (50 ng/ml) ispoljila najjači stimulatorni efekat na proliferaciju MMZ. Naime, dok je bFGF u prisustvu 5 ng/ml IL-17 doveo do povećanja broja MMZ za 61% drugog dana kultivacije, a sedmog dana za 46% u odnosu na kontrolu gajenu bez bFGF i IL-17, kombinacija bFGF i 50 ng/ml IL-17 indukovala je porast broja MMZ u odnosu na kontrolu za 76% drugog dana, a za 57% sedmog dana kultivacije. Pored toga, u ovim eksperimentima je pokazano da bFGF u kombinaciji sa IL-17 stimuliše proliferaciju MMZ u većoj meri nego kada se primeni sam. Na to su ukazali dobijeni podaci da je nakon 2 dana inkubacije sa bFGF i 5 ng/ml IL-17 detektovano povećanje broja MMZ za 17% u odnosu na kontrolu kultivisanu samo sa bFGF, dok je za isti vremenski interval utvrđeno da bFGF i 50 ng/ml IL-17 dovode do povećanja broja MMZ za 27% u odnosu na kontrolu inkubiranu samo sa bFGF.



Grafikon 3. Efekat IL-17 i bFGF na rast MMZ. MMZ (1×10^4) su inkubirane u odsustvu ili prisustvu IL-17 (5 ili 50ng/ml) u kombinaciji bez ili sa bFGF (1ng/ml) tokom 2, 4 i 7 dana. Rezultati su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija za tri eksperimenta urađena u duplikatu.

Pošto su razlike u broju ćelija između eksperimentalnih grupa najjasnije 2. dana kultivacije, za ove podatke je urađena normalizacija broja ćelija u odnosu na broj ćelija u kontroli (kultivisanoj bez IL17 i bFGF) za svaki od eksperimenata (Grafikon 4). Iz ovako prikazanih rezultata utvrđeno je da nakon 2 dana inkubacije sam IL-17 (50 ng/ml), kao i sam bFGF, dovode do statistički značajnog povećanja broja MMZ za 30% do 35% u odnosu na kontrolu inkubiranu u odsustvu ovih faktora (**p<0.01). Pored toga, pokazana je i statistička značajnost za povećanje broja MMZ u kulturama inkubiranim 2 dana u istovremenom prisustvu bFGF i IL-17 (5 i 50ng/ml) u odnosu na kontrolu kultivisanu bez ovih faktora (**p<0.01 i ***p<0.001), kao i za porast broja MMZ indukovano dejstvom bFGF u kombinaciji sa 50 ng/ml IL-17 u odnosu na povećanje broja MMZ indukovano samo sa bFGF (#p<0.05).



Grafikon 4. Uticaj IL-17 i bFGF na proliferaciju MMZ nakon dvodnevne kultivacije. MMZ (1×10^4) su inkubirane u odsustvu ili prisustvu IL-17 (5 ili 50ng/ml) u kombinaciji bez ili sa bFGF (1ng/ml) tokom 2 dana. Rezultati su normalizovani u odnosu na vrednosti dobijene za kontrolu kultivisanu bez IL-17 i bFGF i prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija za tri eksperimenta urađena u duplikatu. Prosečan broj ćelija u kontroli iznosio je 4.75 ± 0.83 . Statistički značajna razlika prema t-testu: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ u odnosu na kontrolu kultivisanu u odsustvu IL-17 i bFGF; # $p < 0.05$ u odnosu na kulture kultivisane samo sa bFGF i bez IL-17.

5. DISKUSIJA

Ispitivanja adultnih mezenhimalnih matičnih ćelija i njihova karakteristika da uz odgovarajuću stimulaciju njihov multipotentni potencijal diferencijacije prevazilazi tkiva mezodermalnog porekla podstakla su intenzivna istraživanja usmerena ka potencijalnoj primeni u ćelijskoj terapiji, regenerativnoj medicini i inženjeringu tkiva. Dodatne karakteristike ovih ćelija, uključujući široku rasprostranjenost u različitim vezivnim tkivima organizma, lakoća sa kojom se mogu prikupiti, kao i relativna jednostavnost procedura kultivacije i ex vivo ekspanzije ovih ćelija, ukazale su da MMĆ mogu biti najpristupačniji, a po potrebi i autologi, izvor matičnih ćelija za ćelijsku terapiju. Takođe adultne matične ćelije najlakše zadovoljavaju zakonsku i proizvodnu regulativu, kojom se uređuju pitanja kao što su bezbednost njihovog korišćenja, sterilnost, način čuvanja i transporta, kontrola kvaliteta i mogućnost uvećanja procesa. Međutim, ispitivanja različitih izvora ovih ćelija pokazala su da se MMĆ izolovane iz različitih adultnih tkiva razlikuju kako prema broju ćelija koje se mogu iz njih izolovati, tako i prema invazivnosti metode izolacije i etičke opravdanosti procedure. Zbog toga su sve više u centru pažnje našla tkiva koja se odbacuju nakon medicinskih procedura i do kojih se može doći bez ugrožavanja zdravlja donora. Tako su u fokus istraživanja u ovoj oblasti dospela i različita dentalna tkiva i do sada su opisane matične ćelije izolovane iz pulpe stalnih zuba, pulpe mlečnih zuba, periodoncijuma, apikalne papile i dentalnog folikula. Međutim, imajući u vidu činjenicu da matične ćelije predstavljaju heterogene ćelijske populacije, koje sadrže opredeljene matične ćelije različitog stepena zrelosti i različitog potencijala diferencijacije, neophodno je identifikovati i okarakterisati svaku izolovanu populaciju ćelija. Istraživanja obuhvaćena ovom disertacijom imala su za cilj izolovanje, identifikaciju i karakterizaciju multipotentnih mezenhimalnih matičnih ćelija poreklom iz pulpe mlečnih zuba i dobijeni rezultati su potvrdili da pulpa mlečnih zuba sadrži klonogene, visoko proliferativne ćelije koje ispoljavaju multipotentni

potencijal diferencijacije. S obzirom da još uvek nije definisan jedinstven protokol, niti univerzalni fenotipski test kojim se može pokazati da su ćelije izolovane iz različitih tkiva upravo mezenhimalne matične ćelije, a u pokušaju da se uvedu jedinstvena pravila za karakterizaciju MMC, 2006. godine, Internacionalno društvo za ćelijsku terapiju predložilo je tri minimalna kriterijuma za definisanje MMC (Dominici i sar., 2006). To su: osobina adheriranja za plastičnu podlogu očuvana tokom standardnih uslova kultivacije ćelija u posudama za ćelijske kulture u standardnom medijumu za kultivisanje; specifična ekspresija površinskih antigena i to pozitivna ekspresija mezenhimalnih markera i negativna ekspresija markera hematopoetskih ćelija; potencijal za multipotentnu diferencijaciju u pravcu osteogene, adipogene i hondrogene loze ćelija pod standardnim uslovima za diferencijaciju *in vitro*.

Za izolaciju matičnih ćelija iz pulpe mlečnih zuba u ovom radu korišćen je metod enzimske digestije, koji se zasniva na dejstvu enzima kolagenaze na sterilno ekstrahovano tkivo pulpe, pri čemu se dobijaju jednoćelijske suspenzije koje se nakon toga kultivišu u odgovarajućem medijumu. Naša istraživanja su pokazala da je u cilju dobijanja dovoljnog broja ćelija iz pulpe mlečnih zuba, neophodno izvršiti selekciju zuba pogodnih za izolovanje matičnih ćelija. Naime, pokazano je da zubi koji se potpuno luksiraju nisu odgovarajući izvor, s obzirom da je u njima vitalnost preostalog tkiva pulpe i ćelija ugrožen. Optimalan izvor matičnih ćelija predstavljaju sekutići i očnjaci kod kojih je prisutna blaga luksacija. Pored toga, pokazano je i da boja pulpnog tkiva nakon ekstrakcije zuba može da ukaže na vitalnost pulpe i ćelija, tako da kod crvene boje, uz prisustvo krvarenja, treba očekivati dovoljan broj ćelija, dok siva boja pulpe ukazuje na smanjeni vijabilitet ćelija, jer u gotovo svim slučajevima iz takvih zuba nije bilo moguće dobiti dovoljan broj vitalnih ćelija za dalja ispitivanja.

Metoda izolovanja mezenhimalnih matičnih ćelija pomoću enzimske digestije tkiva zasniva se na primeni enzima, najčešće kolagenaze i tripsina, za razgradnju vezivnog tkiva iz koga će se osloboditi ćelije. Prema našim rezultatima, a i literaturnim podacima (Gronthos i sar., 2000; Batouli i sar., 2003), ovom metodom se uspešno izoluju

matične ćelije i iz pulpe stalnih zuba. Pored ove metode za izolovanje matičnih ćelija iz različitih tkiva, pa i zubne pulpe, koristi se i metoda eksplanta, za koju se izolovano tkivo prvo usitni, a zatim postavi u posudu za kulturu ćelija u standardnom medijumu. Ćelije, nakon nekoliko dana, migriraju iz tkiva i počinju da se lepe za podlogu suda, gde nastavljaju sa proliferacijom. Kada dovoljan broj ćelija „napusti“ tkivo i naseli posudu, tkivo se uklanja a ćelije se dalje kultivišu. Istraživanja su pokazala da se korišćenjem i ove metode mogu izolovati i dobiti pojedinačne ćelije pulpe, koje su imale sposobnost da uspešno diferentuju u ćelije slične odontoblastima koje su sintetisale tkivo slično dentinu (About i sar., 2000; Couble i sar., 2000). Prednost metode eksplanta bi mogla biti u jednostavnijem izvođenju, a njen nedostatak je duži vremenski interval do uspostavljanja primarne kulture i dobijanja dovoljnog broja ćelija za dalju analizu. Metod enzimske digestije je složeniji za izvodjenje i zbog delovanja enzima na tkivo neminovan je i izvestan stepen oštećenja ćelija. Medjutim, ovim metodom omogućeno je izolovanje gotovo svih ćelija pulpe i brže dostizanje optimalnog broja ćelija u primarnoj kulturi (Huang i sar., 2006).

