

UNIVERZITET U BEOGRADU  
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Jelena M. Simonović

---

IZOLACIJA, KARAKTERIZACIJA I UPOREDNA  
ANALIZA POTENCIJALA ZA  
NEURODIFERENCIJACIJU MATIČNIH ĆELIJA  
POREKLOM IZ RAZLIČITIH ZUBNIH TKIVA

---

Doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF DENTAL MEDICINE

Jelena M. Simonović

ISOLATION, CHARACTERIZATION AND  
COMPARATIVE ANALYSIS OF POTENTIALS  
FOR NEURODIFFERENTIATION OF STEM  
CELLS ORIGINATING FROM DIFFERENT  
DENTAL TISSUES

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

**Mentor:**

**dr Jelena Milašin, redovni profesor**

Institutski predmeti, Biologija sa humanom genetikom

Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Komisija:**

**dr Vesna Danilović, redovni profesor**

Institutski predmeti, Opšta i oralna histologija i embriologija

Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**dr Zoran Vulićević, redovni profesor**

Klinika za Dečju i preventivnu stomatologiju

Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**dr Pavle Andus, redovni profesor**

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

Najiskrenije se zahvaljujem svom mentoru, **prof. dr Jeleni Milašin**, na divnom mentorstvu punom razumevanja, podrške i poverenja. Hvala na savetima, smernicama, svim razgovorima i kritikama koje su me učinile boljim istraživačem. Hvala Vam što ste verovali u mene i kad ja nisam i na svim toplim rečima ohrabrenja i zajedničke radosti za svaki, pa i najmanji uspeh.

Zahvaljujem se **prof. dr Vesni Danilović** na razumevanju i dragocenim rečima podrške u svakom trenutku, na smernicama i velikoj pomoći u izradi ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se **prof. dr Sanji Milutinović-Smiljanić** na ogromnoj pomoći u postupcima transplantacije matičnih ćelija kod laboratorijskih životinja, njihovom praćenju i gajenju, kao i na svakodnevnim svesrdnim ustupcima i razumevanju.

Zahvaljujem se **prof. Gordani Kuburović** na veoma značajnoj podršci i „vetru u leđa“ na samom početku ovog uzbudljivog puta.

Zahvaljujem se **prof. dr Pavlu Anđusu** i njegovim saradnicima na čelu sa **Minom Perić** sa Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, za svu pomoć i smernice vezane za imunocitohemiju, konfokalnu mikroskopiju i proveru uspešnosti neurodiferencijacije matičnih ćelija.

Zahvaljujem se **prof. dr Zoranu Vulićeviću** na rečima ohrabrenja na početku mojih doktorskih studija, kao i na savetima u izradi ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se naučnom savetniku, **dr Đorđu Miljkoviću** sa Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ na pomoći u prvim koracima ove doktorske disertacije, koji su se odnosili na postupke protočne citometrije.

Zahvaljujem se **doc. dr Božidaru Raškoviću** sa Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na ogromnoj pomoći i strpljenju u osmišljavanju postupka i snimanju uzoraka Ramanskom spektromikroskopijom, kao i temeljnom razmatranju rezultata.

Zahvaljujem se **dr Radmili Panajotović, Jasni Vujin, Vladimiru Lazoviću i Vladimiru P. Jovanoviću** sa Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Institutu za fiziku, na ljubaznosti i nesebičnoj pomoći u vidu proizvodnje grafenskih nanomaterijala, pristupu skening elektronskoj mikroskopiji i mikroskopiji atomskih sila, kao i tumačenju i analiziranju ramanskih spektara.

Zahvaljujem se **prof. dr Vladimiru Parpuri** sa odeljenja za neurobiologiju, Univerziteta u Alabami, SAD, na proizvodnji i ustupanju karbonskih nanotubica.

Najiskrenije se zahvaljujem i svojim dragim kolegama iz Laboratorije za Bazična istraživanja, **Nadi, Jeleni, Bošku, Dijani, Maji i Milošu**. Posebno hvala Boletu, Nađi i Jeci na drugarskoj podršci pomoći u razumevanju i snalaženju u laboratorijskim procedurama.

Ogromnu i neizrecivu zahvalnost dugujem mojim najdražima, **mami i bratu**. Hvala na bezrezervnoj podršci, poverenju i davanju vetra u leđa u svemu što zamislim. Hvala na primerima koje ste mi dali i vremenu i energiji koju ste uložili u moje obrazovanje i vaspitanje. Hvala za svako „možeš ti to“ i „šta je to za tebe“.

Na kraju, hvala **Marku** i našoj **Dunji**, sa njima je sve lepše i slađe.

*Tati, za ljubav, zauvek.*

## **Izolacija, karakterizacija i uporedna analiza potencijala za neurodiferencijaciju matičnih ćelija poreklom iz različitih zubnih tkiva**

### ***Sažetak***

U oblasti regenerativne medicine, sve je veće interesovanje za dentalne matične ćelije, kako zbog njihove lake izolacije i dostupnosti, tako i zbog njihovog ektomezenhimnog porekla i mogućnosti diferencijacije u veliki broj ćelijskih linija. S obzirom da se neuralne matične ćelije nalaze u malom broju na teško dostupnim mestima, jasna je potreba da im se nađe što bolja zamena odnosno da se nađe alternativni izvor matičnih ćelija koje bi bile od koristi u neuroregeneraciji. Poznato je da se matične ćelije zubnih tkiva lako mogu izolovati nakon vađenja zuba, a kako ove ćelije vode poreklo od nervnog grebena, bez ikakve stimulacije eksprimiraju markere nervnih ćelija, pa se nameću kao jedan od izvora ćelija u terapiji neurodegenerativnih oboljenja.

Istraživanja su obuhvatila izolaciju, karakterizaciju i kultivaciju matičnih ćelija pulpe, apikalne papile i dentalnog folikula trećeg molara. Zatim je urađena njihova fenotipska identifikacija i karakterizacija preko specifičnih markera matičnosti primenom protočne citometrije i analizom genske ekspresije, zatim određivanjem klonogenog i diferencijacijskog potencijala i konačno uporednom analizom sva tri tipa ćelija primenom ramanske mikrospektroskopije. Ćelije su podvrgnute neuroindukciji, a nakon odabrane najpotentnije ćelijske loze za neurodiferencijaciju, poređeni su i protokoli sa i bez dodatka nanomaterijala.

Ćelije koje su izolovane iz pulpe, apikalne papile i dentalnog folikula zuba mogu se okarakterisati kao matične ćelije, koje se brzo i lako diferencijuju u tri mezodermalne ćelijske loze (osteogenu, hondrogenu i adipogenu), eksprimiraju visok nivo mezenhimalnih markera uz odsustvo ekspresije hematopoetskih. Ramanskom spektromikroskopijom, ćelije izolovane iz apikalne papile pokazale su najveći stepen potentnosti, a nakon neurodiferencijacije u prisustvu nanomaterijala, i visok nivo neuralnih markera (MAP2, ngn-2, beta III tubulin, NF-M).

Može se zaključiti da su pulpa, folikul i posebno apikalna papila dobar izvor matičnih ćelija za potencijalnu upotrebu u neuroregenerativnoj terapiji.

**Ključne reči:** matične ćelije, apikalna papila, folikul, pulpa, neurodiferencijacija, nanomaterijali, regenerativna terapija

**Naučna oblast:** Medicinske nauke-stomatologija

**Uža naučna oblast:** Bazična stomatološke nauke

# **Isolation, characterization and comparative analysis of the potential for neurodifferentiation of stem cells originating from different dental tissues**

## *Abstract*

Dental stem cells are becoming increasingly interesting in regenerative medicine, both because of their easy isolation and availability, and because of their ectomesenchymal origin and the possibility of differentiation into numerous cell lines. Since neural stem cells are sparsely present mostly in unreachable places, there is a clear need to find the best possible replacement that would be useful in neuroregeneration. It is known isolation of stem cells from dental tissues can be performed without additional procedures following tooth extraction. Originating from neural crest, they express neural markers without any stimulation, so they represent an obvious choice for therapeutic neuroregeneration.

The procedures included in this dissertation were isolation, characterization, cultivation of stem cells from dental pulp, apical papilla and dental follicle of the third molar, their phenotypic identification and characterization using flow cytometry, determination of clonogenic and differentiation potential, comparative analysis using Raman microscopy. The cells were subjected to neuroinduction, and the most potent cell lineage for neural differentiation was selected, and then used in comparison of protocols for neural differentiation with and without nanomaterials.

The obtained results indicated that the isolated cells could be characterized as stem cells of the pulp, apical papilla and dental follicle, then quickly and easily differentiated into three mesodermal cell lines, expressing a high degree of mesenchymal markers in the absence of hematopoietic expression. By Raman spectromicroscopy, cells isolated from the apical papilla showed the highest marker of cell potency, and after neurodifferentiation, levels of neural markers (MAP2, ngn-2, beta III tubulin, NF-M) were significantly increased.

It can therefore be concluded that isolated cells represent a valuable source for neuroregenerative therapy.

### **Keywords:**

Stem cells, apical papilla, follicle, pulp, neurodifferentiation, nanomaterials, regenerative therapy

**Scientific field:** Medical sciences-dentistry

**Narrow scientific field:** Basic dental sciences

## SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Adultne matične ćelije	3
1.1.1. Adultne mezenhimalne matične ćelije	4
1.2. Mezenhimalne matične ćelije poreklom iz zubnih tkiva	5
1.2.1. Matične ćelije poreklom iz pulpe stalnih zuba	6
1.2.2. Matične ćelije iz pulpe mlečnih zuba	7
1.2.3. Matične ćelije poreklom iz peridontalnog tkiva	9
1.2.4. Matične ćelije iz dentalnog folikula	10
1.2.5. Matične ćelije apikalne papile	11
1.2.6. Matične ćelije poreklom iz zubnog zametka	12
1.3. Dentalne MĆ u regenerativnoj terapiji	12
1.3.1. Pretkliničke studije efikasnosti upotrebe DMĆ u regenerativnoj terapiji	13
1.3.1.1. Mišićne distrofije	13
1.3.1.2. Dijabetes	13
1.3.1.3. Oboljene jetre	13
1.3.1.4. Očna oboljenja	13
1.3.1.5. Infarkt miokarda	14
1.3.1.6. Autoimuna oboljenja	14
1.3.1.7. Orofacijalna oboljenja	15
1.3.1.8. Neurološka oboljenja i povrede kičmene moždine	15
1.3.1.8.1. Povrede kičmene moždine	15
1.3.1.8.2. Parkinsonova bolest	16
1.3.1.8.3. Alchajmerova bolest	16
1.3.1.8.4. Cerebralna ishemija	16
1.3.2. Klinička ispitivanja DMĆ u regenerativnoj terapiji	17
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	19



---

3. MATERIJAL I METODE	21
3.1. Izolacija matičnih ćelija iz zubnih tkiva	23
3.1.1. Izolacija matičnih ćelija iz apikalne papile zuba	23
3.1.2. Izolacija matičnih ćelija iz dentalnog folikula	23
3.1.3. Izolacija matičnih ćelija iz pulpe zuba	23
3.2. Kultivacija matičnih ćelija	24
3.3. Pasaža ćelija	24
3.4. Krioprezervacija	25
3.5. Odmrzavanje ćelija	25
3.6. Dokazivanje matičnosti	25
3.6.1. Protočna citometrija - dokazivanje mezenhimalnih markera	25
3.6.2. Određivanje potencijala za diferencijaciju	26
3.6.2.1. Osteogena diferencijacija	26
3.6.2.2. Hodrogena diferencijacija	26
3.6.2.3. Adipogena diferencijacija	27
3.7. Izolacija RNK za ispitivanje genske ekspresije	28
3.8. Izolacija DNK	28
3.9. Određivanje koncentracije i čistoće uzoraka	28
3.10. Rezervacija transkripcija - lančana reakcija polimeraze (RT-PCR)	29
3.11. Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (engl. Real Time PCR qPCR)	30
3.12. Određivanje relativne dužine telomera	32
3.13. Test formiranja kolonija (eng. Colony Forming Unit - CFU TEST)	33
3.14. Ramanska spektrometrija	33
3.15. Neurogena diferencijacija (ND)	34
3.15.1. Neurogena diferencijacija i nanomaterijali	35
3.16. Imunocitohemija (ICC)	36
3.17. Mikroskopija atomskih sila (eng. Atomic Force Microscopy - AFM)	37
3.18. Skening elektronska mikroskopija (SEM)	37
3.19. <i>In vivo</i> neurogena diferencijacija	37
3.19. Statistička analiza	38

---

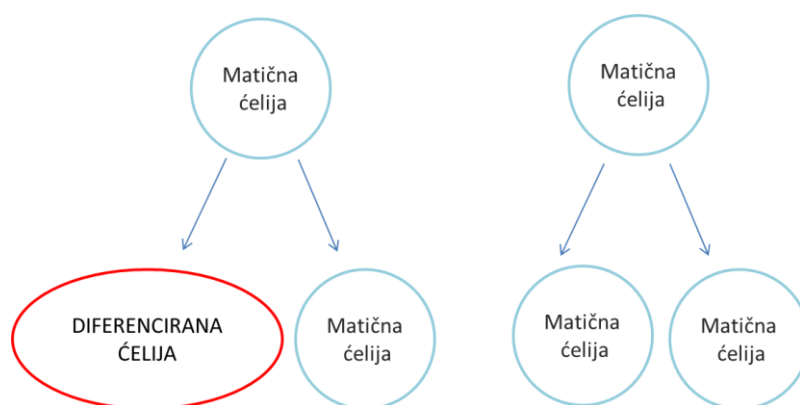
4. REZULTATI	39
4.1. Izolacija i kultivacija MMĆ iz zubnih tkiva	40
4.2. Dokazivanje matičnosti	42
4.2.1. Protočna citometrija	42
4.2.2. Real-time analiza genske ekspresije	43
4.2.3. Potencijal diferencijacije	43
4.2.3.1. Osteogena diferencijacija	43
4.2.3.2. Hondrogena diferencijacija	44
4.2.3.3. Adipogena diferencijacija	44
4.2.3.4. Dokazivanje diferencijacije analizom genske ekspresije markera adipo, asteo i hondro-loze	45
4.3. Određivanje dužine telomera	45
4.4. Test formiranja kolonija (CFU test)	46
4.5. Ramanska spektromikroskopija	47
4.6. Neurogena diferencijacija	53
4.6.1. Svetlosna mikroskopija ćelija nakon ND	53
4.6.2. Analiza ekspresije gena specifičnih za neurodiferencijaciju	54
4.6.3. Dužina telomere nakon neurodiferencijacije	54
4.6.4. Neuroindukcija potpomognuta nanomaterijalima	54
4.6.5. Dokazivanje neurodiferencijacije imunocitohemijom	57
4.6.6. Dokazivanje neurodiferencijacije preko genske ekspresije specifičnih markera	60
4.6.7. Mikroskopija atomskih sila (AFM)	61
4.6.8. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)	62
4.7. <i>In vivo</i> neurogena diferencijacija	63
5. DISKUSIJA	66
6. ZAKLJUČCI	75
7. LITERATURA	77
PRILOZI	

---

## **1. UVOD**

## 1. UVOD

Matične ćelije predstavljaju populaciju nespecijalizovanih ćelija koje imaju neograničenu sposobnost samoobnavljanja i diferencijacije u veći broj specijalizovanih ćelijskih linija (Caplan, 1991; Weissman, 2000). U odnosu na njihovu potentnost, odnosno mogućnost diferencijacije, matične ćelije podeljene su na totipotentne, pluripotentne, multipotentne, oligo i unipotentne (Fortier, 2005). Samoobnavljanje je proces koji podrazumeva da se prilikom svake asimetrične deobe jedna ćelija diferencira, a druga ostaje identična majci ćeliji ili da se jedna ćerka ćelija diferencira, a druga deli na dve istovetne matične ćelije (stohastična, simetrična deoba) (Slika 1) (He, Nakada and Morrison, 2009).



**Slika 1.** Asimetrična i simetrična deoba matičnih ćelija

Matične ćelije takođe mogu biti podeljene na embrionalne, fetalne, adultne i indukovane matične ćelije.

Embrionalne matične ćelije se mogu izolovati iz unutrašnje mase blastociste i one su pluripotentne, odnosno njihovom diferencijacijom mogu nastati derivati sva tri klicina lista (Thomson, 1998).

Fetalne matične ćelije se mogu podeliti na hematopoezne, mezenhimalne, endotelijalne, epitelijalne i neuralne (O'Donoghue and Fisk, 2004); najčešće se izoluju iz pupčanika i tkiva posteljice.

Adultne matične ćelije mogu se izolovati iz gotovo svih razvijenih tkiva, gde naseljavaju određene delove tzv. niše i služe kao rezervoar nediferentovanih ćelija za regeneraciju i održavanje homeostaze.

Indukovane matične ćelije predstavljaju zrele dediferencirane ćelije. Verovalo se da se jedino laboratorijskim reprogramiranjem pomoću genom integrišućih adenovirusa i posebnog seta gena-Oct4, Sox2, Klf4 i c-Myc, ćelije mogu vratiti u pluripotentni stem oblik koji odgovara embrionalnim ćelijama (Takahashi and Yamanaka, 2006). Kasnija istraživanja su pokazala da je

dediferencijaciju moguće postići i bez mutagenog faktora (Huangfu *et al.*, 2008; Okita *et al.*, 2008; Stadtfeld *et al.*, 2008).

Totipotentne matične ćelije su ćelije zigota i morule. Na ovom nivou svaka izdvojena ćelija bi mogla da se diferencira u bilo koju zrelu ćeliju organizma, ali i u ćelije ekstraembrionalnih struktura, odnosno od jedne ćelije daljom deobom mogla bi se razviti sva tkiva, tj. nov organizam u celosti.

Pluripotentnost poseduju embrionalne matične ćelije, kao i indukovane matične ćelije; njihovom diferencijacijom mogu da nastanu skoro sva adultna tkiva, odnosno ćelije sva tri klicina lista, ali je moć diferencijacije svakako manja nego kod totipotentnih matičnih ćelija.