Nakon zasejavanja ćelija dobijenih nakon enzimske digestije pulpe mlečnih zuba, tokom njihovog kultivisanja u primarnoj kulturi, kao i tokom sledećih postupaka pasažiranja, praćeni su kako njihova morfologija, tako i osobina adheriranja za plastičnu podlogu, kao jedna od neophodnih osobina propisanih od strane ISCT-a za karakterizaciju MMĆ. Ćelije su i tokom dugotrajnog kultivisanja, i nakon više od 10 pasaža, očuvale fibroblastnu morofologiju i nepromenjenu sposobnost adhezije.

Jedan od osnovnih preduslova za kliničku aplikaciju matičnih ćelija je i postojanje protokola za uspešnu krioprezervaciju i čuvanje ovih ćelija, kako bi se nakon uspostavljanja kliničkih terapija mogle uspešno primeniti. Krioprezervacija ćelija iz krvi pupčanika i odgovarajuće banke matičnih ćelija su organizovane i poznate širom sveta. Kako mezenhimalne matične ćelije iz pulpe zuba predstavljaju jedan od najdostupnijih izvora matičnih ćelija i krioprezervacija ovih ćelija je sve češća. Medjutim, u dosadašnjoj stručnoj literaturi nema mnogo podataka o ponašanju ovih ćelija nakon krioprezervacije,

pa smo za cilj u našem istraživanju postavili ispitivanje vijabiliteta ćelija iz pulpe mlečnih zuba posle odleđivanja. Takođe, pratili smo da li postoje razlike u vijabilitetu nakon odleđivanja ćelija koje potiču iz različitih pasaža. Naši rezultati su pokazali da se MMZ mogu uspešno čuvati na niskim temperaturama, jer su i vijabilnost i oporavak odmrznutih ćelija u svim ispitivanim slučajevima bili u zadovoljavajućim granicama, pri čemu broj pasaže nije imao uticaj na ove parametre. Za potencijalnu kliničku primenu, a samim tim i za čuvanje ćelija u bankama za krioprezervaciju, potrebno je, po današnjim merilima, između milion do dva miliona ćelija (Arora i sar., 2009), što se ne može obezbediti samo izolovanjem matičnih ćelija iz mlečnih zuba, s obzirom da je zastupljenost MMZ u zubima mala, nekoliko desetina ili manje mezenhimalnih matičnih ćelija (Miura i sar., 2003), a takodje se broj razlikuje od zuba do zuba, u zavisnosti od stepena resorpcije mlečnih korenova. Za dobijanje optimalnog broja ćelija za krioprezervaciju, MMZ se moraju umnožiti u kulturama, tako da je izuzetno bilo važno utvrditi da li pasažiranje utiče na neke od bioloških karakteristika ćelija, koje bi se moglo odraziti na njihov uspešan oporavak. Naši rezultati su pokazali da MMZ imaju izuzetan potencijal deobe, tako da se u kratkom vremenskom periodu u kulturi može postići dovoljan broj za krioprezervaciju, što uz dobar oporavak posle odleđivanja ukazuje da su pogodan izvor za krioprezervaciju mezenhimalnih matičnih ćelija.

U izvođenju eksperimenta korišćene su metode sporog hlađenja i brzog zagrevanja, a kao krioprotektivno sredstvo je korišćen DMSO u koncentraciji od 10% u FBS a dobijeni rezultati su ukazali da su ovi uslovi optimalni za krioprezervaciju, jer obezbeđuju maksimalni oporavak ćelija i ne narušavaju njihov potencijal diferencijacije.

Tokom hlađenja ispod tačke smrzavanja, u ćelijama dolazi do pretvaranja vode u kristale leda i do zaustavljanja svih molekularnih aktivnosti. Povećanje viskoznosti i stvaranje leda unutar ćelija može dovesti do oštećenja i zbog toga je neophodno korišćenje krioprotektanata koji smanjuju količinu leda. U tu svrhu je vršeno ispitivanje mnogih supstanci, a najčešće se koristi DMSO. U studijama koje su ga poredile sa drugim krioprotektivnim agensima, pokazao se kao optimalnije krioprotektivno

sredstvo od etilen glikola i propilen glikola (Woods i sar., 2009). DMSO može imati i toksično dejstvo na ćelije i tkiva, a stepen toksičnosti zavisi od vremena, temperature i primenjene koncentracije. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima drugih istraživača koji su ispitivali stepen preživljavanja matičnih ćelija iz pulpe stalnih zuba (Perry i sar., 2008; Woods i sar., 2009).

Od drugih ćelija dentalnog porekla do sada je ispitivana krioprezervacija kompletne periodontalne membrane, pri čemu je uspostavljanje ćelijskih kultura vršeno nakon odležavanja (Seo i sar., 2005). Utvrđeno je značajno smanjenje broja formiranih kolonija u poređenju sa kontrolom, što je ukazalo de se moraju tražiti drugi načini za prezervaciju ćelija iz periodoncijuma, koje samostalno, ili u kombinaciji sa ćelijama iz pulpe mogu biti upotrebljene u budućim tehnikama regenerativne stomatologije. Ispitivana je i krioprezervacija matičnih ćelija iz apikalne papile i utvrđeno je, kao i za ćelije iz pulpe, da nakon odležavanja one zadržavaju svoje biološke i funkcionalne osobine, tako da se mogu upotrebiti u potencijalnom bioinženjerstvu korena zuba, u čijem razvoju i normalno učestvuju (Ding i sar., 2010). Takođe je pokazano i da podgrupa stromalnih ćelija iz pulpe, osteoblastnih prekursora, nakon odležavanja zadržava sposobnost diferencijacije u osteoblaste uz formiranje kosti *in vitro* i *in vivo*, što je značajan rezultat jer su ovo prve ćelije dentalnog porekla koje su i klinički primenjene na ljudima (Papaccio i sar., 2006).

Iz našeg istraživanja, kao i iz prethodnih radova, se može izvesti zaključak da su MMZ iz pulpe, posebno mlečnih zuba, pogodan izvor za krioprezervaciju matičnih ćelija. Pošto je period smene mlečnih zuba dugačak i traje od šeste do dvanaeste godine života, mogućnost čuvanja MMZ u danas već rastućem broju banaka, za roditelje predstavlja mogućnost dovoljnog vremena za planiranje. Za razliku od drugih izvora kao što je krv i tkivo pupčane vrpce, kod mlečnih zuba postoji mogućnost izolovanja ćelija iz 12 zuba, sekutića i očnjaka, pri čemu za odabir pogodnog trenutka nije zanemarljiva ni finansijska strana. Medjutim, neophodna su i dalja istraživanja u cilju uspostavljanja optimalnih protokola za izbor zuba u odnosu na stepen luksacije, načina dezinfekcije

ekstrahovanih zuba u cilju prevencije infekcije, sredstava za transport do laboratorije (Tarle i sar., 2010), razvoja krioprotektanata bez prisustva animalnih medijuma za kultivisanje, vremena od ekstrakcije do početka ekspanzije ćelija, kao i optimalnih temperatura za krioprezervaciju. Takođe, neophodna su i istraživanja metoda *ex vivo* ekspanzije ovih ćelija. Međutim i dosadašnja saznanja u velikoj meri ukazuju da MMZ predstavljaju jedan od najadekvatnijih izvora za krioprezervaciju adultnih matičnih ćelija u cilju buduće upotrebe u personalizovanoj medicini.

Kao što je već naznačeno, za potencijalnu kliničku primenu mezenhimalnih matičnih ćelija neophodno je i njihovo umnožavanje do optimalnog broja za određenu namenu tako da je određivanje klonogenog potencijala i proliferativnog kapaciteta ćelija izuzetno važno u cilju odabira ćelija.

Kako je jedan od faktora koji otežava izolovanje i karakterizaciju mezenhimalnih matičnih ćelija njihova mala zastupljenost, standardni *in vitro* test sistem za identifikaciju i kvantifikaciju mezenhimalnih matičnih ćelija, CFU-F test, je optimizovan za određivanje matičnih ćelija u uzorcima izolovanih iz pulpe mlečnih zuba. Određivanjem linearne zavisnosti između broja različenih ćelija i broja rezultujućih CFU-F kolonija, utvrđen je opseg koncentracija ćelija koji omogućava s jedne strane pouzdanost određivanja broja CFU-F, a s druge strane određivanje efikasnosti stvaranja kolonija. U slučaju ispitivanih MMZ efikasnost stvaranja kolonija, definisana kao procenat CFU-F izvedenih kolonija na 100 zasejanih ćelija, pokazala je da je klonogeni potencijal MMZ bio daleko viši i izraženiji (preko 80%) kada su ćelije zasejavane u niskim koncentracijama po jedinici površine. Visoki klonogeni potencijal je važna karakteristika MMZ ispitivanih u našem radu i u saglasnosti je sa ranije objavljenim podacima o klonogenom potencijalu matičnih ćelija izolovanih iz pulpe i mlečnih i stalnih zuba (Gronthos i sar., 2000; Huang i sar. 2008).