Uprkos velikom kapacitetu diferencijacije i brze proliferacije pluripotentnih i totipotentnih ćelija, njihova eventualna primena u terapiji povezana je sa brojnim problemima, kao što su opasnost od izazivanja imunološke reakcije, tumorogeni potencijal, složen postupak laboratorijske izolacije i kultivacije, i konačno, brojne etičke dileme. Embrionalne pluripotentne ćelije su prvi put izolovane i kultivisane 1981 iz embriona miša (Martin, 1981; Lerou and Daley, 2005), dok su humane embrionalne ćelije izolovane 17 godina kasnije (Thomson, 1998).

Humane embrionalne pluripotentne ćelije korišćene u eksperimentima najčešće se dobijaju iz unutrašnjeg sloja blastociste embriona odbačenih prilikom postupaka *in vitro* oplodnje. Gajenje embrionalnih matičnih ćelija u odnosu na adultne znatno je zahtevnije. Naime nakon izolacije, ove ćelije se čuvaju u bocama ispunjenim specifičnim medijumom, gde se one grupišu formirajući svoje mikrosredine i u kojima proizvode brojne faktore od značaja za dalju diferencijaciju ćelija. Na ovaj način se formiraju embrioidna tela sa sva tri klicina lista *u in vitro* uslovima (Lerou i Daley, 2005).

Da bi za neke ćelije mogli da kažemo da su embrionalne matične ćelije, neophodno je da ispune sledeće uslove: ekspimiraju veliki broj intra i ekstra ćelijskih markera pluripotentnosti, dovode do stvaranja teratoma nakon transplantacije u imunodeficientnog miša (dokazivanje pluripotentnosti *in vivo*), pokazuju visoku telomeraznu aktivnost i omogućavaju dobijanje ćelija sva tri klicina lista u toku kultivacije (dokazivanje pluripotentnosti *in vitro*) (Wobus *et al.*, 1984; Carpenter, Rosler and Rao, 2003).

### 1.1. Adultne matične ćelije

Adultne matične ćelije nalaze se u zrelom tkivu i pored uloge u održavanju tkivne homeostaze, značajne su u reparaciji i regeneraciji tkiva koje čine. Ove ćelije se nalaze u gotovo svim zrelim tkivima i, prema poreklu, mogu se podeliti na hematopoetske, mezenhimalne, neuralne i epitelne.

Za razliku od embrionalnih i iPSCs-ove ćelije su manje potentnosti, odnosno manje mogućnosti transdiferencijacije. One mogu biti oligopotentne ili multipotentne. Hematopoetske matične ćelije imaju ulogu u obnavljanju ćelija krvi i imunog sistema, dok epitelne i neuralne ćelije imaju sposobnost diferencijacije u ćelije ektoderma i endoderma. Mezenhimalne ćelije su najmnogobrojnije i od njih mogu da nastanu tkiva poreklom od mezoderma: koštano tkivo, mišićno, masno, hrskavičavo, tetive i ligamenti (Vishwakarma *et al.*, 2014).

Adultne matične ćelije naseljavaju takozvane niše tj. određene mikro regione koji se u zrelim tkivima obično nalaze oko krvnih sudova i koji ovim ćelijama obezbeđuju sve neophodne uslove za rast, razvoj i diferencijaciju. Uloge niša su kontrola mirovanja, apoptoze, diferencijacije,

samoobnavljanja i migracije (Schofield, 1978; Moore and Lemischka, 2006; Ferraro, Lo Celso and Scadden, 2010).

### 1.1.1. Adultne mezenhimalne matične ćelije

Mezenhimalne matične ćelije (MMC) su multipotentne stromalne ćelije i predstavljaju izrazito heterogenu ćelijsku populaciju. Definisane su kao ćelije tkiva poreklom od mezoderma koje poseduju moć proliferacije i adheriranja za plastičnu podlogu, a po morfologiji su slične fibroblastima. Da bi ćelije bile okarakterisane kao multipotentne mezenhimalne matične ćelije, moraju da imaju sposobnost da se u *in vitro* uslovima diferentuju u tkiva mezodermalne linije kao što su koštano, masno i hrskavičavo, zatim, kao što je već spomenuto, da adheriraju za plastičnu podlogu, ali takođe i da ekspimiraju mezenhimalne markere CD105, CD73, CD90. Uporedo sa ekspresijom navedenih markera, ove ćelije ne smeju da ekspimiraju hematopoetske markere CD45, CD34, CD19, CD11b, CD14 (Horwitz *et al.*, 2005; Dominici *et al.*, 2006).

Matične ćelije poreklom iz koštane srži (engl. bone marrow stem cells - BMSC) su u literaturi najčešće opisivane matične ćelije. Sem što su najmasovnije korišćene u eksperimentima, one su isto tako vrlo često korišćene i u kliničkim istraživanjima, odnosno u terapijske svrhe (Yamada *et al.*, 2013; Cho *et al.*, 2018; Wang, Yuan and Xie, 2018). Prvo su izolovane iz koštane srži svinja (Friedenstein, Chailakhjan and Lalykina, 1970), a zatim su opisane i humane BMSC, kao i različite mogućnosti njihove terapijske transplantacije (Friedenstein, 1980). BMSC su heterogena populacija koja se sastoji i od hematopoetskih MĆ (HMC) i od mezenhimalnih MĆ (MMC). BMSC imaju brojne uloge u održavanju matičnosti i diferencijaciji hematopoetskih ćelija koštane srži. Nakon transplantacije u koštano srž imunodeficientnog miša, diferentuju se u pericite, osteocite, osteoblaste, miofibroblaste, endotelne ćelije i stromalne ćelije koštane srži, odnosno u sve funkcionalne elemente koji regulišu hematopoezu.

U terapiji teških hematoloških oboljenja obično se koriste BMSC izolovane iz ilijačne kreste. Bez obzira na dob pacijenta ove ćelije se mogu koristiti i za nadoknadu koštanog tkiva (Stenderup *et al.*, 2001; Mendes *et al.*, 2002). Treba ipak napomenuti da sa godinama opada osteogeni potencijal ovih ćelija izolovanih iz ilijačne kreste (Mueller and Glowacki, 2001; Mendes *et al.*, 2002). Tokom stomatoloških intervencija kao što je operativno vađenje umnjaka, ekstirpacija ciste, moguće je izolovati BMSC maksile i mandibule. Ove ćelije se mogu izolovati kako kod mladih (Matsubara *et al.*, 2005) tako i kod starijih pacijenata (Han *et al.*, 2009). Starost individue iz koje su ćelije izolovane nema značajniji uticaj na ekspresiju gena i njihov osteogeni potencijal (Han *et al.*, 2009). Pokazano je *in vitro* (Zins and Whitaker, 1979, 1983; Donovan *et al.*, 1993) i *in vivo* (Crespi *et al.*, 2007, Koole, Bosker and van der Dussen, 1989; Borstlap *et al.*, 1990) da koštani graftovi orofacijalnih membranoznih kostiju kao što su maksila i mandibula stvaraju veći volumen kosti, a ćelije izolovane iz maksile i mandibule imaju veći potencijal osteogene diferencijacije, bolji proliferativni kapacitet i manji adipogeni potencijal od ćelija izolovanih iz dugih i ilijačnih kostiju i rebara (Matsubara *et al.*, 2005; Akintoye *et al.*, 2006). Ovo ih samim tim čini boljim izvorom matičnih ćelija u intervencijama koje iziskuju nadoknadu koštanog tkiva. Uočene funkcionalne razlike se mogu objasniti njihovim različitim poreklom; naime koštano tkivo orofacijalnog regiona je neuroektodermalnog porekla, tačnije vodi poreklo od nervnog grebena, dok su ostale ispitivane kosti (tibija, fibula, femur, rebra, bedrene kosti) mezodermalnog porekla (Akintoye *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2009), što je dokazano i fenotipskim razlikama orofacijalnih BMSC u odnosu na BMSC tibije, femura, rebara i ilijačne kosti (Igarashi *et al.*, 2007). Time je podržan raniji zaključak da matične ćelije iz različitih izvora imaju različite regenerativne karaktersitike, koje su specifične za dato izvorno tkivo i koje odgovaraju njegovim potrebama (Chai *et al.*, 2000).

Do danas, adultne mezenhimalne matične ćelije izolovane su gotovo iz svih tkiva.

## 1.2. Mezenhimalne matične ćelije poreklom iz zubnih tkiva

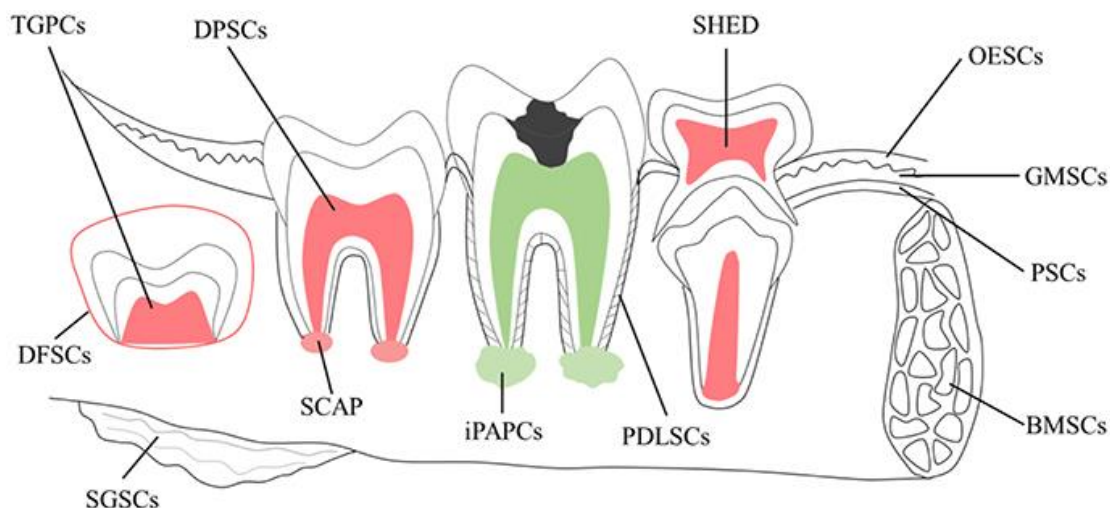
U tkivnom inženjeringu sve interesantnije postaju i dentalne matične ćelije (DMĆ), kako zbog lake dostupnosti, lake izolacije i kultivacije, tako i zbog sličnosti sa MMĆ poreklom iz koštane srži. DMĆ su populacija MMĆ ektomezenhimalnog porekla sa mogućnošću samoobnavljanja, proliferacije i diferencijacije u veliki broj specijalizovanih ćelija koje potiču od mezenhima tako i tkiva drugog porekla (transdiferencijacija). Ove ćelije igraju ključnu ulogu u održavanju homeostaze i reparaciji tkiva zuba (Huang, Gronthos and Shi, 2009; Rodríguez-Lozano *et al.*, 2011; Zhao and Chai, 2015; Gong *et al.*, 2016). Izolacija DMĆ prvi put je opisana 2000.god. kada su Gronthos i saradnici izdvojili MĆ iz pulpe stalnih zuba (Gronthos *et al.*, 2000). Postoji više vrsta MĆ zubnih tkiva koje mogu biti izolovane u različitom periodu razvoja zuba. DMĆ mogu voditi poreklo od tkiva zubnog zametka ili od zrelih zubnih tkiva.

Ćelije poreklom od zubnog zametka se mogu podeliti na MĆ poreklom od dentalnog epitela (gledni organ) i MĆ poreklom od dentalnog mezoderma (dentalni folikul i apikalna papila). Gledni organ se sastoji od epitelnih MĆ, odnosno prekursora ameloblasta, ćelija koje stvaraju gledno tkivo. Gledni organ sa epitelnim matičnim ćelijama nestaje nakon nicanja zuba, dok MĆ poreklom iz mezodermalnih tkiva zubnog zametka se mogu izolovati iz apikalne papile i folikula zuba i nakon njegovog nicanja.

MMĆ poreklom iz zubnih tkiva (slika 2) su do sada izolovane (po redosledu opisivanja u literaturi) iz: pulpe stalnih zuba – *DPSC* (Gronthos *et al.*, 2000), pulpe mlečnih zuba- *SHED* (Miura *et al.*, 2003), periodontalnog ligament – *PDLSC* (Seo *et al.*, 2004a), dentalnog folikula - *DFSC* (Morsczeck, Götz, *et al.*, 2005) i apikalne papile – *SCAP* (Sonoyama *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008). Poslednjih godina istraživanja MĆ usne duplje su intenzivirana pa su ovoj primarnoj klasifikaciji dodate još MMĆ poreklom iz zubnog zametka – *TGPCs* (Yalvac *et al.*, 2010), matične ćelije izolovane iz gingive – *GSC* (Fournier *et al.*, 2010; Mitrano *et al.*, 2010), pljuvačnih žlezda – *SGSCs* (Rotter *et al.*, 2008), oralnog epitela *OESCs* (Nakamura *et al.*, 2003), BMSC maksile i mandibule (Matsubara *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2009), kao i progenitorne ćelije obolelog tkiva: periapikalnog inflamatornog procesa – *iPAPCs* (Liao *et al.*, 2011).

Osim izuzetne pristupačnosti, multipotentnosti i lake manipulacije, ove ćelije su interesantne i sa aspekta porekla. Ektomezenhimalno poreklo ovih ćelija upravo omogućava da se one u određenim uslovima, osim u tkiva mezenhimalnog porekla (dentinogenu, cementogenu, odontogenu, adipogenu, osteogenu, miogenu, hondrogenu lozu), diferenciraju i u tkiva ektodermalnog porekla (transdiferencijacija) kao što je nervno tkivo. Ova sposobnost ih čini izuzetno zanimljivim u smislu primene u neuroregenerativnim procedurama kod različitih neuroloških oboljenja. Sem toga, u literaturi su opisani pozitivni ishodi aplikacije DMĆ kako na humanim tako i na životinjskim modelima kardiovaskularnih, mišićnih, bubrežnih, autoimunih i drugih oboljenja.

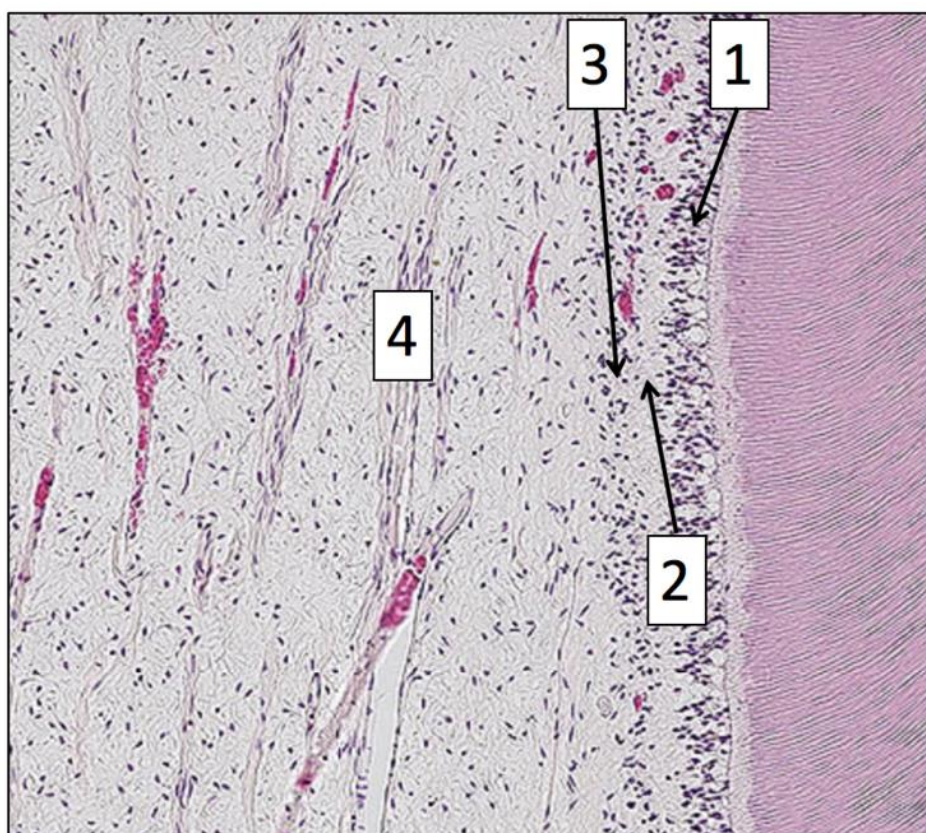
U literaturi je takođe opisano da ove ćelije zadržavaju multipotentnost nakon kratke i duge krioprezervacije, što je od velikog značaja za njihovu buduću kliničku primenu u regenerativnim terapijama (Hilkens *et al.*, 2016).



**Slika 2.** Izvori dentalnih matičnih ćelija. (Preuzeto (B. Yang *et al.*, 2017))

### 1.2.1. Matične ćelije poreklom iz pulpe stalnih zuba

Pulpa zuba predstavlja meko vezivno tkivo sa velikim brojem različitih ćelija. Histološki, podeljena je u četiri regiona: u prvom se nalaze odontoblasti, formativne ćelije dentina, zatim zona siromašna ćelijama ili acelularna zona, zona bogata ćelijama i na kraju centralna zona u kojoj se nalaze krvni sudovi i nervi (slika 3).



**Slika 3.** Histološki preparat tkiva pulpe stalnog zuba; 1-zona odontoblasta, 2-ancelularna zona, 3-zona bogata ćelijama, 4-centralna zona. (Preuzeto: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pulp\\_Histology\\_.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pulp_Histology_.png))



U zoni bogatoj ćelijama se nalaze MMC sa sposobnošću brze i lake diferencijacije u odontoblaste, ali i u zrele ćelije ostalih mezenhimalnih tkiva. Uloga MMC pulpe je u homeostazi, stvaranju tkiva i zameni oštećenih ćelija (Suchánek *et al.*, 2007). Nakon povrede ili traume, u slučaju da su odontoblasti oštećeni, ove ćelije se brzo diferenciraju u odontoblastima slične ćelije i proizvode tkivo slično dentinu, takozvani reparatorni dentin. Posebno su interesantne niše MMC u pulpi zuba; dokazano je postojanje više ovih trodimenzionalnih mikrosredina u pulpi naseljenih matičnim ćelijama. Niše su pre svega opisane u zoni bogatoj ćelijama, ali i u neposrednoj perivaskularnoj zoni, odnosno u centralnom delu pulpe.

MMC iz pulpe zuba (Dental Pulp Stem Cells - DPSCs) su heterogena grupa MMC sa velikom sposobnošću samoobnavljanja i multipotentnošću; prvi put su izolovane 2000. godine. Ove ćelije su u mnogome slične MMC iz koštane srži. I jedne i druge su okružene čvrstim tkivom, i isto tako, i jedne i druge mogu da stvaraju zrele ćelije sa sposobnošću mineralizacije.

Proliferacija i diferencijacija MC pulpe zavisi kako od starosti pacijenta tako i od zuba iz kojih su ove ćelije izolovane. Tako je u literaturi opisano da su ćelije pulpe izolovane iz umnjaka sa aspekta kinetike diferencijacije i proliferacije u prednosti u odnosu na ćelije premolara. Ovo se pripisuje njihovim različitim nivoima ekspresije CD271 markera i različitoj dužini telomera.

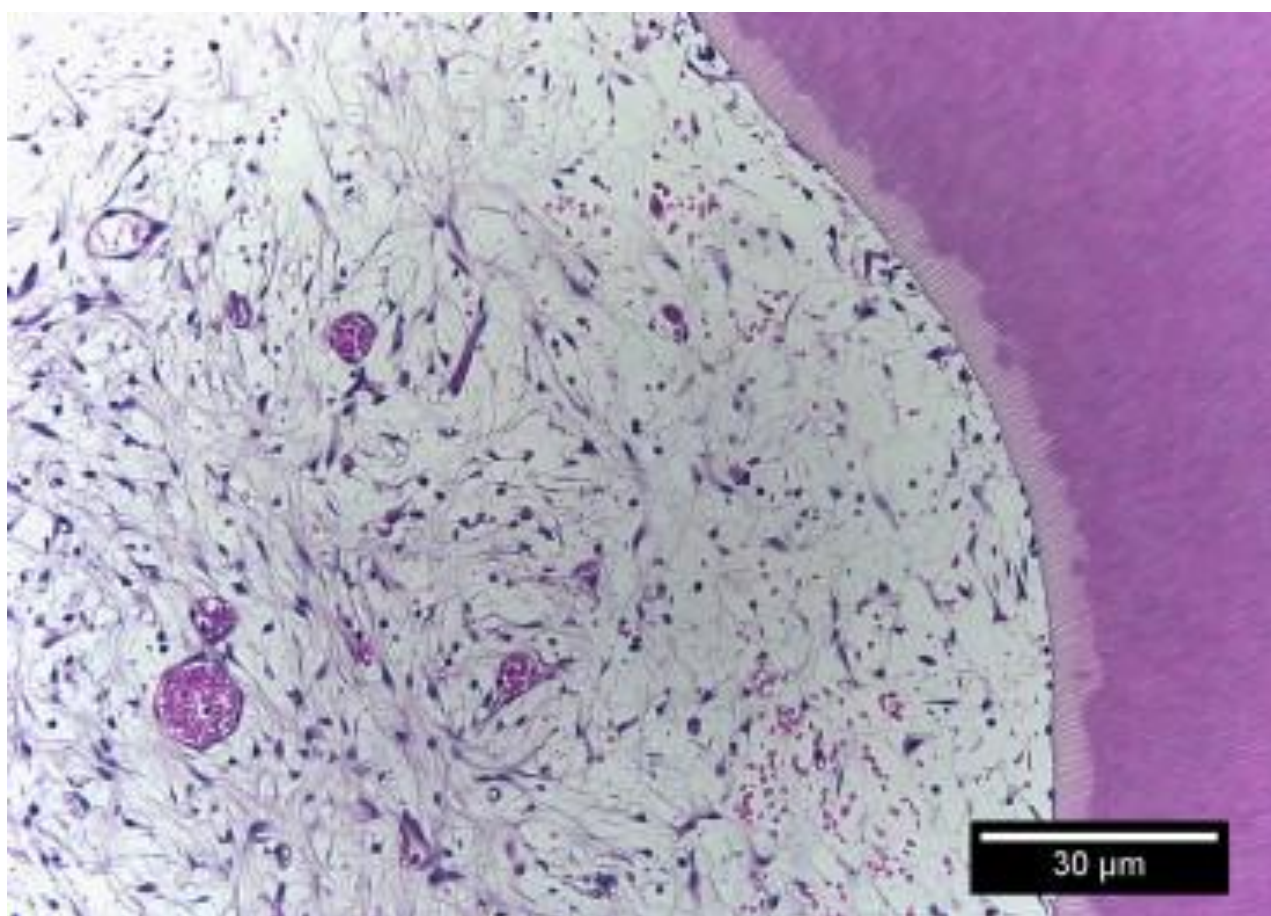
Dokazana je sposobnost DPSC da se diferenciraju u aktivne neurone, kardiomiocite, miocite, melanocite i hepatocite slične ćelije (Arthur *et al.*, 2008; Stevens *et al.*, 2008; Armiñán *et al.*, 2009; Ishkitiev *et al.*, 2010; Patil *et al.*, 2014; Heng *et al.*, 2016).

Ove su ćelije korišćene u brojnim istraživanjima u cilju njihove buduće primene u regenerativnoj terapiji različitih oboljenja van oralne regije. Pokazan je njihov veliki regenerativni potencijal u terapiji epitela kornje, retine i drugih bolesti oka (Syed-Picard *et al.*, 2015; Kushnerev *et al.*, 2016; Mead *et al.*, 2016, 2017), povrede kičmene moždine (Sakai *et al.*, 2012; C. Yang *et al.*, 2017), cerebralne ishemije (Sugiyama *et al.*, 2011; Leong *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018), Alchajmerove (Apel *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2017) i Parkinsonove bolesti (Nesti *et al.*, 2011), fibroze jetre (Cho *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016), infarkta miokarda (Gandia *et al.*, 2008a), mišićne distrofije (Pisciotta *et al.*, 2015; Martínez-Sarrà *et al.*, 2017), dijabetesa (Kanafi *et al.*, 2013; Datta *et al.*, 2017) i drugih bolesti.

### 1.2.2. Matične ćelije iz pulpe mlečnih zuba

Imajući u vidu razlike između mlečnih i stalnih zuba, a pogotovo kvalitativne razlike u pogledu tkivne organizacije i funkcije, jasno je da matične ćelije poreklom iz mlečnih zuba poseduju određene specifičnosti u odnosu na MC iz stalnih zuba (slika 4). Matične ćelije pulpe mlečnih zuba (Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth - SHED) prvi put su izolovane i opisane 2003. godine, kao populacija ćelija sa velikim klonogenim potencijalom, brzom proliferacijom i sposobnošću diferencijacije u različite ćelije uključujući i ćelije nervnog tkiva, adipocite, hondrocite i odontoblaste (Miura *et al.*, 2003). MC iz pulpe mlečnih zuba ekspimiraju neuralne i glijalne markere što se dovodi u vezu sa poreklom pulpe zuba odnosno nervnim grebenom. Takođe, pokazuju izrazitu heterogenost prilikom formiranja kolonija, a imaju i različite nivoe osteoprogenitorne i odontoprogenitorne populacije matičnih ćelija.

U poređenju sa DPSCs, SHED pokazuju veću stopu proliferacije, sposobnost formiranja sfera i osteoinduktivni potencijal *in vivo*, ali odsustvo sposobnosti formiranja pulpodentinskog kompleksa, što ukazuje da su MĆ poreklom iz pulpe mlečnih zuba nezrelije od prethodno izolovanih vrsta stromalnih MĆ (Miura *et al.* IURA 2003, Suchánek *et al.*, 2007). Poredeći ćelije pulpe mlečnih zuba sa MĆ iz pulpe stalnih zuba i koštane srži, dokazan je veći stepen matičnosti MĆ iz pulpe mlečnih zuba (Nakamura *et al.*, 2009). Takođe, nakon transplantacije MĆ iz pulpe mlečnih zuba sa ciljem regeneracije mandibularnih defekata kod pasa, poredeći sa kontrolnom grupom kod kojih je usmesto MĆ korišćen kolagenski skafold, nisu ustanovljene razlike u kvalitetu i količini spongiozne i kompaktne kosti, kao ni u vezivnom tkivu između eksperimentalne i kontrolne, niti da se u periodu od tri meseca pojavljuju neželjeni efekti transplantacije MĆ kao što su maligniteti i druge abnormalnosti. (Behnia, 2014).



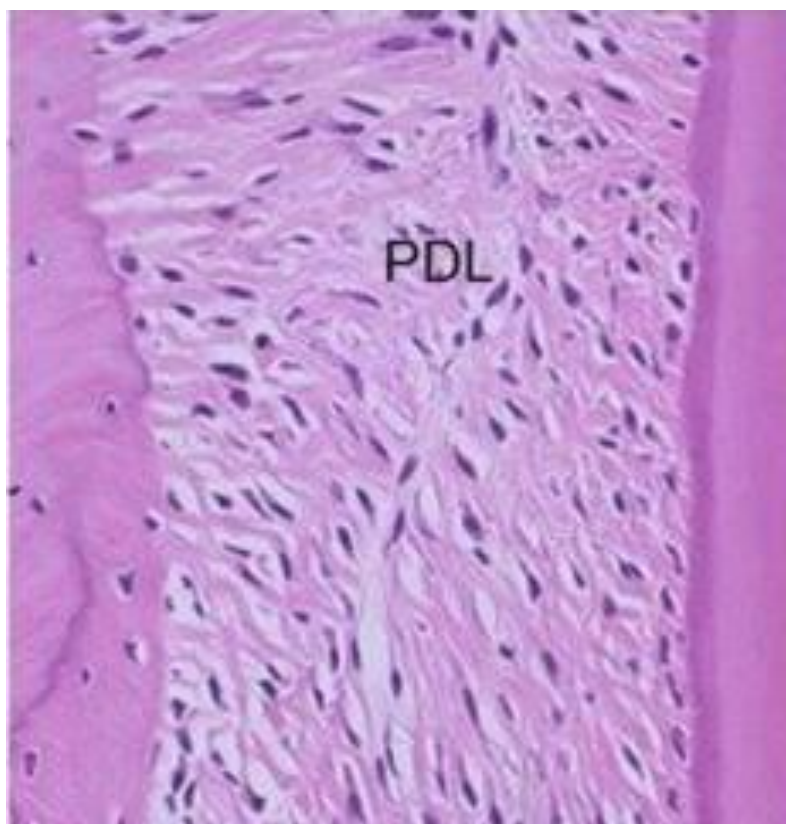
**Slika 4.** Histološki preparat tkiva pulpe mlečnih zuba (Preuzeto (Rosa, 2013))

Laka izolacija i pristupačnost ovih ćelija, nepostojanje etičkih problema, multipotentnost, kao i njihov dovoljan broj za potencijalnu kliničku upotrebu čini ih naročito interesantnim u tkivnom inženjeringu. Deluju kao obećavajući izvor ćelija za reparaciju zubnih struktura, regeneraciju kosti, čak i terapiju nervnih oštećenja i degenerativnih oboljenja.

U literaturi je do sada opisan značajan regenerativni potencijal SHED u terapiji povrede kičmene moždine (Sakai *et al.*, 2012; Taghipour *et al.*, 2012; Nicola *et al.*, 2017), i Parkinsonove bolesti (Wang *et al.*, 2010; Fujii *et al.*, 2015). Takođe, postignuti su rezultati i u terapiji fibroze jetre (Yamaza *et al.*, 2015), mišićne distrofije (Kerkis *et al.*, 2008), dijabetesa (Kanafi *et al.*, 2013), u regeneraciji kornee (Gomes *et al.*, 2010) i terapiji autoimunih oboljenja kao što je sistemski lupus (Yamaza *et al.*, 2010).

### 1.2.3. Matične ćelije poreklom iz peridontalnog tkiva

Periodoncijum odnosno periodontalni ligament (PDL) je meko vezivno tkivo koje se nalazi između cementa zuba i alveolarne kosti; ima ulogu u potpori i ishrani zubnih tkiva, tkivnoj homeostazi i regeneraciji koštanog i cementnog tkiva (slika 5). Matične ćelije poreklom iz periodoncijuma (Periodontal Ligament Stem Cells - PDLSCs) prvi put su opisane 2004. godine, a zatim je pokazana i njihova uloga u regeneraciji, ne samo periodontalnog tkiva, već i koštanog i cementnog tkiva parodoncijuma (Seo *et al.*, 2004b, 2005). Dokazano je da na svojstva ovih ćelija značajno utiče sa koje površine su uzorkovane ćelije; naime ćelije koje su bile okrenute ka alveolarnoj kosti pokazale su superiornu sposobnost diferencijacije u koštano tkivo, dok su se ćelije okrenute ka cementu zuba, lakše i uspešnije diferencirale u cementoblaste (Wang *et al.*, 2011).

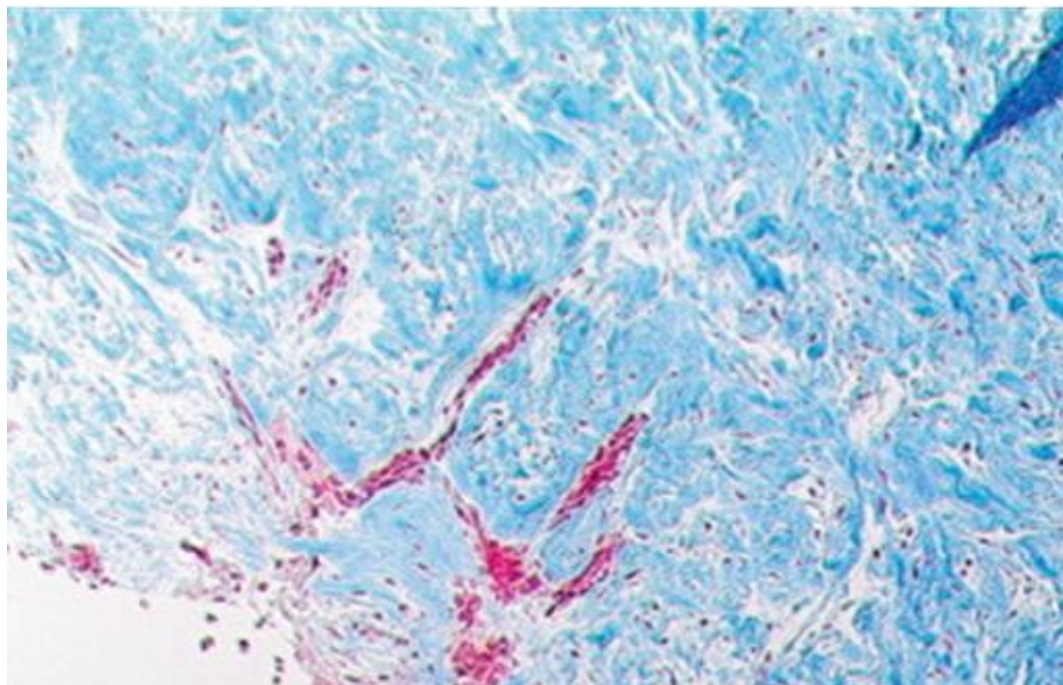


**Slika 5.** Histološki preparat tkiva periodontalnog ligamenta (Preuzeto (Yashiro *et al.*, 2014))

Navedeno istraživanje podržava zaključak da se u heterogenu ćelijsku populaciju periodoncijuma ubrajaju i ćelije prekursori koštanog i cementnog tkiva (Seo i sar., 2004). PDLSC su pokazale sposobnost *in vitro* diferencijacije u koštano i masno tkivo i sposobnost regeneracije periodoncijuma; takođe, u *in vivo* uslovima, ispoljavaju kapacitet diferencijacije u cementno tkivo. Kasnije je pokazana uspešna diferencijacija u nervne i hrskavičave ćelije (Gay, Chen and MacDougall, 2007; Techawattanawisal *et al.*, 2007). PDLSC poseduju i imunomodulatorne karakteristike i eksprimiraju mezenhimalne markere matičnosti uz odustvo hematopoetskih (Gay, Chen and MacDougall, 2007; Kim *et al.*, 2010).

#### 1.2.4. Matične ćelije iz dentalnog folikula

Meko rastresito tkivo koje okružuje zametak zuba pre nicanja, a pruža se kao vrećica oko krunice zuba, pripajajući se za budući anatomski vrat zuba, naziva se zubni folikul.



**Slika 6.** Histološki preparat tkiva dentalnog folikula (Preuzeto (Morsczeck, 2015))

Ovo razvojno tkivo bogato je ćelijama prekursorima cementoblasta, osteoblasta kao i ćelijama koje će formirati periodoncijum. Matične ćelije dentalnog folikula (DFSCs - dental Follicle Stem Cells) u literaturi se prvi put opisuju 2005, kada su izolovane iz folikula umnjaka (Morsczeck, Götz, *et al.*, 2005). DFSC pokazuju karakteristike MMC, odnosno eksprimiraju površinske mezenhimalne markere (CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49d, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166), uz odsustvo hematopoetskih markera (Lindroos *et al.*, 2008; Estrela *et al.*, 2011). Imaju izraženu sposobnost proliferacije, a pod odgovarajućim stimulusima uspešno se diferenciraju u osteoblaste, hondroblaste, adipocite i neurone (Yao *et al.*, 2008; Yalvac *et al.*, 2009, 2010).