Određivanje proliferativnog kapaciteta MMZ obuhvatilo je ispitivanje kratkotrajnog proliferativnog kapaciteta izolovanih ćelija, kao i određivanje vremena dupliranja populacije tokom dugotrajnog kultivisanja i pokazalo je da pulpa mlečnih zuba sadrži

populaciju matičnih ćelija sa visokim potencijalom proliferacije, s obzirom da je već drugog dana inkubacije broj ćelija u kulturama bio dvostruko povećan, dok je sedmog dana inkubacije broj ćelija u kulturama bio i preko šest puta viši u odnosu na početni broj ćelija. Ova osobina je posebno značajna, jer se u primarnim kulturama dobijenim neposredno nakon izolovanja tkiva pulpe dobija mali broj MMZ. Praćenje proliferativnog kapaciteta ćelija tokom dugotrajnog kultivisanja omogućilo je sagledavanje očuvanosti proliferativne sposobnosti ćelija tokom višekratnih pasaža, izračunavanje vremena dupliranja populacije, kao i određivanje zavisnosti vremena dupliranja od početne koncentracije ćelija u kulturi. Dobijeni rezultati su pokazali da je visoki proliferativni kapacitet MMZ očuvan tokom dugotrajne kultivacije i ekspanzije, da se vreme dupliranja populacije povećava u toku dugotrajne kulture ćelija, ali i da zavisi od početne koncentracije ćelija u kulturi. Ovi nalazi su u saglasnosti sa rezultatima drugih autora koji su kultivisali ćelije dobijene iz stalnih zuba (Gronthos i sar., 2000; Suchanek i sar., 2007), pri čemu nije dolazilo do spontane diferencijacije i bilo kakvih znakova degeneracije, što su potvrdili i rezultati našeg rada. Od samog otkrivanja mezenhimalnih matičnih ćelija u pulpi stalnih zuba utvrđeno je da one poseduju visok potencijal proliferacije, koji je veći od potencijala proliferacije MMC izolovanih iz kostne srži (Gronthos i sar., 2000), što je tada objašnjeno nezrelošću ćelija iz pulpe umnjaka, jer su to zubi koji se poslednji razvijaju i shodno tome je pretpostavljeno da su MMC prisutne u njima primitivnije od onih u kostnoj srži. Kasnije otkrićem MMC u pulpi mlečnih zuba, ustanovljeno je da one imaju još viši proliferacioni potencijal, što je takodje tumačeno nezrelošću mlečnih zuba i ćelija u njihovoj pulpi (Miura i sar., 2003). Novija istraživanja su ukazala i na značajan uticaj sastava medijuma za kultivisanje na proliferaciju ćelija (Tarle i sar., 2010), jer su po prvi put u literaturi, MMC iz pulpe stalnih zuba imale veći kapacitet proliferacije od MMC iz mlečnih zuba, kada je kultivisanje ćelija rađeno u medijumu optimiziranom za ćelije iz pulpe stalnih zuba (Suchanek i sar., 2010). Određivanjem i poredjenjem genske ekspresije u MMC izolovanih iz kostne srži, stalnih zuba i mlečnih zuba utvrđeno je da MMC iz mlečnih zuba imaju povišenu ekspresiju gena odgovornih za proliferaciju ćelija (Nakamura i sar., 2009).

Odredjivanje fenotipa mezenhimalnih matičnih ćelija, odnosno pozitivna ekspresija specifičnih mezenhimalnih markera i negativna ekspresija markera hematopoetskih ćelija je druga osobina koja je predložena od strane ISCT-a u cilju definisanja MMĆ. U našim istraživanjima za odredjivanje mezenhimalnog karaktera koristili smo specifična antitela na različite antigene, uključujući CD90 antigen, poznat i kao Thy1, CD44, i CD105, poznat kao endoglin, i pokazali da ispitivane MMZ eksprimiraju ove markere u procentu većem od 90%. Ekspresija ranog mezenhimalnog markera označenog kao STRO-1 bila je pozitivna kod manjeg procenta ćelija, što je saglasno sa radovima drugih autora (Miura i sar., 2003; Coppe i sar., 2009). Takodje, pokazano je i prisustvo intracelularnih markera mezenhimalnih ćelija, α -SMA i vimentina, kao dodatnih indikatora tkiva mezodermalnog porekla.

Da bi se isključilo prisustvo hematopoetskih ćelija u kulturi mezenhimalnih ćelija, kod ispitivanih MMZ pokazana je i negativna ekspresija markera karakterističnih za ove ćelije. U tu svrhu odredjivana je ekspresija CD11b markera koji karakteriše monocite i makrofage, najčešće hematopoetske ćelije koje se pojavljuju u kulturama mezenhimalnih ćelija; CD45 ili pan-leukocitnog markera; CD34 markera koga eksprimiraju primitivni hematopoetski progenitori; CD33 markera ćelija mieloidne loze, kao i CD235a markera prisutnog na humanim crvenim krvnim zrnima i eritroidnim prekursorima. Kao što je i očekivano MMZ nisu eksprimirale ove markere. Dobijeni rezultati se u potpunosti slažu sa rezultatima drugih autora koji su odredjivali imunofenotipske karakteristike matičnih ćelija iz pulpe mlečnih zuba (Pivorinus i sar., 2009; Miura i sar., 2003), ali i sa rezultatima dobijenim za mezenhimalne matične ćelije poreklom iz kostne srži (Nakamura i sar., 2009), i adipoznog tkiva (Alipour i sar., 2010). Takodje, pozitivna ekspresija markera karakterističnih za MMĆ i negativna ekspresija hematopoetskih markera MMZ ispitivanih u našem radu ima velike sličnosti sa karakteristikama pokazanim i za druge matične ćelije dentalnog porekla, kao što su ćelije izolovane iz pulpe stalnih zuba (Gronthos i sar., 2000; Ishkitiev i sar., 2010), iz dentalnog folikula (Morsczeck i sar., 2005), apikalne papile (Sonoyama i sar., 2006), periodontalne membrane (Seo i sar.,

2004), natalnih zuba (Karaoz i sar., 2010), prekobrojnih zuba (Huang i sar., 2008).

Medjutim, mora se naglasiti da su sve do sada opisane MMĆ heterogene ćelijske populacije, tako da se različite ćelije razlikuju ne samo po fenotipskim karakteristikama, već i po genskoj ekspresiji i kapacitetu diferencijacije. U pulpi mlečnih i stalnih zuba pokazano je i prisustvo primitivnijih, nezrelih kategorija matičnih ćelija, (Kerkis i sar., 2006) koje su ekspimirale i markere karakteristične za embrionalne matične ćelije, poput Oct4, Nanog, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 i TRA-1-80. Važno je napomenuti da je naknadnom analizom, koja nije obuhvaćena istraživanjima u okviru ove doktorske disertacije, a na određenim populacijama MMZ izolovanim u laboratoriji gde su radjena i naša istraživanja, takodje pokazana pozitivna ekspresija embrionalnih markera, kao što su Nanog (app. 42%), Sox2 (app. 45%) i SSEA4 (app. 24%). Dalja analiza i utvrđivanje stepena opredeljenosti ovih različitih populacija ukazaće i na moguće različite karakteristike između ovih populacija MMZ.

Preduslov bez koga neće biti moguća primena matičnih ćelija u kliničkoj praksi je dobijanje prečišćene ćelijske populacije, potpuno okarakterisane grupom funkcionalnih i fenotipskih markera, sa predvidivim i sigurnim ponašanjem prilikom upotrebe u terapiji (Tarnok i sar., 2010). Tokom proteklih godina različiti fenotipski markeri su ispitivani prilikom karakterizacija matičnih ćelija, uključujući adhezione molekule, antigene specifične za različite ćelijske loze, receptore faktora rasta, receptore citokina i hemokina, proteine koji učestvuju u imunološkim procesima. Međutim, i pored velikog broja analiza i objavljenih radova još uvek nije utvrđen specifičan marker, čak ni grupa markera, koji bi na nesumnjiv način potvrdili i okarakterisali različite tipove matičnih ćelija. Česta poteškoća je i preklapanje u ekspresiji određenih antigena, i smatra se da su neophodna dalja istraživanja u cilju izolacije i identifikacije prečišćenih populacija matičnih ćelija.

Jedan deo objavljenih radova posvećenih matičnim ćelijama izolovanim iz tkiva dentalnog porekla ukazao je da se korišćenjem metode protočne citometrije, a na osnovu ekspresije različitih markera, iz pulpe mlečnih zuba mogu izolovati specifične

subpopulacije matičnih ćelija koje u odnosu na ostatak ćelija imaju potencijal za osteogenu diferencijaciju (Shen i sar., 2010) i stvaranje trodimenzionalnog koštanog tkiva (Laino i sar., 2006; d' Aquino i sar., 2009). U pulpi mlečnih i stalnih zuba pokazano je i prisustvo ćelija sličnih prekursorima endotelnih ćelija, koje kao izdvojena subpopulacija mogu biti od značaja za istraživanja procesa angiogeneze/vaskulogeneze (Iohara i sar., 2006; Iohara i sar., 2008), koji je neophodan za svaku uspešnu sintezu novog tkiva i osnovni je segment regenerativne medicine.