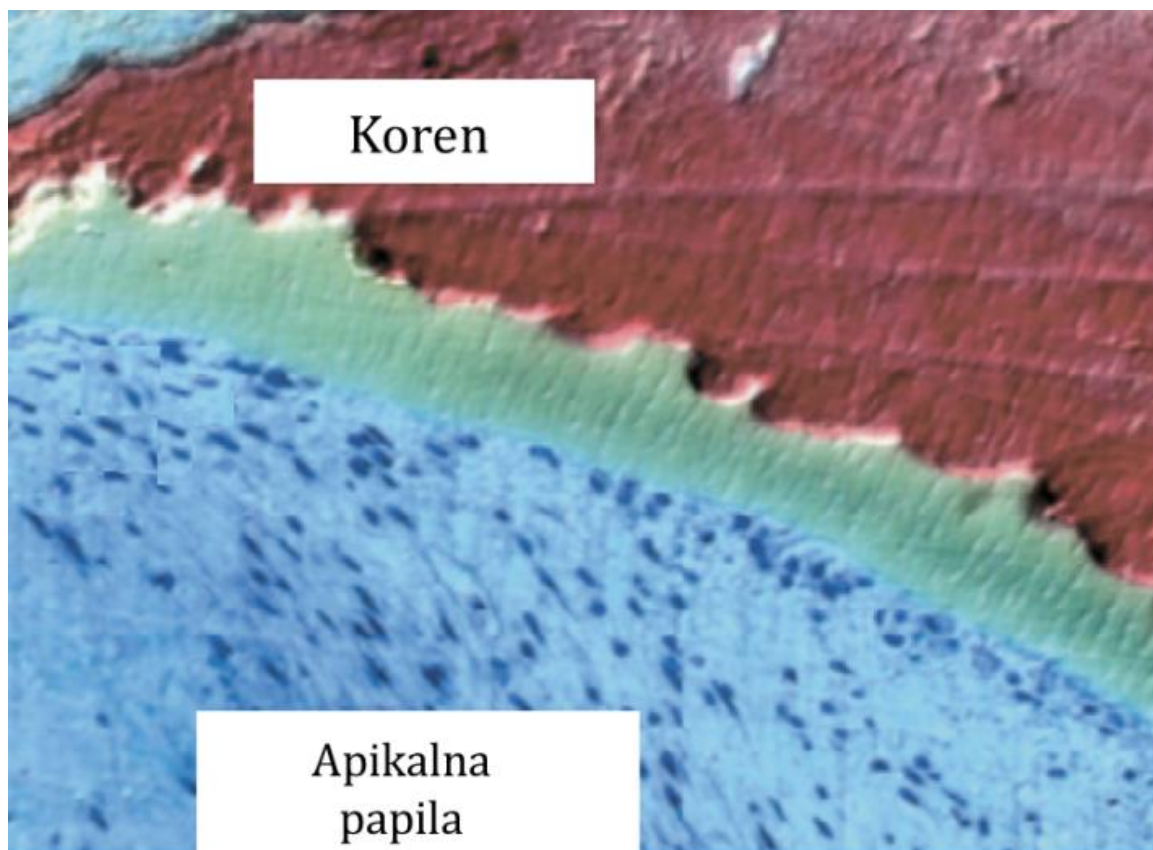
Dentalni folikul je tkivo u razvoju, pa se smatra da MĆ koje potiču iz dentalnog folikula, s obzirom na njihovu manju zrelost, a samim tim i veću plastičnost, predstavljaju izrazito kvalitetan izvor matičnih ćelija (Volponi, Pang and Sharpe, 2010).

Imajući u vidu njihov imunomodulatorni efekat, između ostalog i zahvaljujući lučenju TGF- $\beta$  i IL-6, smatraju se idealnim kandidatima za lečenje hroničnih inflamatornih oboljenja (Liu *et al.*, 2015).

U literaturi je opisano da DFSC mogu da se gaje u medijumu bez seruma duži vremenski period, nakon čega će poprimiti karakteristike neuroprogenitornih ćelija, čemu doprinosi njihovo ektomezehimalno poreklo od nervnog grebena (Morsczeck, Moehl, *et al.*, 2005). Dokazano je i da DFSC u odgovarajućim uslovima, zasejane na nosače sa dentinskim matriksom, a zatim transplantirane u alveolarne fose, mogu da formiraju koren zuba (Sun *et al.*, 2017), te se s toga smatraju idealnim kandidatima u bioinženjeringu koštanog tkiva, ali i celokupnog potpornog aparata zuba (Guo, Chen, *et al.*, 2012; Guo, Gong, *et al.*, 2012; C. Yang *et al.*, 2017).

### 1.2.5. Matične ćelije apikalne papile

Apikalna papila je meko vezivno tkivo koje se nalazi na vrhu korena sa nezavršenim rastom; predstavlja tkivo zuba u razvoju, a 95% ćelijske populacije čine ćelije sa karakteristikama matičnosti (Stem Cells from Apical Papilla- SCAP) (Sonoyama *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008) (slika 7). Mezodermalne ćelije lako se mogu izolovati iz apikalne papile, najčešće impaktiranog ili neizniklog trećeg molara, obično izvađenog iz ortodontskih razloga. Iako slične DPSC, ćelije apikalne papile poseduju karakteristike manje diferenciranih ćelija. Pored toga, proteoglikani su u većoj meri zastupljeni u apikalnoj papili u odnosu na DPSC, olakšavajući time histološko razlikovanje pulpnog tkiva od tkiva apikalne papile (Huang *et al.*, 2008; Sonoyama *et al.*, 2008).



**Slika 7.** Histološki preparat apikalne papile ( Preuzeto (Huang *et al.*, 2008))

Iako povezane, pulpa i apikalna papila poseduju različite populacije MMĆ. Dokazano je da SCAP eksprimiraju veći broj mezenhimalnih markera (CD49d, CD51/61, CD56, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166), uz ekspresiju markera karakterističnog za SCAP-a, CD24, koji nije prisutan ni kod DPSCs, a ni kod BMSCs (Rodríguez-Lozano *et al.*, 2011). Takođe, pokazuju različitu sposobnost odontogene, neurogene, osteogene i hondrogene diferencijacije u poređenju sa ostalim DMĆ,

MĆ apikalne papile nisu samo deo pulpo-dentinskog kompleksa već su od esencijalne uloge u izgradnji alveolarne kosti i korena zuba (Sonoyama *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2013).

U literaturi se navodi i podvrsta MĆ iz apikalne papile, označenih kao dentalne progenitorske matične ćelije nervnog grebena (dental Neural Crest derived - progenitor cells, dNC-PCs) koje se smatraju izvorom primarnih odontoblasta, dok dentin koji se stvara u toku reparacije i regeneracije proizvode od odontoblasti poreklom od matičnih ćelija pulpe (DPSCs i SHED) (Diekwisch, 2001).

Za matične ćelije apikalne papile je posebno interesantno da i bez neurogene stimulacije eksprimiraju rane neurogene markere kao što su NeuN, Nestin, GFAP, Neurofilament M, GAD i Beta III tubulin (Abe, Yamaguchi and Amagasa, 2007). Ove ćelije pokazuju minimalnu imunogenost, a imaju i imunosupresivne karakteristike, s obzirom da smanjuju proliferaciju T limfocita. Mogu se relativno jednostavno krioprezervirati, a ovaj postupak je bez uticaja na njihova imunomodulatorna svojstva (Tasli et al 2016).

### 1.2.6. Matične ćelije poreklom iz zubnog zametka

Zubni zametak bogat je različitim matičnim ćelijama, prekursorima ćelija koje stvaraju zubna tkiva. Ove matične ćelije (Tooth Germ Stem Cells - TGSCs) opisane su kao ćelije sa izrazito visokom proliferacijom. Izolovane su iz zametka trećeg molara kod dece i adolescenata (Ikeda *et al.*, 2008; Yalvac *et al.*, 2010). Kao i ostale matične ćelije zubnih tkiva pokazuju znake multipotentnosti, odnosno sposobnost osteo-, hondro- i adipodiferencijacije. U literaturi je opisano i uspešno diferenciranje u nervnu i mišićnu lozu (Yalvaç *et al.*, 2011; Taşlı *et al.*, 2016).

TGSCs ne eksprimiraju hematopoetske, a eksprimiraju mezenhimalne markere (CD-166, CD-105, CD-90, CD-73, CD-29) (Gronthos *et al.*, 2002; Suchánek *et al.*, 2007; Ikeda *et al.*, 2008). Pokazuju imunomodulatorne karakteristike, pa su tako transplantirane humane ćelije zubnog zametka kod pacova imale imunosupresivni efekat (Guzmán-Uribe *et al.*, 2013).

### 1.3. Dentalne MĆ u regenerativnoj terapiji

Regenerativna terapija je metoda kojom se regenerišu i zamenjuju humane ćelije, tkiva i organi, kako bi se obnovila i uspostavila njihova normalna funkcija (Mason and Dunnill, 2008). Po shvatanju Klein-a i Nor-a, regeneracija i reparacija organa su sveti gral moderne biomedicine (Klein and Nör, 2015).

Tkivni inženjering predstavlja metodu lečenja korišćenjem nosača, tzv „scaffold-a“ i bioaktivnih molekula, pre svega faktora rasta, u cilju regeneracije ili reparacije delova ili celih tkiva (Langer and Vacanti, 1993). Langer i Vacanti su definisali tkivni inženjering kao interdisciplinarno polje koje primenjuje metode inženjeringa u medicine, uz razvoj bioloških zamenika koji obnavljaju, poboljšavaju ili zamenjuju funkciju organa ili ceo organ. Pojam regenerativne terapije iako često korišćen kao sinonim tkivnom inženjeringu, podrazumeva upotrebu matičnih ćelija sa ciljem regeneracije tkiva. Moderni koncept ovog oblika terapije predstavljen je upotrebom kombinacije matičnih ćelija, faktora rasta i raznih biomaterijala u vidu nosača ili biomembrana. Osim postizanja željene diferencijacije, na uspeh regenerativne terapije utiće i mogućnost kontrolisanja nepovoljnih faktora, kao što su bakterijske infekcije, inflamacija i povreda tkiva tokom restaurativne hiruške intervencije (Lanza, Langer and Vacanti, 2013). Značaj upotrebe MĆ Heil i saradnici su objasnili time da se MĆ u terapiji ne ponašaju kao „hardver“, već kao „softver“, uspostavljajući ravnotežu između procesa degeneracije i regeneracije. Zahvaljujući njihovom parakrinom efektu i izaženoj sposobnosti lokalne sekrecije citokina uspešno stimulišu regenerativne procese (Heil *et al.*, 2004).

Klinička ispitivanja modaliteta lečenja pomoću MMC se svakim danom sve više intenziviraju jer je terapijski potencijal ovih ćelija očigledan (Slika 8). U kliničkim istraživanjima najpre su korišćene MMC iz koštane srži. Nakon što je otkriven potencijal DMĆ za proliferaciju, diferencijaciju, angiogenezu, neurogenezu i dr., kao i njihove imunomodulatorne karakteristike, DMĆ su se učinile superiornim izvorom MĆ u odnosu na BMSCs, posebno u terapiji imunih i inflamatornih oboljenja. Objavljena su brojna istraživanja u kojima su u terapiji sistemskih oboljenja korišćene DPSC, SHED i ostale DMĆ.

### **1.3.1. Prekliničke studije efikasnosti upotrebe dentalnih matičnih ćelija u regenerativnoj terapiji**

#### **1.3.1.1. Mišićne distrofije**

Dišenova mišićna distrofija je jedno od najučestalijih teških mišićnih distrofija koje su uzrokovane recesivnim mutacijama u genu za distrofin, koji se nalazi na X hromozomu.

Kerkis i saradnici su upotrebom MĆ iz mlečnih zuba kod zlatnih retrivera obolelih od Dišenove mišićne atrofije pokazali da SHED mogu da se inkorporiraju, diferenciraju i opstanu u tkivu domaćina, a klinički efekat ovakve terapije je bio značajan; uspeh je u najvećoj meri pripisan imunomodulatornom efektu MĆ (Kerkis *et al.*, 2008).

U studiji koja je kasnije objavljena, pokazano je da se i DPSC, prethodno prediferencirane ka miogenoj lozi, transplantirane u mišić gastroknemijus mdx/SCID miša, uspešno inkorporiraju u mišićna vlakna koja ekspimiraju distrofin, regenerišući ih. Ovaj efekat objašnjen je time da transplantirane DPSC potpomažu angiogenezu, redukuju pojavu fibroze parakrinim efektom čime se ublažava histopatologija distrofičnog mišića (Pisciotta *et al.*, 2015).

#### **1.3.1.2. Dijabetes**

Autologe DMĆ transplantirane u miševе sa veštački izazvanim dijabetesom, nakon naseljavanja tkiva pankreasa, diferencirale su se u ćelije pankreasa, formirajući karakteristična Langerhansova ostrvca. Miševi su nakon toga povratili normoglikemiju (Govindasamy *et al.*, 2011; Kanafi *et al.*, 2013) (Govindasamy *et al.*, 2011; Guimarães *et al.*, 2013). U literaturi je pokazano da DMĆ, pogotovo DPSC i SHED imaju povoljan uticaj u kontroli komplikacija dijabetesa, posebno renalne disfunkcije i dijabetične neuropatije (Guimarães *et al.*, 2013). Kod pacova sa dijabetesom pokazan je imunomodulatorni efekat ovih ćelija koji može biti od posebnog značaja u terapiji dijabetične polineuropatije (Omi *et al.*, 2016).

Datta i saradnici poredeći načine administracije DMĆ u terapiji dijabetesa, pokazali su da je najbolji efekat postignut ponovljenom intramuskularnom transplantacijom DPSC (Datta *et al.*, 2017).

#### **1.3.1.3. Oboljenja jetre**

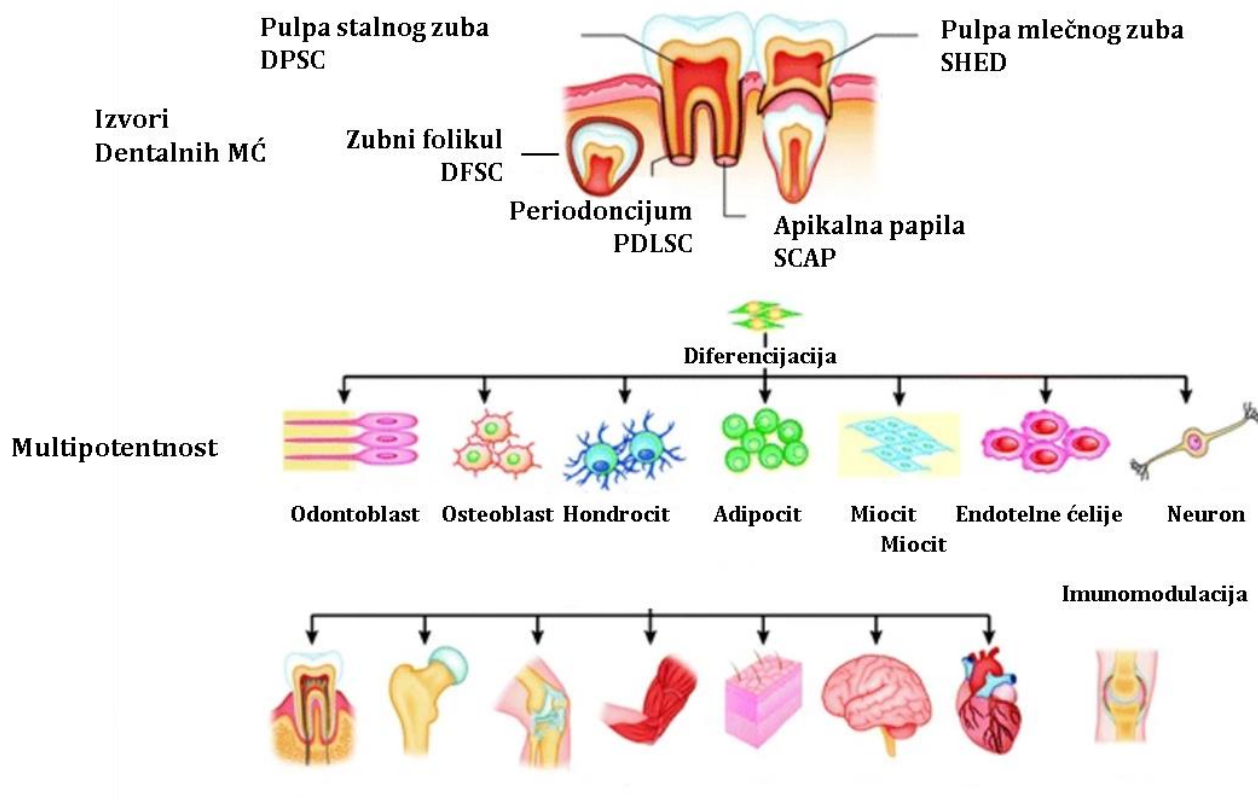
DMĆ imaju sposobnost diferencijacije u hepatocitima slične ćelije (hepatocyte - like cells). Nakon transplantacije SHED u miševе tretirane ugljenim hloridom, CCl<sub>4</sub>, obnovljena je funkcija jetre. MĆ nakon transplantacije poprimaju karakterističnu morfologiju hepatocita, sekretuju humani albumin i ureu u oštećeno tkivo jetre, čime je pokazan regenerativni uticaj SHED i povoljan efekat u smislu smanjenja fibroze jetre (Yamaza *et al.*, 2015).

U radovima je opisan značajan pozitivan efekat i DPSC u lečenju fibroze, te se nakon terapije DMĆ uočava normalizacija nivoa alanin transaminaza, aspartat transaminaza i amonijaka.

#### **1.3.1.4. Očna oboljenja**

Kako je navedeno u novijim istraživanjima, matične ćelije izolovane iz zubnih tkiva imaju sposobnost da se diferenciraju u keratocite i ganglijske ćelije retine (Monteiro *et al.*, 2009; Roozafzoon *et al.*, 2015; Syed-Picard *et al.*, 2015). DMĆ nakon transplantacije ispoljavaju zaštitni efekat u degenerativnim oboljenjima, glaukomu i slepilu izazvanom promenama rožnjače. Smatra

se da DMĆ igraju ulogu u sprečavanju oštećenja mrežnjače i regeneraciji ganglijskih ćelija retine (F.N. *et al.*, 2015; Mead *et al.*, 2016, 2017).



**Slika 8.** Potencijal dentalnih matičnih ćelija u regenerativnoj terapiji (Preuzeto (Lee, Zhang and Le, 2014))

### 1.3.1.5. Infarkt miokarda

Dentalne matične ćelije pokazale su se korisnim i u terapiji infarkta miokarda. Osim diferencijacije u srčane mišićne ćelije, DMĆ imale su i važnu imunomodulatornu ulogu, smanjujući posledice zapaljenja, a takođe, stimulacijom angiogeneze i antiapoptskim faktorima pokazano je značajno smanjenje infarktne područja i poboljšanje srčane funkcije (Armiñán *et al.*, 2009).

### 1.3.1.6. Autoimuna oboljenja

Dentalne matične ćelije imaju potencijal u lečenju autoimunih oboljenja, zbog svojevrstnog imunomodulatornog efekta. Najznačajniji mehanizmi obuhvataju lučenje prostaglandina E2 (PGE2), indolamin 2, 3-dioksigenaze (IDO), transformišućeg faktora rasta TGF- $\alpha$ , i humanog leukocitnog antigena G5 (HLA-G5), kao i interakcije sa ćelijama odbrane (T i B limfociti, makrofage i dendritične ćelije) (Li *et al.*, 2014).

U *in vitro* studijama pokazano je da DPSC snažnije inhibišu proliferaciju T limfocita tj. imaju izraženiji immunosupresivni potencijal u odnosu na BMSC (Pierdomenico *et al.*, 2005). Takođe na modelu sistemskog lupusa, pokazano je da iSHED snažnije inhibiše T17 helper ćelije, što ove dve vrste DMĆ čini potencijalno najboljim izvorom MĆ za lečenje sistemskog lupusa eritematozusa (Yamaza *et al.*, 2010).



### 1.3.1.7. Orofacijalna oboljenja

DMĆ mogu biti od velike koristi u terapiji oralnih oboljenja, kao što su karijes, pulpitisi, nedostatak koštanog tkiva i oboljenja parodontijuma. Primećeno je da nakon transplantacije DPSC direktno u koren zuba pasa nakon pulpektomije dolazi do potpune pulpne regeneracije, odnosno do obnove nervnih i vaskularnih elemenata i formiranja novog dentina (Iohara *et al.*, 2011). Khorsand i saradnici su pokazali da SHED nakon intrakanalne transplantacije ne samo da dovode do obnove pulpnog tkiva i stvaranja novog dentina, već i do regeneracije periodoncijuma (Khorsand *et al.*, 2013). Jamada i saradnici ispitivali su mogućnost regeneracije alveolarne kosti sa autolognim matičnim ćelijama iz pulpe mlečnih i stalnih zuba na psećem modelu periodontitisa, koristeći plazmu bogatu trombocitima zajedno sa DMĆ. Primećeno je stvaranje nove kosti sa novim krvnim sudovima, a implantati ugrađeni u regenerisanu kost su se uspešno integrisali u koštane strukture (Yamada *et al.*, 2013). Takođe, MĆ izolovane iz dentalnog folikula mogu biti ćelije izbora u terapiji koštanih defekata i nedostatka koštanog tkiva. U istraživanju u kom su veštački napravljeni defekti na kalvariji imunodeficientnih miševa, pokazano je da DFSC stimulišu regeneraciju koštanog tkiva i efikasno zatvaraju koštani defekt uz neovaskularizaciju nakon četiri nedelje (Honda *et al.*, 2010, 2011). Tian i saradnici su pokazali da DFSC zasejane na dentinskom skafoldu i transplantirane u mikrosredinu zubne alveole imaju sposobnost formiranja korena zuba. Do ovog rezultata ne dolazi u slučajevima kad se ovako pripremljene ćelije transplantiraju u lobanju, što ukazuje na važnost mikrosredine (Sun *et al.*, 2017).

U modernoj stomatologiji dentalni implantati su najpouzdanije i najpraktičnije rešenje gubitka zuba. S obzirom na njihove nedostatke, kao što su nepostojanje potpornog tkiva, veštačka veza između koštanog tkiva i implantata, kao i nedostatak prirodnih kontura alveolarnog grebena, razumljiva je težnja za bioinženjeringom čitavog zuba. Pokazano je da se zubna tkiva organizovana u strukture slične zubima mogu formirati korišćenjem MĆ izolovanih iz ranih stadijuma zubnih zametaka (Young *et al.*, 2002; Duailibi *et al.*, 2004) (Nakao *et al.*, 2007). U kasnijim istraživanjima u kojima su korišćene MĆ zubnog zametka dobijene su zubne strukture bez gleđi (Honda *et al.*, 2006; Kuo *et al.*, 2008).

Sonoyama i saradnici uspeali su da dobiju bio-koren sa okružujućim periodontalnim tkivom, koristeći SCAP i PDLs koje su transplantirane u alveolarnu fosu svinja. Histološkom analizom nakon tri meseca od transplantacije uočeno je da stvoreni dentin nije bio pravilne strukture, odnosno nije uočeno prisustvo dentinskih kanalića, ali se oko njega formiralo tkivo parodontijuma (Sonoyama *et al.*, 2006).

### 1.3.1.8. Povrede kičmene moždine i neurološka oboljenja

Matične ćelije dentalnog porekla mogu biti značajan izvor ćelija za terapije neuroloških oboljenja i povreda, prevashodno zbog njihovog porekla od nervnog grebena, sličnosti sa progenitorima neuralnih ćelija, ali i njihovoj dostupnosti i u adultnom periodu. Brojna istraživanja ukazuju na veliki terapeutski potencijal DMĆ u lečenju neurodegenerativnih stanja i oboljenja.

#### 1.3.1.8.1. Povrede kičmene moždine

Nessraat i saradnici su prvi pokazali prednosti upotrebe ovih ćelija kod povrede kičmene moždine (PKM), koji se prevashodno ogledao u zaštiti motoneurona (Nosrat *et al.*, 2001). U studijama u kojima su korišćene DPSC i SHED pokazan je značajan boljitak i funkcionalni

oporavak kod povrede kičmene moždine nakon transplantacije ovih MĆ (Sakai *et al.*, 2012; Taghipour *et al.*, 2012; C. Yang *et al.*, 2017; Nicola *et al.*, 2017). Taghipour i saradnici su pokazali da matične ćelije iz pulpe mlečnih zuba imaju pozitivne efekte u terapiji PKM, posebno ukoliko su prethodno neuro-indukovane. Nakon neuroindukcije pokazuju bolju diferencijaciju u oligodendrocite i sekreciju neurotrofnih faktora u povređenom području (Taghipour *et al.*, 2012).

#### 1.3.1.8.2. Parkinsonova bolest

Kod oboljenja kao što je Parkinsonova bolest (PB) gde postoji gubitak dopaminergičkih neurona, intracerebralna transplantacija dopaminergičkih neurona i njihovih progenitora izolovanih iz fetalnih neuralnih tkiva, u literaturi je predstavljena kao obećavajući terapijski pristup (Wang *et al.*, 2011; Fujii *et al.*, 2015). Međutim, postoje istraživanja na eksperimentalnim modelima PB u kojima se pokušava postići terapijski efekat i primenom dentalnih matičnih ćelija. Tako na primer, koristeći SHED na modelu PB kod pacova, naučnici su opisali njihovu sposobnost da se diferenciraju u dopaminergičke neurone. Nakon transplantacije SHED kod pacova je zapaženo i bihevioralno poboljšanje (Wang *et al.*, 2011; Fujii *et al.*, 2015). Takođe je pokazano da DPSC ima veću neuroplastičnu moć u poređenju sa SHED-om (Datta *et al.*, 2017). Lakše i uspešnije se diferenciraju u dopaminergičke neurone, a ispoljavaju i zaštitni efekat od uticaja matriksnih metaloproteinaza i rotenona u životinjskim modelima PB (Nesti *et al.*, 2011).

#### 1.3.1.8.3. Alchajmerova bolest

Uloga DMĆ je ispitivana i u terapiji Alchajmerovog bolesti (AB) koju karakteriše smanjenje kognitivne funkcije i nakupljanje beta amiloidnih plakova u mozgu. DPSC su korišćene u *in vitro* studijama na primarnim kulturama hipokampalnih neurona i neurona ventralnog mezencefalona kao i na celularnim modelima AB (Apel *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2017). U studiji koja je ispitivala DPSC u ko-kulturi sa neuronima iz mezencefalona i hipokampusu, tretiranim beta amiloidnim peptidom ili 6-hidroksidopaminom, pokazano je značajno smanjenje toksičnosti i povećanje vijabilnosti neurona (Apel *et al.*, 2009). Wang i saradnici su pokazali da u ko-kulturi, DPSC ekspimiraju neuronski fenotip i produkuju neurotrofične faktore, kao što su NGF (nerve growth factor - neuralni faktor rasta), neurotrofični faktor glija ćelija, moždani neurotrofični faktor i BMP2 (bone morphogenetic protein 2 - koštani morfogenetski protein 2) (Wang *et al.*, 2017). Ovi autori su takođe dokazali smanjenje apoptoze i povećanu vijabilnost neurona kao posledicu terapijske primene DPSC na modelima AB. Obnovljeni neuroni su imali izraženije dendritske nastavke, gusto raspoređene mikrofibrile i mikrotubularne filamente, a takođe je pokazano da DPSC, zbog produkcije različitih faktora rasta, imaju sposobnost očuvanja nervnog tkiva (Wang *et al.*, 2017).

#### 1.3.1.8.4. Cerebralna ishemija

DPSC su pokazale veliki potencijal u tretmanu cerebralne ishemije. U modelu ishemije indukovane okluzijom srednje cerebralne arterije, DPSC su pored promovisanja funkcionalne revaskularizacije, uticale i na migraciju endogenih neuronskih progenitornih ćelija, indukovale vaskulogenezu i ublažavale oštećenja moždanog tkiva (Sugiyama *et al.*, 2011; Leong *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018). Uporednom analizom terapijskog efekta DPSC i BMSC nakon intravenske transplantacije u mišje modele moždanog udara, pokazan je veći potencijal DPSC sa aspekta redukcije pogođenog područja (Song *et al.*, 2017). Pokazano je takođe da DMĆ imaju sposobnost da migriraju do mesta oštećenja gde pospešuju obnavljanje oštećenog moždanog tkiva. Uporedo, kroz parakrine efekte izazivaju smanjenje toksičnog efekta ishemije na neurone (Mead *et al.*, 2017).

Kada je reč o potencijalnoj kliničkoj primeni matičnih ćelija, svakako treba pomenuti i aspekt njihovog imunomodulatornog delovanja koji nije nimalo beznačajan. Naime, MMC koštane srži imaju sposobnost i supresije i aktivacije imunog sistema. Od posebnog je značaja supresija proliferacije T limfocita, što otvara put za terapijsko korišćenje MMC u lečenju autoimunih oboljenja. Bartolomej i saradnici opisali su imunomodulatorni efekat MMC kroz prolongiranje preživljavanja kožnog grafta nakon administracije MMC. Ova sposobnost MMC koristi se u terapiji oboljenja kao što je multipla skleroza kroz sprečavanje proliferacije T limfocita, ali i kroz smanjenje infiltracije CNS-a od strane T i B limfocita i makrofaga (Li *et al.*, 2014). Neuroprotektivni efekat je dokazan upotrebom MMC u lečenju povrede nerava, cerebralnog insulta i još nekih neurološki oboljenja. Antiproliferativni, antiinflamatorni i imunomodulatorni efekat MMC opisani su i u terapijskoj primeni kod infarkta miokarda (Gandia *et al.*, 2008b), kod sprečavanja odbacivanja kožnog grafta (Clough *et al.*, 2017), akutnog otkazivanja bubrega i jetre (Cho *et al.*, 2015; Rao *et al.*, 2019), dijabetesa (Kanafi *et al.*, 2013), reumatoidnog artritisa (Ishikawa *et al.*, 2016), degeneracije retine (Syed-Picard *et al.*, 2015), povrede nerava (C. Yang *et al.*, 2017), Parkinsonove bolesti (Fujii *et al.*, 2015), amiotrofične lateralne skleroze (Lunn, Sakowski and Feldman, 2014) itd.

Za terapijsku upotrebu matičnih ćelija jako je važna njihova sposobnost migracije, s obzirom da administracija ćelija *in situ* u oštećeno ili obolelo tkivo nije uvek moguća ili je pak isuviše komplikovana (kao u slučaju terapije centralnog nervnog sistema). Takođe, ako je u pitanju sistemski promena, što je slučaj kod određenih oboljenja (npr. multipla skleroza), sposobnost migracije MC posebno dobija na značaju. Za migraciju sličnu ćelijama krvi zaslužna je ekspresija adherentnih molekula na površini MMC koji dozvoljavaju vezivanje za endotelne ćelije krvnih sudova, hemokini koji diriguju migraciju matičnih ćelija i molekuli matriks metaloproteinaze koji obezbeđuju degradaciju bazalne membrane i samim tim ekstravazaciju MMC. Transplantacija MMC putem intravenske administracije se u nekim slučajevima na primatima pokazala kao uspešnija nego direktna administracija u obolelo tkivo. Zahvaljujući mogućnosti ekstravazacije i kompleksnim procesima privlačenja matičnih ćelija putem hemokina i aktivacije matriksnih metaloproteinaza, dolazilo je do nesmetanog kretanja MMC kroz krvne sudove, zatim do vezivanja za endotelne ćelije i prolaska kroz bazalnu membranu; nakon ekstravazacije, ćelije privučene faktorima zapaljenja lako stižu do željenog tkivnog područja.

### 1.3.2. Klinička ispitivanja DMĆ u regenerativnoj terapiji

Za razliku od opsežnih laboratorijskih istraživanja *in vitro* i *in vivo*, tek je u poslednjih par godina postignut izvestan napredak u kliničkim ispitivanjima regeneracije. Među prve rezultate u ovoj oblasti mogu se uvrstiti regeneracija pulpnog i koštanog tkiva, kao i lečenje parodontopatije. Tek u najskorije vreme pokušava se sa primenom DMĆ u terapiji bolesti drugih sistema i organa.

DMĆ, a prevashodno DPSC ispitivane su u nekoliko istraživanja koja su se bavila lečenjem bolesti pulpe. Nakashima i saradnici su u pilot studiji, kod petoro pacijenata sa ireverzibilnim pulpitisom, transplantirali DPSC sa faktorima rasta. Kliničkim i laboratorijskim metodama dokazano je da nije došlo do neželjenih događaja i toksičnih efekata, a nisu uočeni ni bol pri perkusiji niti osetljivost. Kod 4 pacijenta, retroalveolarni snimci nisu pokazali nastanak bilo kakve periapikalne lezije (PAPL), a kod jednog pacijenta kod koga je pre transplantacije postojala PAPL, uočeno je značajno smanjenje lezije. Ispitivanjem vitaliteta zuba, kod četiri pacijenta je nakon četiri nedelje dobijen pozitivan nalaz ukazujući na regeneraciju pulpnog tkiva i reinervaciju. Kod pacijenta sa PAPL reinervacija je uočena tak nakon 36 nedelja. Intenzitet signala dobijen snimanjem magnetnom rezonancom pre transplantacije MC bio je značajno manji nego kod zdravog pulpnog tkiva, a nakon 24 nedelje signal je bio sličan normalnoj pulpi zuba, ukazujući na moguću kompletnu pulpnu regeneraciju (Nakashima and Iohara, 2017; Nakashima *et al.*, 2017).

U randomizovanoj kliničkoj studiji koja je obuhvatala pacijente sa traumatskom nekrozom stalnog zuba sa nezavršenim rastom korena, kod 26 pacijenata izvršena je transplantacija SHED, a kod 10 pacijenata kontrolne grupe, uobičajena terapija, apeksifikacija. Pokazano je da je u grupi u kojoj su transplantirane DMĆ došlo do značajnog produženja korena i zatvaranja apikalnog foramena, u poređenju sa kontrolnom grupom. Takođe, za razliku od situacije u kontrolnoj grupi, u grupi sa transplantiranim DMĆ, 12 meseci nakon transplantacije došlo je do potpune trodimenzionalne regeneracije pulpnog tkiva sa revaskularizacijom i reinervacijom. Ni nakon 24 meseca od transplantacije nisu uočeni nikakvi neželjeni efekti (Xuan *et al.*, 2018).

DMĆ su takođe ispitivane i kod koštanih defekata nakon vađenja trećih molara. Nakon ekstrakcije molara, iz pulpe su prvo izolovane MĆ koje su zatim zasejane na kolagenski sunder i vraćene u ekstrakcionu ranu. Tri meseca nakon intervencije, kliničkim pregledom i rendgenskim snimcima, uočeno je da je alveolarna kost bila optimalne vertikalne dimenzije, a periodoncijum ka drugom molaru fizioloških karakteristika. Nakon godinu dana uočena je kompletna koštana regeneracija (d'Aquino *et al.*, 2009). Tri godine nakon intervencije uočeno je da je regenerisano koštano tkivo u potpunosti sastavljeno iz kompaktne kosti, što je čini drugačijom od normalne spongiozne kosti. Iako nije dobijen identičan kvalitet koštanog tkiva, smatra se da regenerisana kompaktna kost može biti izuzetno korisna sa aspekta ugradnje implantata, povećavajući njihovu stabilnost i otpornost na mehaničke, fizičke i hemijske agense (Giuliani *et al.*, 2013).

Aimeti i saradnici su ispitivali mogućnost upotrebe DPSC u terapiji dubokih koštanih defekata kod 11 pacijenata sa hroničnim periodontitisom. Korišćene su autologne MĆ izolovane iz ekstrahovanih zuba, impaktiranih ili indikovanih za ekstrakciju usled malpozicije. MĆ su nakon izolacije zasejane na kolagenski sunder i plasirane u intrakoštani defekt. Radiografskim snimanjem nakon 6 i 12 meseci od intervencije uočena je statistički značajna regeneracija koštanog tkiva, a kliničkim pregledom i paradontološkim probama utvrđena je izuzetna efikasnost ovog tretmana (Aimetti *et al.*, 2018).

U toku su i klinička istraživanja na primeni DMĆ u terapiji sistemskih oboljenja u kojima se koriste autologe DMĆ. Pokušava se sa lečenjem posledica infarkta mozga u cilju smanjenja infarktne područja, regeneracije nervnog tkiva i neuroprotekcije (Nagpal *et al.*, 2016). Takođe, radi se kliničko ispitivanje efikasnosti intravenske aplikacije SHED u terapiji dijabetesa tipa 2 (Klinička studija pod brojem NCT03658655).

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

### Radna hipoteza

Matične ćelije iz folikula i apikalne papile kao ćelije tkiva u razvoju, poseduju veći potencijal diferencijacije i proliferacije u odnosu na matične ćelije iz pulpe stalnog zuba. A s obzirom na njihovo ektomezenhimalno poreklo, radna hipoteza je i da se lako i uspešno mogu diferencirati u nervnu lozu.