Međutim, mnogobrojni dosadašnji rezultati otvorili su i mnogobrojna nova pitanja, od kojih je jedno neobično značajno - da li su razlike u ekspresiji markera kod ćelija sa istom funkcijom, kao što su mezenhimalne matične ćelije, ali izolovane iz različitih organa u vezi sa organ-specifičnim okruženjem, ili možda sa različitim metodama izolovanja i kultivacije? Takođe, da li način izolovanja utiče i na stepen ekspresije nekog markera (Tarnok i sar., 2010). Bez sumnje, dalja istraživanja ko-ekspresije do sada poznatih, kao i otkriće novih karakterističnih markera matičnih ćelija će biti neophodna u cilju razumevanja karakterizacije matičnih ćelija i njihove kliničke upotrebe.

Iako je kod MMZ karakterisanih u našim istraživanjima utvrđena pozitivna ekspresija tipičnih mezenhimalnih markera, praćena negativnom ekspresijom markera hematopoetskih ćelija, definitivna potvrda da se u pulpi mlečnih zuba nalaze ćelije sa osobinama mezenhimalnih matičnih ćelija bilo je određivanje multipotentnog potencijala diferencijacije. Preporuke predložene od strane ISCT-a, u cilju definisanja MMC predviđaju dokazivanje diferencijacije u pravcu osteogene, adipogene i hondrogene loze. U našem radu, pored sposobnosti izolovanih MMZ, da diferencijacijom *in vitro* daju ćelije ove tri ćelijske loze, pokazana je i njihova sposobnost diferencijacije u mioгене ćelije.

Osteogena diferencijacija MMZ je izvršena kultivacijom u specifičnom medijumu koji je sadržao deksametazon, vitamin C i beta-glicerofosfat, a kao marker rane osteogene diferencijacije korišćena je aktivnost alkalne fosfataze. Prisustvo deksametazona je ključno za povećanje aktivnosti alkalne fosfataze (Gronthos i sar.,

2004), vitamin C je neophodan za preživljavanje osteoblasta u *in vitro* uslovima, a dodatak fosfata medijumu za kultivisanje je neophodan za proces mineralizacije, koja je krajnji dokaz osteogene diferencijacije.

Izolovane MMZ su uspešno diferencirale i u pravcu hondrocita, u specifičnom medijumu za diferencijaciju koji je sadržao i TGF- β faktor, s obzirom da članovi familije TGF- β imaju ključnu ulogu u diferencijaciji MMĆ u pravcu hondrocita i formiranju hrskavice (Lee i sar., 2004). Imajući u vidu izuzetnu dostupnost MMZ i mogućnost diferencijacije u hondrocite, otvara se mogućnost njihove primene u tkivnom inženjerstvu zglobnih struktura oštećenih povredama ili degenerativnim ili zapaljenskim procesima.

U našim istraživanjima uspešno je izvršena i diferencijacija MMZ u pravcu adipogenog i miogenog tkiva. Za adipogenu diferencijaciju je korišćen medijum sa izobutilmetilksantinom, a pojava adipocita sa lipidnim vakuolama je bila potvrda za uspešnu diferencijaciju. Mogućnost diferencijacije MMZ u pravcu mišićnih ćelija je dalja potvrda izuzetnog potencijala njihove diferencijacije i dokaz da MMĆ imaju širi potencijal diferencijacije nego što je u početnim eksperimentima sa MMĆ iz kostne srži pokazano (Jackson i sar., 2007). Naime, miogeni potencijal MMĆ iz kostne srži je kasnije pokazan u radovima koji su *in vitro* ukazali njihovu sposobnost da se diferenciraju u mišićno tkivo, posebno miokardium (Ferrari i sar., 1998; Gojo i sar., 2003). Takođe, noviji rezultati pokazuju da i matične ćelije iz pulpe zuba imaju sposobnost da diferenciraju u ćelije glatkih i poprečnoprugastih mišića (Kerkis i sar., 2006).

Preživljavanje, proliferacija, diferencijacije, kao i druge funkcije MMĆ, odvijaju se u definisanoj mikrosredini, čije komponente imaju ključnu ulogu u regulaciji ovih procesa. MMĆ kao adherentne ćelije su direktno zavisne od kontakta sa mikrosredinom, bilo da je to adherencija za plastičnu podlogu u *in vitro* uslovima ili kontakt sa komponentama ekstracelularnog matriksa i susednim ćelijama u *in vivo* uslovima. Međutim, pored neposrednog kontakta, u kompleksnom miljeu mikrosredine MMĆ su pod uticajem i različitih biološki aktivnih molekula koji mogu biti solubilni, ili vezani za membrane ćelija ili za komponente ekstracelularnog matriksa, što može da pojača njihovu

aktivnost. Prisustvo i delovanje biološki aktivnih molekula, uključujući brojne citokine, faktore rasta, ćelijske adhezivne molekule, zavise od prirode lokalne mikrosredine i u *in vivo* uslovima uskladjeno je sa potrebama organizma. U *in vitro* uslovima, od uslova kultivisanja i primenjenih stimulatornih molekula umnogome zavisi postizanje željene, optimalne proliferacije i/ili diferencijacije. Stoga je deo naših istraživanja bio usmeren na ispitivanje uticaja faktora mikrosredine na proliferaciju izolovanih i okarakterisanih MMZ, pri čemu smo pratili efekte IL-17 i bFGF.

IL-17 je proinflamatorni citokin koga proizvodi jedinstvena populacija T limfocita, nazvana Th17 limfociti (Korn i sar., 2007). Iako je specifični IL-17-receptor ubikvitarno rasprostranjen u organizmu, najčešće ciljane ćelije koje odgovaraju na njegovu stimulaciju su stromalne ćelije, kao što su epitelne, mezenhimalne ćelije (mioblasti, fibroblasti, adipociti i osteoblasti) i keratinociti. Još u prvim radovima nakon otkrića, IL-17 je opisan kao citokin koji svoje efekte ostvaruje preko stimulacije produkcije niza biološki aktivnih molekula od strane različitih stromalnih ćelija - fibroblasta, keratinocita, endotelnih i epitelnih ćelija, osteoblasta, sinovijalnih ćelija, hondrocita, makrofaga, astrocita, a brojna istraživanja koja su usledila pokazala su da IL-17 stimuliše produkciju IL-6, IL-8, IL-1 β , PGE2, G-CSF, TNF- α , IL-10, IL-12, IL1Ra, MMP-1, MCP-1, CXC hemokina, C3 komponente komplemента, pri čemu biološki efekat IL-17, odnosno profil oslobođenih citokina zavisi od tipa ćelija na koje deluje (Jovanović i sar., 1998; Witowski i sar., 2004; Aggarwal i Gurney, 2002).

Prve studije sugerisale su da je IL-17 element citokinske mreže koji povezuje imunski sistem sa hematopoezom, pa se delovanje na ekspanziju i hemotaksu neutrofila smatraju ulogama karakterističnim za IL-17. Takođe je pokazano da IL-17 utiče na ekspanziju granulocita i makrofaga koji učestvuju u inflamaciji tkiva i da ima zaštitnu ulogu u odbrani domaćina od patogenih bakterija. Poznato je da IL-17 stimuliše produkciju IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-10, IL-12, prostaglandina E2, antagoniste receptora za IL-1 i MMP-3 u humanim makrofagama (Shalom-Barak i sar., 1998; Trajković i sar., 2001). Takođe, IL-17 podstiče sazrevanje prethodnika dendritičnih ćelija miša, stimulišući

ekspresiju specifičnih CD antigena na ovim ćelijama (Antonysamy i sar., 1999). To je ukazalo na značaj IL-17 u inicijaciji i održavanju imunskog odgovora, s obzirom da upravo dendritične ćelije prikazivanjem antigena na svojoj površini započinju imunski odgovor, a da makrofage doprinose održavanju intenziteta imunske reakcije.

Poslednjih godina, istraživanja efekata IL-17 na mezenhimalnim ćelijama donela su zanimljive rezultate koji potvrđuju da biološki odgovor ćelija na dejstvo IL-17 zavisi od njihovog tipa. Tako je pokazano da je receptor za IL-17 eksprimiran i na MMC iz kostne srži i da IL-17 stimuliše proliferaciju mišjih i humanih mezenhimalnih matičnih ćelija (Fossiez i sar., 1998; Huang i sar., 2006; Huang 2009; Mojsilović i sar., 2011). Takođe, pokazano je da IL-17 svoju ulogu finog regulatora ostvaruje i u procesu diferencijacije MMC, budući da stimuliše osteogenu diferencijaciju humanih MMC (Huang i sar., 2009) i da je uključen u proces remodelovanja kostiju (Shen i sar., 2008). S druge strane, IL-17 inhibira adipogenezu humanih MMC poreklom iz kostne srži, istovremeno stimulišući lipolizu u diferenciranim adipocitima (Shin i sar., 2009). Ipak, mehanizmi delovanja i značaj delovanja IL-17 na procese proliferacije i diferencijacije MMC, pogotovu onih MMC izolovanih iz različitih tkiva van kostne srži, još uvek su nedovoljno istraženi.