### Ciljevi:

U skladu sa radnom hipotezom istraživanja postavljeni su ciljevi za svaku fazu istraživanja:

#### A. Karakterizacija MĆ

1. Optimizacija izolacije i kultivacije matičnih ćelija pulpe, apikalne papile i dentalnog folikula trećeg molara.
2. Fenotipska identifikacija i karakterizacija sva tri tipa mezenhimalnih matičnih ćelija primenom protočne citometrije
3. Određivanje klonogenog potencijala izolovanih ćelija.
4. Određivanje potencijala diferencijacije mezenhimalnih matičnih ćelija.
5. Uporedna biohemijska analiza sva tri tipa matičnih ćelija primenom ramanske mikrospektroskopije

#### B. Neuroindukcija MĆ

6. Optimizacija neuroindukcije matičnih ćelija, sa i bez nanomaterijala
7. Dokazivanje neuroindukcije:
  - primenom svetlosne, konfokalne i skenirajuće elektronske mikroskopije
  - kvantifikacijom produkata genske ekspresije
  - in vivo aplikacijom u model ALS pacova

### **3. MATERIJAL I METODE**

### 3. MATERIJAL I METODE

#### A. ODABIR PACIJENATA

U studiju je bilo uključeno pet zdravih, maloletnih pacijenata kod kojih je indikovana žermektomija, odnosno vađenje impaktiranih donjih trećih molara zbog potreba ortodontskog lečenja, a koji su se javili na Kliniku za oralnu hirurgiju, Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Za uključenje u studiju bilo je neophodno da se na ortopantomogramu jasno vidi zub sa sva tri tkiva odabrana za eksperiment: apikalna papila, pulpa i folikul (slika 9). Kriterijumi isključenja bili su akutna i hronična patološka stanja, korišćenje alkohola, duvana i narkotika, kao i nedovoljna razvijenost zuba ili nepostojanje zubnog folikula.

Pre uključivanja u studiju, postupak studije je detaljno objašnjen roditeljima i pacijenatima, nakon čega je pacijent odnosno roditelj potpisao informisani pristanak i dao saglasnost za korišćenje biološkog materijala. Svi eksperimenti su sprovedeni u skladu sa Edinburškom revizijom Helsinške deklaracije.

Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta (broj odobrenja: 36/5) Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.



**Slika 9.** Ortopantomogram prikazuje umnjake sa sva tri tkiva



## B. PRIKUPLJANJE UZORAKA

Ekstrahovani zubi sa folikulom, prebačeni su sterilnom pincetom u plastičnu posudu u kojoj se nalazio transportni medijum (engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium -DMEM, 20% Fetal Bovine Serum – FBS, Gibco, USA) i u roku od 10 minuta su preneti do Laboratorije za bazična istraživanja Stomatološkog fakulteta. Nakon dezinfekcije 70% etanolom posuda je uneta u biološki bezbedni kabinet. Zub je pažljivo prebačen u petri šolju i tri puta ispran sterilnim rastvorom fosfatnog pufera (engl. Dulbecco's Phosphate Buffer Saline - DPBS, Gibco, USA). Odgovarajućim postupcima su iz uzoraka izolovana tkiva: apikalna papila, dentalni folikul i pulpa zuba (slika 10). Za izolaciju ćelija iz ovih tkiva korišćena je „Growth explant“ metoda (Kerkis *et al.*, 2008). Ova metoda izolovanja matičnih ćelija podrazumeva mehaničko usitnjavanje tkiva kako bi se dobila što veća površina iz koje mogu da se izdvoje odnosno „izrastu“ matične ćelije. Za razliku od metode izolovanja matičnih ćelija putem enzimske digestije, u „Growth explant“ metodi tkivo se ne tretira hemikalijama koje mogu da izmene određene karakteristike ovih ćelija.

### 3.1. Izolacija matičnih ćelija iz zubnih tkiva

#### 3.1.1. Izolacija matičnih ćelija iz apikalne papile zuba

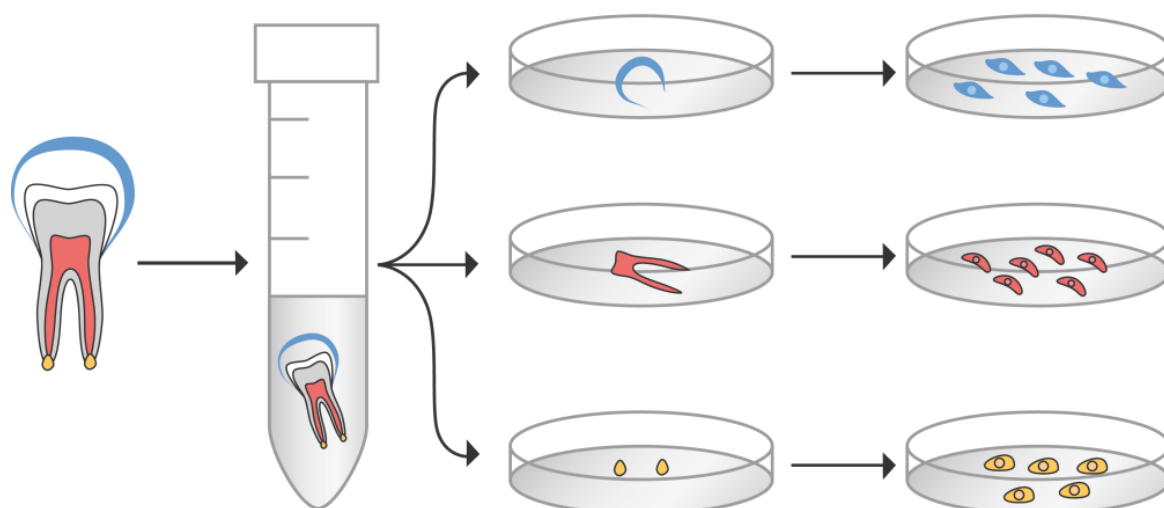
Za izolaciju matičnih ćelija iz apikalne papile zuba sterilnim skalpelom je odvojeno meko tkivo apikalne papile sa vrha nepotpuno razvijenog korena. Tkivo je tri puta isprano sterilnim rastvorom DPBS-a, a zatim je prebačeno u novu petri šolju prečnika 60 mm i pažljivo usitnjeno na komadiće dimenzija 1x1x1 mm (što manjih dimenzija), uz pomoć dva skalpela vodeći računa o tome da se tkivo ne gnječi. Zatim je u petri šolju dodato 2 ml kompletnog medijuma (DMEM, 10 % FBS, 1 x Antibiotic antimycotic, Gibco, USA), a zatim su delići tkiva zajedno sa medijumom aspirirani i prebačeni u flask T-25 namenjenim za kultivaciju ćelija.

#### 3.1.2. Izolacija matičnih ćelija iz dentalnog folikula

Tkivo dentalnog folikula je nežno odvojeno sterilnom pincetom i skalpelom od krunice zuba, a zatim tri puta isprano DPBS-om, i prebačeno u sterilnu petri šolju prečnika 60 mm. Tkivo je usitnjeno pomoću dva skalpela kao što je to urađeno i sa tkivom apikalne papile zuba. Dodavanjem kompletnog medijuma omogućeno je aspiriranje delića tkiva i njihovo prebacivanje u T-25 flask.

#### 3.1.3. Izolacija matičnih ćelija iz pulpe zuba

Da bi se pristupilo pulpi zuba bilo je neophodno otvoriti komoru pulpe. S tim ciljem zub je postavljen u stegu i okretanjem njene ručice stvorene su sile koje su dovele do pucanja zuba i otvaranja komore pulpe. Pulpa je zatim pažljivo odvojena pomoću nerv igala (pulpnog ekstirpatora), zatim je tri puta isprana sterilnim rastvorom DPBS-a, i prebačena u novu sterilnu petri šolju prečnika 60 mm. Postupak usitnjavanja i prebacivanja delića tkiva u T-25 flask je isti kao i kod izolovanja ćelija iz apikalne papile zuba i dentalnog folikula.



**Slika 10.** Šematski prikaz izolacije tri tkiva, folikula, pulpe i apikalne papile zuba.

### 3.2. Kultivacija matičnih ćelija

Flaskovi sa usitnjenim tkivom su prebačeni u CO<sub>2</sub> inkubator (Galaxy ® 170s, New Brunswick, Canada), na 37 °C i u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub>. Posle 24h u flaskove je nakon zasejavanja tkiva dodato još po 3 ml kompletnog medijuma. Delići tkiva su svakodnevno proveravani na invertnom mikroskopu (Primovert, Zeiss, Jena, Germany). Nakon 5 do 7 dana primećuje se proliferacija ćelija iz delića tkiva; ove ćelije su označene kao ćelije nulte pasaže (P0). Oblik i zastupljenost ćelija redovno su proveravani na invertnom mikroskopu. Na svaka 2-3 dana kompletni medijum je menjan svežim prethodno zagrejanim (37 °C) kompletnim medijumom. Ćelije su kultivisane do postizanja subkonfluentnosti, tj. do prekrivanja 70-80% površine flaska.

### 3.3. Pasaža ćelija

Da bi se obezbedilo da ćelije stalno budu u logaritamskoj fazi rasta, po postizanju subkonfluentnosti, odvajane su od plastične podloge flaskova i zasejavane u nove flaskove u odgovarajućem broju. Iz flaskova je odličen kompletan medijum, a zatim je ćelijski monosloj ispiran DPBS-om. U flaskove je potom dodat 1 ml rastvora rekombinantnog tripsina (TrypLE™ Express, Gibco, USA), kako bi se ćelije odvojile od plastične podloge flaska. Flaskovi su zatim inkubirani 10 min u inkubatoru, a nakon toga prebačeni u biološki bezbedni kabinet. Grubom manipulacijom i kuckanjem flaskova o podlogu laminara, mehanički su odlepljene preostale ćelije, čime je obezbeđen veći procenat odlepljenih ćelija. Tripsin je inaktiviran dodavanjem duple količine kompletnog medijuma. Nakon resuspendovanja i spiranja ćelija sa dna flaska, ukupna količina ćelijske suspenzije prebačena je u tubu za centrifugiranje zapremine 15 ml. Centrifugiranjem (Eppendorf 5702, Eppendorf, Germany) na 180 x g u trajanju od 6 min na sobnoj temperaturi, dobijen je pelet sačinjen od ćelija. Pipetom je izvučen supernatant, a pelet je resuspendovan u 1ml kompletnog medijuma. Ćelije su zatim izbrojane pomoću automatskog brojača ćelija (Countess, Invitrogen, USA), nakon proračuna, ćelije su prebačene u odgovarajućem broju (5000 ćelija/cm<sup>2</sup>) u nove flaskove sa svežim kompletnim medijumom. Do prvog pasažiranja ćelije su označene kao nulta pasaža - P0, a svaka sledeća je označavana odgovarajućim rednim brojem. Višak ćelijske suspenzije nakon zasejavanja je centrifugiran na 180 x g u trajanju od 6 min. Supernatant je odbačen, a ćelije u talogu zamrzavane i čuvane za potrebe daljeg istraživanja.

### 3.4. Krioprezervacija

Krioprezervacija je metoda kojom se na veoma niskim temperaturama u toku dužeg perioda mogu sačuvati matične ćelije. Kao sredstvo koje treba da zaštiti ćelije od štetnog dejstva niskih temperatura korišćen je krioprotektant dimetilsulfoksid (DMSO). Višak ćelija je resuspendovan u medijumu za krioprezervaciju (10% DMSO u FBS-u). Resuspendovane ćelije prebačene su u tubice za krioprezervaciju i postavljene u posudu sa izopropanolom (Mr. Frosty™ Freezing Container, Nalgene®, USA), a zatim je posuda ostavljena u zamrzivač na -70 °C. Uloga izopropanola je u održavanju brzine hlađenja 1 °C/min, jer prebrzo zamrzavanje može dovesti do oštećenja ćelija. Nakon 24 h ćelije su prebačene u kontejner sa tečnim azotom (BioCane 20, Thermo Fisher Scientific, USA) i čuvane za potrebe daljeg istraživanja.

### 3.5. Odmrzavanje ćelija

Za razliku od procesa zamrzavanja, proces odmrzavanja se mora brzo izvesti. Nakon vađenja tubica za krioprezervaciju iz posude sa tečnim azotom, tubica je poprskana etanolom i uneta u biološki bezbedan kabinet. Poklopac tubice za krioprezervaciju je prvo odvrnut za četvrtinu kruga a onda zavrnut kako bi se izbegla opasnost od pucanja usled nagle promene temperature i pritiska. Zatim se tubica za krioprezervaciju postavlja u vodeno kupatilo prethodno zagrejano na 37 °C u trajanju od 1-2 min. Tubica poprskana etanolom se zatim ponovo prebacuje u biološki bezbedan kabinet. Zaostali kristali leda otapaju se laganim dodavanjem toplog (37 °C) kompletnog medijuma, a zatim se ukupan sadržaj tubice za krioprezervaciju prebacuje u nove flaskove sa 4 ml svežeg kompletnog medijuma. Kompletan medijum sezamenjuje nakon 24 h, a kultivacija se nastavlja uobičajenim postupcima.

### 3.6. Dokazivanje matičnosti

#### 3.6.1. Protočna citometrija - dokazivanje mezenhimalnih markera

Ekspresija membranskih mezenhimalnih i hematopoetskih markera SCAP, DFSC i DPSC pete pasaže proverena je protočnom citometrijom na Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. Korišćena su sledeća mišja monoklonalna antitela za mezenhimalne membranske markere: CD90, CD73, CD105 i za hematopoezne markere: CD 45 i CD 34. Antitela su obeležena fluorescein-izocijanatom (FITC) i fikoeritrinom (PE), pa su kombinacije napravljene tako da je par antitela različito obeležen, a da pritom očekujemo pozitivnu ekspresiju jednog, a negativnu drugog markera. Nakon tripsinizacije ćelija, ćelije su centrifugirane 6 min na 180 x g. Pelet sačinjen od istaloženih ćelija je nakon odbacivanja supernatanta resuspendovan u 2 ml 10% FBS-a u DPBS-u. Ćelije su potom izbrojane i prebačene u tubice od 1,5 ml po  $1 \times 10^6$  za sve tri kombinacije antitela i negativnu kontrolu (u četvrtu tubicu dodato je oko  $1 \times 10^6$  ćelija za kalibraciju protočnog citometra). Pre upotrebe tubice su kratko centrifugirane, a zatim su antitela pomoću nastavka pipete nežno resuspendovana. Prva grupa ćelija obojena je kombinacijom CD45 (PE) i CD105 (FITC), druga CD34 (FITC) i CD73 (PE), a treća grupa je obojena antitelom CD90 (FITC). Antitela su dodata u mraku po preporuci proizvođača, a potom su ćelije obojene antitelima inkubirane sat vremena u frižideru. Nakon predviđenog perioda za inkubaciju, tubice su centrifugirane na 2700 obrtaja u trajanju od 5 min na 4°C, a zatim je odliven supernatant. Pelet je resuspendovan u 1 ml hladnog PBS-a (4°C), pa je uzorak ponovo centrifugiran. Nakon 5 min centrifugiranja, postupak ispiranja PBS-om je ponovljen, nakon čega je ćelijski talog resuspendovan u 1 ml 2% paraformaldehida (PFA) i inkubiran na sobnoj temperaturi 15 min. Posle ponovnog centrifugiranja, supernatant je odstranjen, a ćelije su resuspendovane u 1 ml hladnog PBS-a i čuvane na temperaturi od 4°C do analize na protočnom citometru.

### 3.6.2. Određivanje potencijala za diferencijaciju

Za dokazivanje potencijala za diferencijaciju korišćene su ćelije pete pasaže. Kompletni medijum je aspiriran i odbačen, dodato je 5-10 ml DPBS i ćelijski monosloj je lagano ispran. Ćelije su odlepljene i nakon šestominutnog centrifugiranja na 180 x g, odbačen je supernatant, dodat kompletni medijum i ćelije su izbrojane. Ćelije su potom zasejane u odgovarajućoj gustini. Za klasično bojenje ćelije su zasejane u ploču sa 6-12 bunara, a za ekspresiju gena u T-75 flask. Ploče i flaskovi inkubirani su u CO<sub>2</sub> inkubatoru na 37°C, 2-24 h, nakon čega je kompletni medijum zamenjen medijumom specifičnim za određenu (željenu) diferencijaciju. Takođe, nakon 21 dana izolovani su RNK i proteini za potrebe analize genske ekspresije.

#### 3.6.2.1. Osteogena diferencijacija

Ćelije su zasejane u gustini od  $5 \times 10^3$  ćelija po cm<sup>2</sup>. Ploče i flaskovi inkubirani su u CO<sub>2</sub> inkubatoru na 37°C 24h, nakon čega je kompletni medijum zamenjen kompletnim medijumom za osteogenu diferencijaciju koji je osvežen na svaka 3-4 dana. Nakon 21. dana klasičnim bojenjem sa alkalnom fosfatazom odnosno rastvorom Alizarin Red S na pločama je vršena detekcija kalcijumskih nodula i dokazivanje pozitivne osteodiferencijacije. Iz flaskova je izolovana RNK, kasnije korišćena za dokazivanje ekspresije karakterističnih markera osteodiferencijacije - Runx2 i osteokalcin.

#### Priprema kompletnog medijuma za osteogenu diferencijaciju

Komercijalni set koji je korišćen za osteogenu diferencijaciju se sastoji iz bazalnog medijuma i suplementa. Za 100 ml kompletnog medijuma za osteogenu diferencijaciju, po upustvima proizvođača, potrebno je da se u 90 ml bazalnog medijuma doda 10 ml suplementa i 50 µl rastvora gentamicina koncentracije 10 mg/ml. Ovako pripremljen rastvor se čuva na +4°C zaštićen od svetla.

#### Bojenje Alizarin-om Red S

Iz bunarića u kojima su bile tretirane ćelije sa kompletnim medijumom za osteogenu diferencijaciju, nakon 21. dana medijum je aspiriran i odbačen. Ćelijski monosloj je fiksiran sa 1 ml 4% formaldehida u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi. Fiksirane ćelije su ispirane dva puta sa po 1-1,5 ml destilovane vode. U svaki od bunarića dodat je 1 ml 2% rastvora boje Alizarin Red S i inkubiran na sobnoj temperaturi 15 minuta. Rastvor Alizarin Red S boje 2 g u destilovanoj vodi do konačne zapremine od 100 ml, podešen je na pH 4,1-4,3 pomoću 0,5% rastvora amonijum-hidroksida. Posle 15 minuta boja je aspirirana i odbačena, a zatim su bunarići isprani destilovanom vodom tri puta.