Faktor bFGF stimuliše proliferaciju i diferencijaciju ćelija mezodermalnog porekla, uključujući i fibroblaste i vrlo se često koristi u standardnim procedurama kultivisanja i ekspanzije različitih tipova stromalnih ćelija, uključujući i mezenhimalne matične ćelije izolovane iz različitih izvora (Tsustsumi i sar., 2001). Plejotropno dejstvo FGF na mnoge ćelije i tkiva, manifestuje se njegovom ulogom u mitozu, ćelijskoj diferencijaciji, angiogenezi, ćelijskim migracijama i različitim razvojnim procesima (Tran-Huang i sar., 2006). Poznata je i uloga FGF u samoobnavljanju MMC i održavanju njihovog potencijala diferencijacije (Kato i Gospodarowicz, 1985), pri čemu on održava MMC u nediferenciranom stanju tokom proliferacije, utičući na zadržavanje multipotentnog kapaciteta (Oliver i sar., 1990). Dokazana je i njegova uloga kao regulatornog faktora u samoobnavljanju hematopoetskih matičnih ćelija,

neuralnih matičnih ćelija i embrionalnih matičnih ćelija (Yeoh i de Haan, 2007). U skorijim radovima je pokazan i njegov uticaj na *in vitro* proliferaciju matičnih ćelija iz stalnih zuba (He i sar., 2008; Morito i sar., 2009). Takođe, mnoga istraživanja su ukazala da FGF i njegovi receptori (FGFR) predstavljaju ključni faktor u ćelijskom starenju i samoobnovi matičnih ćelija (Coutu i sar., 2011). U većini do sada proučavanih efekata pokazano je da FGF svoju ulogu ostvaruje na indirektan način, modulacijom ćelijskog odgovora na dejstvo drugih signalnih molekula, pri čemu različiti uticaji koje FGF ostvaruje na ciljne ćelije zavise od stepena njihove diferencijacije, stepena ekspresije FGFR, kao i od prisustva drugih faktora rasta i citokina (Coutu i Galipeau, 2011).

Naši eksperimenti u kojima je ispitivano delovanje IL-17 i FGFb na proliferaciju MMZ, potvrdili su ranije nalaze da su oba molekula faktori rasta i za matične ćelije izolovane iz zubne pulpe. I IL-17 i FGFb stimulisali su proliferaciju ovih ćelija, a dobijene vrednosti su u skladu sa ranije objavljenim radovima u kojima je opisan efekat pojedinačnih citokina na proliferaciju MMC (Mojsilović i sar., 2011). Zajedničko delovanje IL-17 i FGFb dovelo je do sinergističkog uticaja i povećanja proliferacije MMZ.

Kako je poznato da je u regulaciji različitih ćelijskih procesa uključena i kompleksna mreža vrlo složenih i međusobno isprepletanih intracelularnih signalnih komponenti i signalnih kaskada, koje u ćelijama određuju i koordiniraju brojne ćelijske funkcije inicirane različitim regulatorima, dalja ispitivanja aktiviranih signalnih puteva preko kojih se ostvaruje stimulacija proliferacije od strane IL-17 i/ili FGFb trebala bi da doprinesu i postizanju optimalnog protokola za umnožavanje *ex vivo* početnog malog broja MMZ. Naime i pored ogromnog napretka u razumevanju biologije MMC i njihovog kliničkog potencijala u oblasti regenerativne medicine jedan od problema sa kojim se istraživači i kliničari sreću je relativno mali broj ćelija koja se izoluju iz različitih izvora, pogotovu onih dentalnog porekla. Stoga je potreba za dobijanjem dovoljnog broja MMC u *ex vivo* uslovima osnov za uspešnu kliničku primenu ovih ćelija. Takođe, vrlo je važno da se ostvari takav nivo kontrole procesa ekspanzije koji omogućava povećanje

broja MMĆ koje ne samo što nije praćeno i procesom diferencijacije, nego i ne utiče na multipotentni potencijal diferencijacije ćelija. U cilju ostvarivanja i optimizovanja procesa neophodno je identifikovati faktore rasta/citokine koji istovremeno neće uticati na proliferaciju i diferencijaciju. Stoga bi istraživanja u narednom periodu trebala da obuhvate ispitivanje signalnih puteva preko kojih se ostvaruje uticaj IL-17 i FGFb na proces proliferacije, kao i ulogu ova dva faktora na proces diferencijacije MMĆ izolovanih iz mlečnih zuba.

Pulpa mlečnih zuba predstavlja jedan od najoptimalnijih izvora adultnih matičnih ćelija. Pripada tkivima koja se odbacuju nakon intervencije, tako da ne zahteva invazivne terapijske procedure po donora u cilju dobijanja ćelija, što je prednost u poređenju sa kostnom srži. Za razliku od embrionalnih matičnih ćelija nema etičkih i zakonskih prepreka koje bi ograničavale istraživanja i buduću upotrebu. U odnosu na ćelije iz krvi i tkiva pupčanika za čije prikupljanje postoji samo jedna šansa, porođaj, smena mlečnih zuba traje oko šest godina i može se planirati momenat za njihovo izolovanje. Ovo istraživanje je pokazalo da MMZ poseduju adekvatne biološke osobine za potencijalnu kliničku upotrebu, a imajući u vidu nabrojane prednosti, slobodno možemo reći da su u ovom momentu matične ćelije iz mlečnih zuba najoptimalniji izvor za potencijalnu upotrebu u regenerativnoj medicini i stomatologiji. Iako je napravljen veliki napredak u razumevanju njihove biologije, potrebno je uložiti mnogo truda za optimizovanje protokola za izolovanje i umnožavanje, razvoj medijuma za kultivisanje bez animalnog seruma koji bi sadržao aktivne molekule za bržu ekspanziju ćelija, a koji istovremeno ne bi doveli do njihove diferencijacije. Utvrđivanje faktora koji određuju diferencijaciju mezenhimalnih ćelija nakon *in vivo* aplikovanja je od presudnog značaja za kliničku upotrebu. Razvoj protočne citometrije i drugih metoda za detaljno antigensko karakterisanje će olakšati i ubrzati povezivanje bioloških osobina sa predvidivim ponašanjem u kliničkoj praksi. Kako MMZ imaju mogućnost čuvanja u bankama ćelija, razvoj krioprotektivnih sredstava, određivanje njihove koncentracije i vremena delovanja kao i optimizovanja parametara za monitoring ovih procesa, zahteva još mnoga istraživanja.

Obzirom da MMZ vode poreklo od neuralnog grebena, njihova diferencijacija u pravcu nervnog tkiva je predmet velikog interesovanja. Iako i matične ćelije iz dentalnog folikula imaju isto poreklo, njihovi putevi diferencijacije u pravcu nervnog tkiva su potpuno različiti (Morsczeck i sar., 2009). Prilikom kultivacije MMZ u medijumu za neuralnu indukciju dolazi do stvaranja sfera sličnih neuralnim, a njihovom transplantacijom u striatum pacova sa Parkinsonovom bolešću došlo je do delimičnog poboljšanja bihejvioralnih poremećaja (Wang i sar., 2010).

MMZ imaju sposobnost indukcije oralnih epitelnih ćelija u pravcu ameloblasta. Prilikom zajedničke kultivacije humanih fetalnih oralnih epitelnih ćelija sa MMZ dolazi do pozitivne ekspresije amelogenina. Samostalno kultivisane oralne epitelne ćelije su amelogenin negativne, što pokazuje sposobnost MMZ da izvrše njihovu indukciju i potencijalnu primenu u tkivnom inženjerstvu gleđi (Coppe i sar., 2009).

Poznato je da reakcija između epitelne i mezenhimalne komponente ima ključnu ulogu u razviću zuba. Prisustvo mezenhimalnih ćelija u pulpi mlečnih zuba je utvrđeno 2003. godine, a prisustvo epitelnih ćelija 2009 (Nam i sar., 2009). Izolovane ćelije imaju morfologiju epitelnih ćelija i pokazuju ekspresiju markera karakterističnih za epitelne matične ćelije. To je potvrđeno i ekspresijom gena karakterističnih za ove ćelije, što otvara mogućnost njihove upotrebe u regeneraciji ili reparaciji zuba.

Za razliku od početnih istraživanja, pokazana je sposobnost MMZ da nakon transplantacije na pogodnom nosaču u imunodeficientne miševе, dovode do nastanka odontoblasta i tkiva koje je po arhitekturi i celularnosti identično tkivu fiziološke pulpe (Cordeiro i sar., 2008). Takođe, dolazi i do diferencijacije u vaskularne endotelne ćelije. *In vitro* vaskularni endotelijalni faktor rasta indukovao je MMZ na diferencijaciju u vaskularne endotelne ćelije i organizaciju kapilarne mreže. Pošto je jedan od osnovnih problema tkivnog inženjerstva uspostavljanje rane vaskularizacije, ova osobina povećava potencijalnu ulogu MMZ u tkivnom inženjerstvu različitih organa (Sakai i sar., 2010).

Dodatkom u medijum za kultivisanje faktora za hepaticnu diferencijaciju, indukuje se diferencijacija MMZ u ćelije jetre, što se potvrđuje pozitivnom ekspresijom markera

specifičnih za hepatocite. Takođe, stvaraju se i mali klasteri ćelija pozitivnih na faktor rasta 1 sličan insulinu, kao i značajno povećanje koncentracije uree u medijumu. U ćelijama su pronađene i značajne količine insulina, a isti rezultati su dobijeni i za ćelije iz pulpe stalnih zuba. (Ishkitiev i sar., 2010). Najnovija istraživanja su pokazala mogućnost dobijanja ćelija pankreasa iz ćelija pulpe, što otvara mogućnost njihove upotrebe u terapiji dijabetesa (Govindasamy i sar., 2011).

MMZ poseduju imunomodulatornu funkciju preko svog uticaja na T i B limfocite, dendritične ćelije, kao i prirodne ćelije ubice. Praćeno je njihovo *in vitro* dejstvo na ćelije imunog sistema, T-helper 17 ćelije (Th17) koje su odgovorne za patogenezu autoimunih oboljenja i T regulatorne ćelije (Tregs), koje imaju preventivnu ulogu preko supresije proliferacije i produkcije proinflamatornih citokina i imunih ćelija. Pokazano je da MMZ imaju veći potencijal imunomodulacije od ćelija iz kostne srži u smislu oporavka odnosa Tregs/Th17, kao i u smanjenju Th17 ćelija u perifernoj krvi. Nakon sistemske infuzije dovode do značajnog smanjenja serumskog nivoa autoantitela koje imaju ključnu ulogu u sistemskom lupusu eritematozusu. Njihova transplantacija dovodi kod eksperimentalnih životinja do oporavka bubrežnih poremećaja izazvanih lupusom kao i do oporavka trabekularne kosti i inhibicije aktivnosti osteoklasta (Yamaza i sar., 2010).

Korišćenjem metode tkivnog eksplanta za kultivisanje ćelija, iz pulpe mlečnih zuba se dobija podgrupa matičnih ćelija koje pokazuju ekspresiju markera karakterističnih za embrionalne ćelije, koje su nazvane nezrele matične ćelije iz pulpe zuba (Kerkis i sar., 2006). Uklanjanje ćelija iz njihovog prirodnog okruženja može dovesti do promene u potencijalu diferencijacije (Jiang, 2002; Schwartz i Verfaillie, 2005) tako da se ćelije dobijene ovim načinom kultivisanja razlikuju od ćelija izolovanih metodom enzimske digestije.

Tokom dugotrajnog kultivisanja, uz očuvanje normalnog kariotipa i održanje stepena ekspanzije karakterističnog za matične ćelije, ove ćelije ekspimiraju Oct-4, Nanog, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, kao i antigene specifične za ljudske mezenhimalne matične ćelije, SH-2, SH-3 i SH-4.

Prilikom diferencijacije u pravcu nervnog tkiva, nezrele matične ćelije iz pulpe zuba pokazuju 4 puta bržu diferencijaciju nego MMZ, a dobijena karakteristična sendvič morfologija glija ćelija i neurona je prvi put dobijena od ćelija koje nisu adultni prekursori nervnog tkiva.

Ove ćelije se uspešno diferenciraju u pravcu koštanog, hrskavičavog i mišićnog tkiva. Kako su one izolovane i iz pulpe stalnih zuba, može se pretpostaviti da bi mogle biti multipotentni prekursori matičnih ćelija iz pulpe mlečnih i stalnih zuba.

Kao zaključak, nameće se da su matične ćelije iz pulpe mlečnih zuba izuzetno dostupan i bezbolan izvor MMĆ. Svako dete gubi mlečne zube i umesto da se takvi zubi bacaju, mnogo je bolje uraditi krioprezervaciju preostale pulpe ili iz nje izolovanih matičnih ćelija. Personalizovana medicina predstavlja budućnost za terapiju raznih oboljenja, tako da čuvanje sopstvenih matičnih ćelija odbacuje mogućnost imunoloških poteškoća kao i potencijalnog prenošenja oboljenja od donora. Ove ćelije se nameću kao jedan od najboljih izvora za ćelijsku terapiju, tkivno inženjerstvo i regenerativnu medicinu (Arora i sar., 2009).

Upotreba ovih ćelija u terapiji može ići u pravcu regeneracije dentalnih tkiva i inženjerstvu celog zuba, ili ka upotrebi u regenerativnoj medicini i terapiji mnogih oboljenja različitih tkiva i organa. Ubrzano se radi na uspostavljanju globalne zakonske regulative koja bi dovela do kontrole razvoja, a Evropska unija je donela nekoliko uredbi kojima se kontroliše svaka faza u manipulisanju matičnim ćelijama, a svaka zemlja pojedinačno ima obavezu da oformi regulatorno telo koje bi ove odredbe primenjivalo na lokalnim nivoima. Podstiče se multidisciplinarna saradnja između različitih naučnih oblasti u cilju što bržeg prevođenja bazičnih istraživanja u kliničku praksu. Na nivou Evropske unije se formiraju tela koja povezuju Vlade zemalja sa naučnim ustanovama, farmaceutskim kompanijama i investicionim fondovima u cilju ubrzanja ovih translacija, tako da se može očekivati sve brži napredak u razvoju svakog segmenta koji bi doveo do primene matičnih ćelija u kliničkoj praksi i početka razvoja sve većeg broja protokola za različita oboljenja. Mlečni zubi i mazenimalne matične ćelije iz njihove pulpe

poslednjih godina su predmet izuzetne pažnje, kako naučne tako i investicione struke i velika sredstva, posebno u Americi, se već sada ulažu u translaciona istraživanja, tako da treba očekivati skori razvoj prvih protokola za njihovu kliničku primenu.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima, a na osnovu dobijenih rezultata istraživanja, može se zaključiti sledeće:

- Metodom enzimske digestije iz pulpe mlečnih zuba uspešno se izoluju mezenhimalne matične ćelije koje i tokom dugotrajnog kultivisanja imaju očuvanu fibroblastnu morofologiju i nepromenjenu sposobnost adhezije;
- Nakon krioprezervacije i odležavanja mezenhimalne matične ćelije izolovane iz pulpe mlečnih zuba pokazuju visok stepen oporavka;
- Mezenhimalne matične ćelije izolovane iz pulpe mlečnih zuba imaju visok klonogeni potencijal, preko 80% kada su zasejavane u niskim koncentracijama;
- Proliferativni kapacitet mezenhimalnih matičnih ćelija izolovanih iz pulpe mlečnih zuba, određivan tokom kratkotrajnih kultura, ukazao je na višestruko povećanje broja ćelija i do 7. dana inkubacije;
- Ispitivanje proliferativnog kapaciteta mezenhimalnih matičnih ćelija izolovanih iz pulpe mlečnih zuba tokom dugotrajne kultivacije omogućilo je izračunavanje VDP i ukazalo je da je proliferativni kapacitet ovih ćelija očuvan tokom dugotrajne ekspanzije;
- Dobijene vrednosti za VDP mezenhimalnih matičnih ćelija izolovanih iz pulpe mlečnih zuba (50 do 80 sati) pokazale su da se vreme dupliranja populacije povećava u toku dugotrajne kulture ćelija, ali i da zavisi od početne koncentracije ćelija u kulturi;
- Mezenhimalne matične ćelije izolovane iz pulpe mlečnih zuba eksprimiraju karakteristične membranske mezenhimalne markere: CD105 (55%-87%), CD90 (80% -94%), CD44 (88% -95%) i STRO-1 (10%);
- Mezenhimalne matične ćelije izolovane iz pulpe mlečnih zuba eksprimiraju karakteristične mezenhimalne intracelularne markere α -SMA i vimentin;

- Mezenhimalne matične ćelije izolovane iz pulpe mlečnih zuba ne eksprimiraju karakteristične markere za hematopoetske ćelije: CD34 (1.7%-1.9%), CD11b (1.1%-3%), CD33 (0.4% -3.2%), CD45 (0.2%-1.6%) i CD235 (0.5%-0.7%);
- Mezenhimalne matične ćelije izolovane iz pulpe mlečnih zuba karakteriše multipotentni potencijal diferencijacije, jer su ove ćelije nakon kultivacije u odgovarajućim indukcionim medijumima diferentovale u pravcu osteogenih, hondrogenih, adipogenih i miogenih ćelija;
- Ispitivanjem efekata IL-17 i bFGF na proliferaciju mezenhimalnih matičnih ćelija izolovanih iz pulpe mlečnih zuba utvrđeno je da i IL-17 i bFGF ispoljavaju stimulatorni efekat na njihovu proliferaciju, pri čemu je efekat bFGF bio jače izražen;
- Istovremeno prisustvo oba ispitivana biološki aktivna molekula, bFGF i IL-17, u kulturama mezenhimalnih matičnih ćelija izolovanih iz pulpe mlečnih zuba, dovelo je do najizraženijeg stimulatornog efekta na proliferaciju.

7. LITERATURA

1. Abe S, Yamaguchi S, Amagasa T. Multilineage cells from apical pulp of human tooth with immature apex. *Oral Sci Int* 2007;4:45–58.
2. About I, Bottero MJ, Denato P de, Camps J, Franquin JC, Mitsiadis TA (2000) Human dentin production in vitro. *Exp Cell Res* 258:33–41.
3. Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol* 2002: 1-8.
4. Arora V, Arora P, Munshi AK. Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): saving for the future. *J Clin Pediatr Dent.* 2009 Summer;33(4):289-94.
5. Bagby GC, Heinrich MC. Growth factors, cytokines and the control of hematopoiesis. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattili SJ et al. (Eds). *Hematology: basic principles and practice.* Churchill Livingstone, New York, 2000 3rd ed.: 139-154.
6. Baker DE, Harrison NJ, Maltby E, Smith K, Moore HD, Shaw PJ, et al. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nat Biotechnol* 2007;25(2):207–215.
7. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, et al. Comparison of stem-cell mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res* 2003;82:976–981.
8. Battula VL, Bareiss PM, Treml S, Conrad S, Albert I, Hojak S, et al. Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serumfree, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation* 2007;75:279–291.
9. Bauer HC, Tempfer H, Bernroider G, Bauer H. Neuronal stem cells in adults. *Exp Gerontol* 2006; 41:111-116.
10. Bhattacharya B, Cai J, Luo Y, Miura T, Mejido J, Brimble SN, Zeng Y, Schulz TC, Rao MS, Puri RK. Comparison of the gene expression profile of undifferentiated

human embryonic stem cell lines and differentiating embryoid bodies. *BMC Dev Biol* 2005; 5:22.

11. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001;19:180–192.