#### 3.6.2.2. Hondrogena diferencijacija

Ćelije su zasejane u gustini od  $1,6 \times 10^7$  ćelija po ml, u vidu kapljica ćelijske suspenzije (5µl) po površini multi-well ploče ili flaska. Za klasično bojenje ćelije su zasejane u ploču sa 12 bunara, a za ekspresiju gena u T-75 flask. Ploče i flaskovi inkubirani su u CO<sub>2</sub> inkubatoru na 37°C 2h, nakon čega je kompletni medijum zamenjen kompletnim medijumom za hondrogenu diferencijaciju i menjan na 2-3 dana. Nakon 21. dana klasičnim bojenjem Safraninom O, vršeno je dokazivanje pozitivne hondrodiferencijacije detekcijom hondroitin sulfata, a takođe su izolovani RNK i proteini za analizu genske ekspresije.

### **Priprema kompletnog medijuma za hondrogenu diferencijaciju**

Komercijalni set za hondrogenu diferencijaciju se sastoji iz bazalnog medijuma i suplementa. Za 100 ml kompletnog medijuma za hondrogenu diferencijaciju potrebno je da se u 90 ml bazalnog medijuma doda 10 ml suplementa i 50 µl rastvora gentamicina koncentracije 10 mg/ml. Pripremljen rastvor je čuvan na +4°C zaštićen od svetla.

### **Bojenje Safranin-om O**

Nakon 21 dana, kompletni medijum za hondrogenu diferencijaciju je aspiriran i odbačen, bunarići su isprani DPBS-om, a zatim je ćelijski sloj fiksiran sa 1 ml 4% formaldehida u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi. Fiksirane ćelije ispirane su dva puta sa po 1-1,5 ml DPBS-a. Dodat je 1 ml 0,1% vodenog rastvora Safranina O i inkubirane su na sobnoj temperaturi 15 minuta. Boja je aspirirana i odbačena, nakon čega su bunarići ispirani tri puta sa destilovanom vodom.

### **3.6.2.3 Adipogena diferencijacija**

Ćelije su zasejane u gustini od  $1 \times 10^4$  ćelija po  $\text{cm}^2$  i inkubirane u  $\text{CO}_2$  inkubatoru na 37°C 24h, nakon čega je medijum zamenjen kompletnim medijumom za adipogenu diferencijaciju, koji je menjan na na 3-4 dana.

Nakon perioda od 21 dana uspešnost diferencijacije proveravana je klasičnim bojenjem sa Oil Red O, za detekciju intracelularnih lipidnih vakuola, kao i analizom ekspresije PPAR $\gamma$  gena.

### **Priprema kompletnog medijuma za adipogenu diferencijaciju**

Komercijalni set za adipogenu diferencijaciju se sastoji iz bazalnog medijuma i suplementa. Za 100 ml kompletnog medijuma za adipogenu diferencijaciju potrebno je da se u 90 ml bazalnog medijuma doda 10 ml suplementa i 50 µl rastvora gentamicina koncentracije 10 mg/ml. Pripremljen rastvor se čuva na +4°C zaštićen od svetla.

### **Priprema boje Oil Red O**

Boja je najpre rastvorena u izopropanolu u koncentraciji od 0,5%, a potom je napravljeno razblaženje sa destilovanom vodom u odnosu 3:2. Nakon 10 minuta je rastvor boje filtriran pomoću filter papira i čuvan u epruveti zastićenoj aluminijumskom folijom.

### **Bojenje Oil Red O**

Nakon 21 dana, kompletni medijum za adipogenu diferencijaciju aspiriran je i odbačen iz bunarića. Ćelijski sloj fiksiran je sa 1 ml 4% formaldehida u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi. Odstranjen formaldehid je odbačen a fiksirane ćelije isprane sa po 1-1,5 ml PBS-a dva puta. U bunariće je dodato po 1 ml Oil Red O boje, a zatim su ploče inkubirane na sobnoj temperaturi 15 minuta. Nakon bojenja, ćelije su ispirane tri puta sa po 1 ml destilovane vode.

### 3.7. Izolacija RNK za ispitivanje genske ekspresije

Medijum iz flaska je aspiriran i odbačen, potom je dodat 1ml TRIzol® Reagent-a na svakih 10 cm<sup>2</sup> površine suda za kultivaciju (2,5 ml za flask T25, 7,5 ml za T75, 1 ml za sud prečnika 35 mm, 3 ml za sud prečnika 60 mm i 8 ml za sud prečnika 100 mm). Resuspendovanjem pomoću nastavka pipete ćelije su lizirane, a zatim inkubirane 5 minuta na sobnoj temperaturi. Ćelije su prebačane u tubicu, a potom je dodato 0,2 ml hloroforma na svaki ml polazne količine TRIzol® Reagent-a. Nakon jakog mućkanja u ruci 15 sekundi, uzorak je centrifugiran na 12000 x g u trajanju od 15 minuta na +4°C. Nakon centrifugiranja jasno su uočljive tri odvojene faze, donja-crvena (fenolna), središnja i gornja koja je bezbojna. Gornja vodena faza je pažljivo usisana i prebačena u novu tubicu, zatim je dodato 0,5 ml izopropanola na svakih 1 ml inicijalnog TRIzol® Reagent-a, a potom su tubice inkubirane na sobnoj temperaturi. Nakon 10 minuta tubice su centrifugirane na 12000 x g u trajanju od 10 minuta na +4°C, a zatim je aspiriran i odstranjen supernatant. Talog je ispran sa 1 ml 75% etanola na svaki ml inicijalno dodatog TRIzol® Reagent-a, pa lagano vorteksovan, a zatim centrifugiran na 7500 x g u trajanju 5 minuta na +4°C. Nakon centrifugiranja je opet odstranjen supernatant, a tubice su ostavljene na sobnoj temperaturi otvorene 10 minuta. Talog je resuspendovan u 20-50 µl vode bez RNA-za ili u 0,5% SDS-a, i inkubiran u vodenom kupatilu na 55-60°C u trajanju od 10-15 minuta. Nakon toga su uzorci čuvani na -70°C do upotrebe.

### 3.8. Izolacija DNK

Nakon odlepljivanja ćelija iz flaska i centrifugiranja (objašnjeno u poglavlju 3.3. Pasaža ćelija) u tubice sa peletom dodato je 700 µl ELB-a i resuspendovano laganim aspiriranjem u nastavak pipete. Nakon centrifugiranja 30 sekundi na 14000 rpm, supernatant je odliven, a tubice osušene. Sediment je ispran sa 1 ml ELB-a i kompletno resuspendovan, a zatim su uzorci centrifugirani 30 sekundi na 14000 rpm. Supernatant je opet odliven i tubice osušene, nakon čega je pelet resuspendovan u 300 µl LLB-a i 20 µl 10% SDS-a. Nakon dodavanja 20 µl proteinaze K (10 mg/ml) uzorak je vorteksovan, a zatim inkubiran na 56 °C oko 30 minuta do 1 sat. Posle inkubacije je dodato 120 µl 5M NaCl i uzorak je vorteksovan 30 s, pa centrifugiran 3 minuta na 14000 rpm. Supernatant je pažljivo preliven u nove tubice sa 1 ml hladnog apsolutnog etanola i 30-ak puta promućkan u ruci, a potom je uzorak centrifugiran 2 minuta na 14000 rpm. Pažljivo je izliven supernatant vodeći računa o DNK talogu, a ependorfice osušene. Dodato je 1 ml hladnog 70% etanola i 30ak puta promućkan pa je uzorak opet centrifugiran 2 minuta na 14000 rpm. Nakon odlivanja supernatanta, pazeći na DNK talog, beli pelet ostavljen je u termostatu 10 minuta kako bi ispario etanol, a potom je DNK resuspendovana u 100 µl destilovane vode. Do analize, uzorci ovako izolovane DNK, čuvani su na -20°C.

### 3.9. Određivanje koncentracije i čistoće uzoraka

Nakon izolacije RNK ili DNK, koncentracija i čistoća nukleinskih kiselina merena je na spektrofotometru BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, USA). 1µl izolovane DNK ili RNK je korišćeno za analizu koja se zasniva na absorbanci uzorka nakon izlaganja monohromatskoj svetlosti tri talasne dužine (230, 260 i 280nm). Kompjuterski, odgovarajućim softverom dobijen je rezultat koncentracije i čistoće uzoraka.

### 3.10. Reverzna transkripcija – lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (RT-qPCR)

Metoda reverzne transkripcije u kombinaciji sa Real Time PCR-om predstavlja zlatan standard u molekularnoj biologiji za analizu ekspresije gena. Reverznom transkripcijom se nakon izolacije RNK iz uzoraka, ona prepisuje u komplementarnu DNK (cDNK) uz pomoć enzima reverzne transkriptaze. Tako sintetisana cDNK se zatim koristi u Real Time PCR metodi u cilju kvalitativne i kvantitativne procene ekspresije određenog gena.

Za reverznu transkripciju korišćen je ThermoScientific kit (LifeTechnologies, Čikago, SAD), a uzorci su inkubirani u PCR aparatu (Peqlab PeqSTAR 2X, Erlangen Nemačka). Zapremina RNK koja se dodaje u reakcionu smešu preračunata je prema izmerenoj koncentraciji tako da je za svaku reverznu transkripciju korišćeno 1 µg RNK.

#### Receptura za reakcionu smešu:

RNK	x µl
Revert Aid (enzim reverzna transkriptaza)	1 µl
Ribolock (inhibitor ribonukleaza)	1 µl
dNTP mix	2 µl
Oligo dt prajmer	1 µl
reakcioni puffer	4 µl
H <sub>2</sub> O	y µl
(dodati do 20µl ukupne zapremine reakcione smeše):	x+y=11 µl

**Tabela 1. Uslovi RT-PCR ciklusa**

	Vreme/ciklusi	Temperatura
<b>Inkubacija 1</b>	<b>5 min</b>	<b>25</b>
<b>Inkubacija 2</b>	<b>60 min</b>	<b>42</b>
<b>Inkubacija 3</b>	<b>5 min</b>	<b>70</b>

Program reverzne transkripcije uključivao je dva koraka inkubacije. Reakcija je zaustavljena zagrevanjem uzorka na 70 °C u trajanju od pet minuta (Tabela 1). Uzorci cDNK su do dalje analize čuvani na -70 °C.

### 3.11. Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (engl. Real Time PCR- qPCR)

Analiza ekspresije mezenhimalnih, hematopoetskih, osteogenih, hondrogenih, adipogenih, glijalnih i neuronskih gena vršena je metodom relativne kvantifikacije pomoću lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (engl. Real-Time Quantitative Polimerase Chain Reaction, qPCR). Metoda predstavlja modifikaciju PCR metode kojom je omogućeno praćenje toka reakcije, zahvaljujući primeni fluorescentne boje SYBR Green, koja se ugrađuje u dvolančane DNK produkte. Relativni nivo ekspresije gena od interesa zavisiće od trenutka kada započinje eksponencijalni rast nivoa fluorescence, odnosno kada započne umnožavanje specifičnog PCR produkta (ciklus u kome se to dešava označava se kao Ct (engl. Cycle threshold). Za poređenje Ct vrednosti za svaki ciljni gen i kontrolni gen (gliceraldehid fosfat dehidrogenazu) korišćen je komparativni  $2^{\Delta\Delta Ct}$  metod (Livak, 2001).

Koristeći odgovarajuće prajmere, amplifikacija gena od interesa izvedena je primenom komercijalnog kita Maxima TM SYBR Green/ROX q pCR Detection System (Thermo Fisher Scientific) i uspomoc qPCR aparata (Light Scanner, Idaho Technology, America) po sledećoj recepturi:

SYBR Green	10 $\mu$ l
Prajmer Forward	1 $\mu$ l
Prajmer Reverse	1 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	6 $\mu$ l
cDNK uzorak	2 $\mu$ l

**Tabela 2. Uslovi qPCR ciklusa**

		Vreme/ciklusi	Temperatura
<b>1 ciklus</b>	<b>Inicijacija</b>	<b>2 min</b>	<b>95</b>
<b>40 ciklusa</b>	<b>Denaturacija</b>	<b>30 s</b>	<b>95</b>
	<b>Vezivanje prajmera</b>	<b>30 s</b>	<b>60</b>
	<b>Elongacija</b>	<b>60 s</b>	<b>72</b>
<b>1 ciklus</b>	<b>Finalna elongacija</b>	<b>10 min</b>	<b>72</b>

Prajmeri kontrolnih, odnosno tzv “housekeeping” gena i gena od interesa, dati su u tabeli 3.



**Tabela 3. Spisak prajmera korišćenih qPCR metodom**

Naziv prajmera	Sekvenca (5'-3')	Ta (°C)	Osnovna primena	Naziv gena
GAPDHSCF	TCATGACCACAGTCCATGCCATCA	55(1)	Housekeeping gen	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GAPDHSCR	CCCTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT	55(1)		
CD73F	GAGTGGGTGGTCAGAAAATA	55(1)	Marker MSCs	5'-nucleotidase, ecto
CD73R	TGCACACTGTTTTAAGGTG	55(1)		
CD90F	TAACAGTCTTGCAGGTCTCC	55(1)	Marker MSCs	Thy-1 cell surface antigen
CD90R	AAGGCGGATAAGTAGAGGAC	55(1)		
CD45F	GCAAAGATGCCAGTGTCCACTT	55(1)	Marker HSCs	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C (PTPRC) Leukocyte common antigen (LCA)
CD45R	ATCTGAGGTGTTGCTGTGATGGT	55(1)		
CD133F	ACTTGGCTCAGACTGGTAAA	55(1)	Marker HSCs	Prominin 1
CD133R	GTTCTGAGCAAATCCAGAG	55(1)		
RUNX2 Fw	ACAAACAACCACAGAACCACAAGT	N/A(5)	Osteogena diferencijacija	Runt-related transcription factor 2
RUNX2 Rv	GTCTCGGTGGCTGGTAGTGA	N/A(5)		
Col2 Fw	TTCAGCTATGGAGATGACAATC	N/A(7)	Hondrogena diferencijacija	Collagen, type II
Col2 Rv	AGAGTCCTAGAGTGAAGTGA	N/A(7)		
PPARg Fw	GCTGTGCAGGAGATCACAGA	N/A(8)	Adipogena diferencijacija	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PPARg Rv	GGGCTCCATAAAGTCACCAA	N/A(8)		
NF-M Fwd	TGGGAAATGGCTCGTCATTT	55(10)	Neurogena diferencijacija	Neurofilament medium
NF-M Rv	CTTCATGGAAACGGCCAA	55(10)		
Ngn2 Fwd	CCTGGAAACCATCTCACTTCA	55(11)	Neurogena diferencijacija	Neurogenin 2
Ngn2 Rv	TACCCAAAGCCAAGAAATGC	55(11)		
GFAP Fwd	GCCTCAAGGACGAGATGG	55(11)	Neurogena diferencijacija	Glial fibrillary acidic protein
GFAP Rv	TCGCCCTTAGCAGCTTC	55(11)		
B3T Fwd	GCCAAGTTCTGGAAGTCA	55(11)	Neurogena diferencijacija	Beta-3 tubulin
B3T Rv	GCCTCGTTGTAGTAGACGC	55(11)		
MAP2 Fwd	AACCCTTTGAGAACACGACA	55(11)	Neurogena diferencijacija	Microtubule-associated protein 2
MAP2 Rv	TCTTTCCGTTTCATCTGCCA	55(11)		

:

### 3.12. Određivanje relativne dužine telomera

Nakon izolacije DNK iz matičnih ćelija nakon II,VI i X pasaže i pre i nakon neurodiferencijacije, određivane su dužine telomera pomoću lančane reakcije polimeraze, relativnom kvantifikacijom. Na ovaj način, imitiranjem ćelijske replikacije, kroz ciklične procese denaturacije, hibridizacije i elongacije umnožavaju se DNK segment od interesa i vezivanjem fluorescentne boje detektuje pomoću qPCR aparata. Zbog različitih temperaturnih programa, qPCR analiza dužina telomera je obavljena kroz dve zasebne reakcije. U prvoj reakciji je amplifikovan referentni gen – humani beta globin (HBG), a zatim telomere. Za procenu uspešnosti reakcije analiziran je nagib standardne krive.

#### Receptura za reakcionu smešu prve reakcije.

DNK	2 $\mu$ l
HBG F	1 $\mu$ l
HBG R	1 $\mu$ l
SYBGR	12.5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	8,5 $\mu$ l

#### Receptura za reakcionu smešu druge reakcije.

DNK	2 $\mu$ l
TEL F	1 $\mu$ l
TEL R	1 $\mu$ l
SYBGR	12.5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	8,5 $\mu$ l

**Tabela 4. Uslovi qPCR-a za prvu reakciju**

	Vreme/ciklusi	Temperatura (°C)
<b>Početa denaturacija</b>	<b>10 min / 1 ciklus</b>	<b>95</b>
<b>Denaturacija</b>	<b>15 sec / 30 ciklusa</b>	<b>95</b>
<b>Hibridizacija</b>	<b>60 sec / 30 ciklusa</b>	<b>54</b>

**Tabela 5. Uslovi qPCR-a za drugu reakciju**

	<b>Vreme/ciklusi</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
<b>Početa denaturacija</b>	<b>10 min / 1 ciklus</b>	<b>95</b>
<b>Denaturacija</b>	<b>15 sec / 40 ciklusa</b>	<b>95</b>
<b>Hibridizacija</b>	<b>60 sec / 40 ciklusa</b>	<b>54</b>

### 3.13. Test formiranja kolonija (eng. Colony Forming Unit - CFU TEST)

Ćelije pete pasaže su zasejane u petri posudice od 35 mm<sup>2</sup> u gustini od 200 ćelija po posudici u potpunom medijumu koji je menjan na svakih 2-3 dana. Nakon 7, 10 i 14 dana kompletni medijum je aspiriran i odbačen. Petrijeve posudice ispirane su sa DPBS-om pre tridesetominutnog fiksiranja sa 4% PFA (Sigma Aldrich, Minhen, Nemačka) na sobnoj temperaturi. Fiksirani ćelijski monosloj zatim je bojen 0,05% rastvorom Kristal Violet-a (Centrohem, Beograd, Srbija). Nakon ispiranja DPBS-om dva puta, posudice su posmatrane i fotografisane uspomoc invertnog mikroskopa, a količina vezane boje analizirana u programu Image J (Image J version 1.49, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Podaci dobijeni pomocu ovog programa statistički su analizirani uz pomoc SPSS-a (SPSS version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA), koristeći One-way Anova test.