12. Bianco P, Robey PG. (2001). Stem cells in tissue engineering. *Nature* 414, 118–121.

13. Bianco P, Robey PG. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 2000; 105. 1663–68.

14. Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 1983;301(5900):527–530.

15. Brandenberger R, Khrebtukova I, Thies RS, Miura T, Jingli C, Puri R, et al. MPSS profiling of human embryonic stem cells. *BMC Dev Biol* 2004;4:10.

16. Bugarski D, Obradovic B, Petakov M, Jovcic G, Stojanovic N, Bugarski B. Alginate microbeads as potential support for cultivation of bone marrow stromal cells. *Materials Science Forum* 2005; 494: 525-530.

17. Carinci F, Papaccio G, Laino G, Palmieri A, Brunelli G, D'Aquino R, et al. Comparison between genetic portraits of osteoblasts derived from primary cultures and osteoblasts obtained from human pulpar stem cells. *J Craniofac Surg* 2008;19:616–625.

18. Carpenter MK, Rosler E, Rao MS. Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 2003;5(1):79–88.

19. Case J, Rice A, Vowels M. Cytokine mediated expansion of human umbilical cord blood CD34+ cells: comparison of the use of partially purified and pure CD34+ target cells. *Hematol Cell Ther* 1997; 39:193–197.

20. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*. 1980 Aug;56(2):289–301.

21. Chamberlain G, Fox J, Ashton B et al. Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007;25: 2739–2749.
22. Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med* 2003;5:1028–1038.
23. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3213–3218.
24. Coppe C, Zhang Y, Den Besten PK. Characterization of primary dental pulp cells in vitro. *Pediatr Dent*. 2009 Nov-Dec;31(7):467-71.
25. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, Smith AJ, Nör JE. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod*. 2008 Aug;34(8):962-9.
26. Couble ML, Farges JC, Bleicher F, Perrat–Mabillon B, Boudeulle M, Magloire H (2000) Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcif Tissue Int* 66:129–138.
27. Coutu DL, Galipeau J. Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging. *Aging (Albany NY)*. 2011 Oct 9. [Epub ahead of print]
28. Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker JP, et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med* 2004;350(13):1353–1356.
29. d’Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, et al. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ* 2007;14:1162–1171.
30. Da Silva Meirelles L, PC Chagastelles and NB Nardi. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119:2204-2213.

31. d'Aquino R, De Rosa A, Laino G, Caruso F, Guida L, Rullo R, Checchi V, Laino L, Tirino V, Papaccio G. Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2009 Jul 15;312B(5):408-15.
32. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315–317.
33. Ding G, Wang W, Liu Y, An Y, Zhang C, Shi S, Wang S. Effect of cryopreservation on biological and immunological properties of stem cells from apical papilla. *J Cell Physiol.* 2010 May;223(2):415-22.
34. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279:1528–1530.erratum in *Science* 281:923, 1998.
35. Friedenstein, A.J., Petrakova, K.V., Kurolesova, A.I., and Frolova, G.P. 1968. Heterotopic transplants of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*;6:230–247.
36. Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Tissue engineering bioreactors. In: Lanza RP, Langer R, Vacanti J (Eds.) *Principles of Tissue Engineering*, Academic Press, San Diego, CA, 2000; 143–156.
37. Gojo S, Gojo N, Takeda Y, Mori T, Abe H, Kyo S, et al. In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2003;288:51–59.
38. Govindasamy V, Ronald VS, Abdullah AN, Ganesan Nathan KR, Ab Aziz ZA, Abdullah M, Musa S, Abu Kasim NH, Bhonde RR. Differentiation of Dental Pulp Stem Cells Into Islet Like Aggregates. *J Dent Res.* 2011 Feb 18.
39. Greco SJ, Liu K, Rameshwar P. Functional similarities among genes regulated by Oct4 in human mesenchymal and embryonic stem cells. *Stem Cells* 2007;25:3143–3154.

40. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey GP, Shi S. Stem cell properties of human pulp stem cells. *J Dent Res* 2002; 81:531-535.
41. Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood*. 1994 Dec 15;84(12):4164-73.
42. Gronthos S, Mancani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97:13625-13630.
43. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 2003;116:1827–1835.
44. Gronthos, S.; Zannettino, ACW. A method to isolate and purify human bone marrow stromal stem cells. In: Prockop, DJ.; Bunnell, BA.; Phinney, DG., editors. *Mesenchymal stem cells: methods and protocols*. Humana Press; Totowa, NJ: 2008. p. 45-57.
45. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res*. 1965: 2323–8.
46. He H, Yu J, Liu Y, Lu S, Liu H, Shi J, Jin Y. Effects of FGF2 and TGFβ1 on the differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Cell Biol Int*. 2008 Jul;32(7):827-34.
47. Heldin C-H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 1995; 80: 213-223.
48. Hoemann CD, El-Gabalawy H, McKee MD. In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol Biol (Paris)*. 2009 Jun;57(4):318-23.
49. Huang AH, Chen YK, Lin LM, Shieh TY, Chan AW. Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. *J Oral Pathol Med*. 2008 Oct;37(9):571-4.

50. Huang AH, Snyder BR, Cheng PH, Chan AW. Putative dental pulp-derived stem/stromal cells promote proliferation and differentiation of endogenous neural cells in the hippocampus of mice. *Stem Cells*. 2008 Oct;26(10):2654-63.
51. Huang G, Sonoyama W, Chen J, Park S. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res* 2006a;324:225–236.
52. Huang GT, Gronthos S., Shi S. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs. Those from Other Sources. *J Dent Res* 2009;88 (9):792-806.
53. Huang H, Kim HJ, Chang EJ, Lee ZH, Hwang SJ, Kim HM, Lee y, Kim HH. IL-17 stimulates the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells. Implications for bone remodeling. *Cell Death Differ* (Epub ahead of print) Jun 19 2009.
54. Huang W, La Russa V, Alzoubi A, Schwarzenberger P. Interleukin-17 A: T-cell derived growth factor for murine and human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24: 1512-1518.
55. Hunt J. Charles. Cryopreservation of human stem cells for clinical application: A review. *Transfus Med Hemother*. 2011; 38:107-123.
56. Hutmacher DW, Schantz JT, Lam CXF, Tan KC, Lim TC.:State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *J Tissue Eng Med* 2007;1:245-260.
57. Iohara K, Zheng L, Wake H, Ito M, Nabekura J, Wakita H, Nakamura H, Into T, Matsushita K, Nakashima M. A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp. *Stem Cells* 26 2008; 2408–2418.
58. Iohara K, Zheng L, Ito M, Tomokiyo A, Matsushita K, Nakashima M. Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis. *Stem Cells* 24 2006; 2493–2503.
59. Ishkitiev N, Yaegaki K, Calenic B, Nakahara T, Ishikawa H, Mitiev V, Haapasalo

M. Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional features in vitro. *J Endod.* 2010 Mar;36(3):469-74.

60. Jackson L, Jones DR, Scotting P, Sottile V. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med.* 2007 Apr-Jun;53(2):121-7.

61. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.* 1998 Jan 10;238(1):265-72.

62. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:11–21.

63. Karaöz E, Doğan BN, Aksoy A, Gacar G, Akyüz S, Ayhan S, Genç ZS, Yürüker S, Duruksu G, Demircan PC, Sariboyaci AE. Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochem Cell Biol.* 2010 Jan;133(1):95-112.

64. Kato Y, Gospodarowicz D. Sulfated proteoglycan synthesis by confluent cultures of rabbit costal chondrocytes grown in the presence of fibroblast growth factor. *J Cell Biol.* 1985 Feb;100(2):477-85

65. Kémoun P, Laurencin-Dalicioux S, Rue J, Farges J-C, Gennero I, Conte-Auriol F, et al. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res* 2007;329:283–294.

66. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs* 2006;184:105–116.

67. Kiel MJ, He S, Ashkenazi R, Gentry SN, Teta M, Kushner JA, Jackson TL, Morrison SJ. Haematopoietic stem cells do not asymmetrically segregate chromosomes or retain BrdU. *Nature* 449: 238-242, 2007.

68. Kraft DL, Weissman IL. Hematopoietic Stem Cells: Basic Science to Clinical

Applications. In: Bongso A, Lee EH. Stem Cells – From bench to bedside. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore: 253-292, 2005.

69. Laino G, Carinci F, Graziano A, d'Aquino R, Lanza V, De Rosa A, et al. In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. *J Craniofac Surg* 2006;17:511–515.

70. Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res* 2005;20:1394–1402.

71. Laino G, Graziano A, d'Aquino R, Pirozzi G, Lanza V, Valiante S, De Rosa A, Naro F, Vivarelli E, Papaccio G. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. *J Cell Physiol.* 2006 Mar;206(3):693-701.

72. Lee JW, Kim YH, Kim SH, Han SH, Hahn SB. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications. *Yonsei Med J.* 2004 Jun 30;45 Suppl:41-7.

73. Lovschall H, Tummers M, Thesleff I, Fuchtbauer EM, Poulsen K. Activation of the Notch signalling pathway in response to pulp capping of rat molars. *Eur J Oral Sci* 2005; 113: 312–317.

74. Metcalf D. Concise Review: Hematopoietic Stem Cells and Tissue Stem Cells: Current Concepts and Unanswered questions. *Stem Cells* 25: 2390-2395, 2007.

75. Moore XL, Lu J, Sun CJ, Tan P, Wong MC. Endothelial progenitor cells' "homing" specificity to brain tumors. *Gene Ther* 2004; 11:811-818.

76. Milenković P, Ivanović Z, Kataranovski M, Lukić M. Stimulaton of proliferation of spleen colony-forming cells in T-cell deprived mice treated with cyclophosphamide of irradiation. *Cell Prolif* 24: 507-515, 1991.

77. Milyavsky M, Shats I, Erez N. Prolonged culture of telomerase-immortalized human fibroblasts leads to a premalignant phenotype. *Cancer Res* 2003; 63:7147-7157.

78. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:5807–5812.

79. Miura Y, Miura M, Gronthos S, Allen MR, Cao C, Uveges TE, et al. Defective osteogenesis of the stromal stem cells predisposes CD18-null mice to osteoporosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:14022–14027.
80. Moore XL, Lu J, Sun CJ, Tan P, Wong MC. Endothelial progenitor cells' "homing" specificity to brain tumors. *Gene Ther* 2004; 11:811-818.
81. Morito A, Kida Y, Suzuki K, Inoue K, Kuroda N, Gomi K, Arai T, Sato T. Effects of basic fibroblast growth factor on the development of the stem cell properties of human dental pulp cells. *Arch Histol Cytol.* 2009 Mar;72(1):51-64.
82. Morszeck C, Gotz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kuhn U, Mohl C, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol* 2005; 24:155–165.
83. Morszeck C, Völlner F, Saugspier M, Brandl C, Reichert TE, Driemel O, Schmalz G. Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation in vitro. *Clin Oral Investig.* 2010 Aug;14(4):433-40.
84. Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, Sugito T, Ito K, Ueda M. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. *J Endod.* 2009 Nov;35(11):1536-42.
85. Nakashima M. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 2005 16:369–376.
86. Nam H, Lee G. Identification of novel epithelial stem cell-like cells in human deciduous dental pulp. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Aug 14;386(1):135-9.
87. Oliver LI, Rifkin DB, Gabilove J, Hannocks M-J, Wilson EL: Long-Term Culture of Human Bone Marrow Stromal Cells in the Presence of Basic Fibroblast Growth Factor. *Growth Factors* 1990, 3:231-236.
88. Owen M. 1988. Marrow stromal stem cells. *J. Cell Sci. Suppl.* 10:63–76.
89. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 1988;136:42–60.

90. Papaccio G, Graziano A, d'Aquino R, Graziano MF, Pirozzi G, Menditti D, De Rosa A, Carinci F, Laino G. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *J Cell Physiol.* 2006 Aug;208(2):319-25.
91. Perry BC, Zhou D, Wu X, Yang FC, Byers MA, Chu TM, Hockema JJ, Woods EJ, Goebel WS. Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. *Tissue Eng Part C Methods.* 2008 Jun;14(2):149-56.
92. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
93. Pivoriūnas A, Surovas A, Borutinskaite V, Matuzevicius D, Treigyte G, Savickiene J, Tunaitis V, Aldonyte R, Jarmalaviciuūte A, Suriakaite K, Liutkevicius E, Venalis A, Navakauskas D, Navakauskiene R, Magnusson KE. Proteomic analysis of stromal cells derived from the dental pulp of human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cells Dev.* 2010 Jul;19(7):1081-93.
94. Preston SL, Alison MR, Forbes SJ, Direkze NC, Poulosom R, Wright NA.. The new stem cell biology: something for everyone. *Mol. Pathol.* 2003. 56, 86–96.
95. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997;276:71–74.
96. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 2000;18(4):399–404.
97. Robey PG, Bianco O. Stem cells in tissue engineering. U: *Essentials of stem cells biology*, urednici Lanza R, Gearhart J, Hogan B. Elsevier, 2006, 463-469.
98. Robb L. Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene.* 2007 26: 6715-6723.
99. Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado MA, Shi S, Santos CF, Nör

JE. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res*. 2010 Aug;89(8):791-6.

100. Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells*. 2010 Mar 31;28(3):585-96.

101. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 2006;441:1075–1079.

102. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 1978;4:7–25.

103. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004;364:149–155.

104. Seo BM, Miura M, Sonoyama W, Coppe C, Stanyon R, Shi S. Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *J Dent Res* 2005;84:907–912.

105. Serakinci N, Keith WN. Therapeutic potential of adult stem cells. *Eur J Cancer* 2006; 42:1243-1246.

106. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 2003;18:696–704.

107. Sloan AJ, Waddington RJ. Dental pulp stem cells: what, where, how? *Int J Paediatr Dent*. 2009 Jan;19(1):61-70.

108. Song L, Webb NE, Song Y, Tuan RS. Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency. *Stem Cells* 2006;24:1707–18.

109. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS* 2006;1:e79.

110. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod* 2008;34:166–171.

111. Stewart K, Walsh S, Screen J, Jefferiss CM, Chainey J, Jordan GR, et al. Further

characterization of cells expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 1999;14:1345–1356.

112. Stocum DL. Stem cells in regenerative biology and medicine. *Wound Repair Regen* 2001;9: 429–442.

113. Stokowski A, Shi S, Sun T, Bartold PM, Koblar SA, Gronthos S. EphB/Ephrin-B interaction mediates adult stem cell attachment, spreading and migration: implications for dental tissue repair. *Stem Cells* 2007; 25: 156–164.

114. Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, Bekele BN, Champlin RE, Andreeff M. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:1593-1603.

115. Suchánek J, Soukup T, Ivancaková R, Karbanová J, Hubková V, Pytlík R, Kucerová L. Human dental pulp stem cells--isolation and long term cultivation. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2007;50(3):195-201.

116. Suchánek J, Visek B, Soukup T, El-Din Mohamed SK, Ivancaková R, Mokry J, Aboul-Ezz EH, Omran A. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth--isolation, long term cultivation and phenotypical analysis. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2010;53(2):93-9.

117. Tarle SA, Shi S, Kaigler D. Development of a serum-free system to expand dental-derived stem cells: PDLSCs and SHEDs. *J Cell Physiol*. 2010 Jul 12.

118. Tárnok A, Ulrich H, Bócsi J. Phenotypes of stem cells from diverse origin. *Cytometry A*. 2010 Jan;77(1):6-10.

119. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282(5391):1145–1147.

120. Till JE, McCulloch EA, Siminovitch L. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony forming cells. *Proc Acad Sci USA* 1964; 51:29-36.

121. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Rad Res* 1961; 14:231-221.
122. Tran-Hung L, Mathieu S, About I. Role of human pulp fibroblasts in angiogenesis. *J Dent Res*. 2006 Sep;85(9):819-23.
123. Vazin T, Freed WJ. Human embryonic stem cells: Derivation, culture, and differentiation: A review. *Restor Neurol Neurosci*. 2010 January 1; 28(4): 589–603.
124. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* 2006;36:2566-73.
125. Waddington RJ, Youde SJ, Chi PL, Sloan AJ. Isolation of distinct progenitor stem cell populations from dental pulp. *Cells, Tissues, Organs* 2008; Epub ahead of print.
126. Wang J, Wang X, Sun Z, Wang X, Yang H, Shi S, Wang S. Stem cells from human-exfoliated deciduous teeth can differentiate into dopaminergic neuron-like cells. *Stem Cells Dev*. 2010 Sep;19(9):1375-83.
127. Woods EJ, Perry BC, Hockema JJ, Larson L, Zhou D, Goebel WS: Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology* 2009;59:150–157.
128. Xu J, Wang W, Kapila Y, Lotz J, Kapila S. Multiple differentiation capacity of STRO-1+/CD146+ PDL mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev* 2009;18:487–496.
129. Yamaza T, Kentaro A, Chen C, Liu Y, Shi Y, Gronthos S, Wang S, Shi S. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Res Ther*. 2010 Mar 15;1(1):5.
130. Yeoh JS, de Haan G. Fibroblast growth factors as regulators of stem cell self-renewal and aging. *Mech Ageing Dev*. 2007 Jan;128(1):17-24. Review.
131. Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng* 2006;12:2813–2823.

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Nebojša Nikolić rođen je u Beogradu 29.09.1969. godine, gde je završio Osnovnu školu i Zemunsku gimnaziju sa Vukovom diplomom. Stomatološki fakultet je upisao 1988. godine kao prvi na rang listi na prijemnom ispitu, a završio 1995. sa prosečnom ocenom 9.02 i dobio nagradu Student generacije. Od 1995. do 1998. je radio na Klinici za dečju i preventivnu stomatologiju u svojstvu mladog talenta. Magistarsku tezu pod nazivom Odnos biološke aktivnosti i strukturnog dizajna hidroksiapatitnih ćelijskih nosača odbranio je u decembru 2009. godine. Objavio je 5 radova na međunarodnim kongresima i stručnim časopisima. Od 1997. godine do danas radi u sopstvenoj ordinaciji.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а НЕВОЈША НИКОЛИЋ
број уписа 171

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ИЗОЛАЦИЈА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ХУМАНИХ
МАТИЧНИХ БЕЛИЈА ПУЛПЕ МЛЕЧНИХ ЗУБА

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 10. IX 2012

A. Nikolic

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора АЕБОЏА Николит

Број уписа 171

Студијски програм _____

Наслов рада ИЗОЛАЦИЈА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ХУМАНИХ
МАТИЧНИХ БЕЛИЈА ПУЛПЕ МЛЕЧНИХ ЗУБА

Ментор ПРОФ. ДР. ЈЕЛЕНА МИЛАШИН

Потписани А. Николит

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 10. IX 2012

А. Николит

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ИЗОЛАЦИЈА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ХУМАНИХ
МАТИЧНИХ БЕЛИЈА ПУПЕ МАЧНИХ ЗУБА

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 10. IX 2012

A. Anicic