### 3.14. Ramanska spektromikroskopija

Ćelije pete pasaže su gajene do postizanja konfluentnosti. Posle pasažiranja i brojanja ćelija, odvojeno je po  $1 \times 10^6$  sva tri tipa ćelija u tube za centrifugiranje u medijumu za gajenje. Nakon centrifugiranja, 1700 RPM u trajanju od 6 minuta, ćelije su se istaložile. Nakon aspiriranja medijuma, talog je prebačen bez fiksacije direktno na zlatnu mikroskopsku pločicu za Raman spektromikroskopiju.

Ramanovi signalidobijeni su zahvaljujući spektromikroskopskom aparatu HORIBA Jobin Yvon Xplora (HORIBA Jobin Yvon S.A.S., Villeneuve-d'Ascq, Francuska) opremljenim sa mikroskopom BX51 (Olympus, Tokyo, Japan) na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. Ramansko raspršenje ekscitirano je diodom lasera na talasnoj dužini od 785 nm i snagom od 90 mW, na uveličanju objektiva od 100x, veličinom fokusa od 2 μm i vremenom ekspozicije od 100s. Za beleženje spektara korišćena je CCD kamera (Syncerity, HORIBA Scientific, Edison, New Jersey, SAD). Sva tri ćelijska uzorka snimljena su po 30 puta, nasumičnim odabirom tačaka. Za komunikaciju sa uređajem korišćen je softver LabSpec 6 (Horiba Scientific, Villeneuve-d'Ascq, Francuska). Ramanski spektri ćelija su posmatrani u rasponu od 400-2600 cm<sup>-1</sup>.

Akvizicija Ramanovih spektara izvršena je pomocu softvera LabSpec 6 (HORIBA Jobin Yvon S.A.S., Villeneuve-d'Ascq, Francuska). Za postupak kalibracije kao i za naknadnu obradu podataka, korišćeni su spektri acetil salicilne kiseline, mereni kao referentni spektri. Ostvareni odnos signal – šum bio je najmanje 20.

### 3.15. Neurogena diferencijacija (ND)

Nakon pasažiranja, ćelije su zasejane u ploče sa šest bunarića radi proveravanja uspešnosti ND imunocitohemijom i flaskove T-75 radi proveravanja ekspresije nervnih markera qPCR metodom. Nakon centrifugiranja ćelije su zasejane u triplicatu po  $3 \times 10^5$  u svakom od flaskova. Pokrovna stakalca kružnog oblika prečnika 20mm su prvo potopljena u etanol a zatim dva puta isprana DPBS-om, pa ostavljena da se 10-ak minuta prosuše u laminaru. U svakom bunaru šestobunarnih ploča postavljeno je pripremljeno pokrovno stakalce. Nakon brojanja ćelija, odgovarajuća zapremina ćelijske suspenzije u kompletnom medijumu kako bi broj ćelija po stakalcu iznosio  $1 \times 10^4$ , spuštena je na stakalce, a odmah potom dodato je 1 ml kompletnog medijuma. Nakon 24h, kada su se ćelije zalepile za površinu stakalca, kompletnom medijumu dodato je 10 $\mu$ l (u bunariće) i 80 $\mu$ l (u flaskove) 100mM rastvora beta-mercaptoethanol-a (BME) kako bi se postigla neuroindukcija. Četri sata nakon dodavanja BME, medijum iz bunarića i flaskova usisan je i odbačen, i zamenjen medijumom za neurodiferencijaciju.

#### Priprema medijuma za neurodiferencijaciju

Za neurodiferencijaciju, pored Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), korišćeni su i komercijalni faktori rasta: Fibroblastni(FGF), Neurogeni (NGF) i B27. Kompletnom medijumu za neurodiferencijaciju dodat je i rastvor gentamicina koncentracije 10 mg/ml u zapremini od 500  $\mu$ l.

Za 50ml kompletnog medijuma za ND korišćeno je:

DMEM	47,125ml
FGF	250 $\mu$ l
NGF	125 $\mu$ l
B27	2ml
AB	500 $\mu$ l

Medijum je menjan na 3-4 dana. Morfologija ćelija praćena je pomoću invertnog mikroskopa. Nakon 5-7 dana kada je promena morfologije bila zadovoljavajuća, izolovana je RNK iz flaskova za dalje analize ekspresije karakterističnih markera nervne loze, a ćelije su takođe kultivisane na pokrovnim stakalcima, fiksirane i obojene za primenu imunocitohemije.

U flaskove ili bunariće nakon dodavanja kompletnog medijuma su po potrebi uporednog eksperimenta neurodiferencijacije sa nanomaterijalima dodavane ugljenične nanočestice u kombinaciji ili samostalno.

### 3.15.1. Neurogena diferencijacija i nanomaterijali

#### Priprema grafenskog materijala

Na Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Institutu za fiziku, za dobijanje grafenske disperzije, korišćen je metod eksfolijacije u tečnoj fazi kao već opisan metod za uspešno dobijanje visokokvalitetnog dvodimenzionalnog grafenskog materijala. (Haar S, 2015, Matković A, 2016).

Početna koncentracija praška grafita (Sigma Aldrich-332461) u N-metil-2-pirolidonu (NMP) (Sigma Aldrich-328634) bila je 18 mg/ml. Smesa je ultrazvučno obrađena u ultrazvučnoj kadici male snage (Bransonic CPXH) Ultrazvučna 8 kadica za čišćenje) 14 sati. Kako bi se sprečila ponovna agregacija i smanjila količina neosvetljenog grafita, smesa je centrifugirana 60 min pri 3000 o/min. Nakon toga urađeno je dekantovanje koje je sprovedeno pipetiranjem gornje polovine disperzije. Na kraju, koncentracija sive tečnosti koja se sastojala od grafenskih ploča raspršenih u rastvoru bila je 320 µg/ml. Za izračunavanje primejenjen je Lambert-Beer zakon na UV / VIS apsorpcijski spektar koncentracija grafena procenom apsorbance na 660 nm. Dužina grafenske ćelije bila je 1 cm i uzet je koeficijent ekstinkcije grafena ( $\alpha = 24,60 \text{ ml mg}^{-1} \text{ m}^{-1}$ ), u rastvorima NMP iz literature (31). Apsorpcijski spektri izmereni su pomoću UV /VIS spektrofotometra (Perkin-Elmer Lambda 4B).

#### Priprema karbonskih nanotubica

Funkcionalizacija karbonskih nanotubica sa jednim zidom (single wall carbon nanotubes - SWCNTs), kako bi se učinile hidrosolubilnim, urađena je po prethodno opisanom protokolu (10). Ukratko, komercijalno dostupan prečišćeni SWCNT-COOH materijal (P3-SVCNT, Carbon Solutions, Inc., Riverside, CA) je reagovao sa oksalil hloridom da bi se dobio intermedijer acil hlorida (SVCNTP COCl). P3-SWCNT materijal (1 g) raspršen je u 1 L suvog DMF ultrazvukom tokom 2 sata i uz mešanje visokog smicanja tokom 1 sata kako bi se dobila homogena suspenzija. Oksalil hlorid (20 ml) je dodat kap po kap SWCNT-COOH rastvoru na 0° C pod argonom. Reakciona smeša je mešana na 0° C tokom 2 sata, na sobnoj temperaturi i zagrevana preko noći na 70° C kako bi se višak oksalil hlorida uklonio (tačka ključanja 63° C). Funkcionalizacija nastalog SWCNT COCl intermedijera je rađena dodavanjem polim-aminobenzen sulfonske kiseline (PABS, 5g) da bi se formirao odgovarajući kalemni kopolimer (SVCNT-PABS), i omogućavajući komponentama da međusobno reaguju na 120° C tokom 5 dana. Posle toga, smeša je filtrirana kroz membranu (pore veličine 0,22 µm), više puta ispirana sa 95% etanolom, a zatim destilovanom vodom da se ukloni višak PABS-a. Dobijeni konačni proizvod (SVCNT-PABS) sakupljen je na membrani i osušen u vakuumu preko noć., Zatim je rekonstituisan u destilovanoj vodi u koncentracijod 2,0 mg / ml. Finalno, SWCNT-PABS ima sastav od 35 težinskih procenata (mas. %) SWCNT i 65 mas. % PABS.

#### Neurodiferencijacija matičnih ćelija apikalne papile uz upotrebu nanočestica

Nanomaterijali su korišćeni u okviru uporednog eksperimenta neurodiferencijacije. Ćelije pete pasaže podeljene su u četiri grupe. U grupi A je korišćen samo gore opisan medijum za neurodiferencijaciju; grupu B su činile ćelije kojima je pored medijuma za neurodiferencijaciju dodato i 10µl (2mg/ml) rastvora SWCNT-PABS; u grupi C bile su ćelije kojima je dodat rastvor grafenske disperzije (GD), 10 µl (18mg/ml), a grupu D su činile ćelije kojima je pored medijuma za neurodiferencijaciju dodata kombinacija ova dva nanomaterijala (10 µl SWCNT-PABS i 10 µl GD). Medijumi su menjani na svaka 2-3 dana. Ćelije su posmatrane invertnim mikroskopom a nakon 7 dana su fotografisane i ranije opisanim protokolom, izolovana je njihova RNK za potrebe qPCR analize ekspresije neuralnih i glijalnih markera. Nakon sedmog dana od neuroindukcije ćelije su, prethodno opisanim protokolom, obojene za potrebe imunocitohemije.

### 3.16. Imunocitohemija (ICC)

Provera uspešnosti neurodiferencijacije vršena je metodom imunocitohemije korišćenjem konfokalne mikroskopije, kao i analizom ekspresije markera specifičnih za neurone i glijalne ćelije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu.

Za potrebe ICC, ćelija su zasejavane na sterilna kružna stakalca prečnika 7 mm postavljena u bunariće šestobunarne ploče, u koncentraciji od 5000 ćelija u 10  $\mu$ l kompletnog medijuma. Ploče su zatim prenete u CO<sub>2</sub> inkubator, a sat vremena, nakon što su se ćelije zalepile za podlogu, u bunariće je dodat 1,5 ml kompletnog medijuma. Nakon 24 časa, ćelije su izložene neuroindukciji po gore opisanom protokolu.

Sedmog dana od neuroindukcije iz bunarića je izvučen i odbačen medijum za neurodiferencijaciju, potom je ćelijski monosloj tri puta ispran DPBS-om, pa fiksiran u 4% PFA na sobnoj temperaturi. Nakon 20 min, ćelije su dva puta isprane DPBS-om, a zatim je izvršeno blokiranje i permeabilizacija 0,1% rastvorom Tritona (za 1 ml blokirajućeg rastvora - 1  $\mu$ l Tritona x 100, 300  $\mu$ l 10% goveđeg serumskog albumina, BSA, Sigma Aldrich i 700  $\mu$ l DPBS-a). Nakon inkubiranja 45 minuta u CO<sub>2</sub>inkubatoru, pločice sa ćelijskim monoslojem su lagano okrenute ka kapljici (20  $\mu$ l) primarnih antitela (rabbit anti- $\beta$ -III-tubulin (B3T, 1:400, Cell Signaling, USA), rabbit anti-neuronal nuclei (NeuN, 1:250, Millipore, Germany) mouse anti-gliial fibrillary acidic protein (GFAP, 1:400, Millipore, Germany) i mouse anti MAP 2 (MAP 1:400, Millipore, Germany)) koja su stavljena u čiste bunariće šestobunarnih ploča, tako da je ćelijski monosloj okrenut na dole. Nežno je pritisnuto pokrovno stakalce krajem pincete kako bi se istisli mehurići. U prazne bunariće i okolne prostore nasut je PBS, kako ne bi došlo do isušivanja tokom inkubacije. Ploče su obmotavane parafilmom, uvijene u foliju i inkubirane preko noći na 4°C. Sutradan stakalca su pincetom pažljivo izvađena iz bunarića tako da ćelijski monosloj bude okrenut na gore pa su zatim isprana PBS-om tri puta po pet minuta.

Svaki bunarić je detaljno obeležen da bi se sa sigurnošću znalo šta se u njemu nalazi i kom su primarnom antitelu ćelije bile izložene. Nakon ispiranja, ćelije na stakalcima su stavljene u nove šestobunarne ploče i izložene delovanju sekundarnog antitela (donkey anti-mouse Alexa Fluor 488 (1:200, Invitrogen, USA), donkey anti-rabbit Alexa Fluor 555 (1:200, Invitrogen, USA) i donkey anti-rabbit Alexa Fluor 657 (1:200, Invitrogen, USA)). I u ovom slučaju su stakalca postavljena tako da su ćelije opet okrenute na dole ka sekundarnom antitelu. Pokrovno stakalce je nežno pritisnuto kako bi se istisnuo eventualno zaostali vazduh.

Ploča je uvijena u aluminijumsku foliju i ostavljena u mraku 2h. Posle inkubacije sekundarnim antitelom, bunarići su ispirani 5 minuta po 5 puta PBS-om, a potom je na pločicu dodata 4-, 6-diamidino- 2-phenilindol (1:4000, DAPI, Molecular Probes, USA), boja kojom su obeležena jedra. Nakon 10 min inkubacije DAPI bojom u mraku, stakalca su ponovo ispirana pet puta po pet minuta, a potom su pincetom pažljivo prineta sterilnom papirnom ubrusu kako bi se DPBS ocedio, a onda okrenuta ćelijskim slojem na dole ka kapljici (15 $\mu$ l) moviola (Sigma Aldrich) napredmetnoj SuperFrost pločici.

Nakon sušenja moviola tokom noći u frižideru, ćelije su posmatrane i fotografisane na konfokalnom mikroskopu (LSM 510, Carl Zeiss GmbH, Jena, Germany) sa laserima na Ar 488 HeNe 543 and 633 talasnih dužina. Dobijene fotografije analizirane su pomoću Fiji-Image J software (NIH, USA).

### 3.17. Mikroskopija atomskih sila (eng. Atomic Force Microscopy – AFM)

Za potrebe mikroskopije atomskih sila ćelije su zasejane na SiO<sub>2</sub> stakalca presvučena grafenskim monoslojem veličine 2x2 cm u koncentraciji od 200 ćelija u 10 µl kompletnog medijuma. Stakalca su stavljena u bunariće šestobunarne ploče. Nakon sat vremena od zasejavanja ćelijama je dodat kompletni medijum. Nakon 24 časa od zasejavanja izvršena je neurodiferencijacija gore opisanim standardnim protokolom.

Sedam dana od neuroindukcije, iz bunarića je usisan medijum, a pločice su isprane dva puta sa DPBS-om, zatim su ćelije fiksirane 4% rastvorom PFA u trajanju od 20 minuta. Svaki višak rastvora za fiksaciju je uklonjen ponovnim ispiranjem još dva puta DPBS-om.

Morfologija dobijenih ćelija nakon neurodiferencijacije okarakterisana je mikroskopijom na mikroskopu atomske sile, NTEGRA Spectra na Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Institutu za fiziku. Korišćen je NT MDT pozlaćeni vrh nominalnog radijusa od oko 30 nm. Skeniranja su se izrađivala u ambijentalnim uslovima, RH: 40-50%, t: 23-26° C u polukontaktom režimu, sa frekvencijom skeniranja od 0,5 Hz i sa 512 x 512 tačaka u skeniranju (10 x 10 µm površine).

### 3.18. Skening elektronska mikroskopija (SEM)

Nakon neurodiferencijacije, ćelijska morfologija posmatrana je i skening elektronskom mikroskopijom na Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Institutu za fiziku, koristeći elektronski mikroskop visoke rezolucije, MIRA3 FEG-SEM, Tescan, pri ubrzanju napona 20 kV. U pripremi je površina uzoraka presvučena ultratankim slojem zlata pomoću SC7620 mini raspršivača (Quorum Technologies) za sprečavanje akumulacije statičkog elektriciteta polja.

### 3.19. *In vivo* neurogena diferencijacija

Mogućnost diferencijacije ćelija u neuronsku liniju i njihov regenerativni potencijal u neurodegenerativnim oboljenjima pokazani su i u sklopu pilot eksperimenta na životinjskom modelu ALS-a (Amiotrofične lateralne skleroze). U eksperimentu korišćeni su pacovi kod kojih je intratekalno ubrizgavan suspenzija MĆ (eksperimentalna grupa - SOD ALS soj), ili fiziološki rastvor (kontrolna - NonTransGenic soj - SHEMA). U ovom pilot eksperimentu korišćene su nediferentovane matične ćelije iz apikalne papile (SCAP) iz pete pasaže, koje su nakon pasažiranja i centrifugiranja, prebrojane, obeležene Bacmam fluorescentnom bojom (BacMam GFP Transduction Control, Thermo Fisher, USA) prema uputstvu proizvođača, a zatim 200.000 obeleženih ćelija je razblaženo u 10 µl DPBS. Nakon pripreme životinja u vidu anesteziranja ketaminom (100mg/kg) i ksilazinom (10mg/kg) intramuskularno, lumbalno područje je obrijano, ćelije su resuspendovane i ubrizgane pomoću *baby* injekcionog sistema i injekcione pumpe (Harvard, Japan) brzinom od 1µl/min intratekalno, kroz međupršljenski prostor L4 - L5. Životinjama je dan pred intervenciju i 3 dana nakon transplantacije MĆ aplikovan intramuskularno analgetik, Metamizol 200mg/kg (Hemopharm, Vršac, Srbija), a odmah po transplantaciji antibiotik, gentamicin 25mg/kg intramuskularno. Nakon transplantacije matičnih ćelija, životinjama je praćena promena telesne težine kao i motorika. Nakon uginuća ili eutanazije obolelih životinja predoziranje Tiopental sodijumom (Marlo pharm, Beograd, Srbija), uzet je materijal kičmene moždine. Nakon histološke pripreme uzoraka koja je podrazumevala potapanje u rastvore etanola rastuće koncentracije, zatim u ksilen i parafin, uzorci su isećeni mikrotomom na tanke listiće (debljine do 7µm), a potom su posmatrani na imunofluorescentnom mikroskopu (Axio Home, Zeiss, Germany).

### **3.20. Statistička analiza**

Podaci dobijeni u eksperimentima statistički su obrađeni pomoću statističkog softverskog paketa (SPSS 17.0, IBM, Chicago, USA). Za proveravanje normalnosti raspodele korišćen je Kolgorov-Smirnov test. U slučaju odstupanja od normalne raspodele, korišćeni su neparametarski testovi Mann Whitney test i Friedmann-ov test, a u slučaju normalne raspodele parametarski, One way Anova i Student T test. Kao statistički značajne razlike su se smatrale one sa vrednošću  $p < 0,05$ .

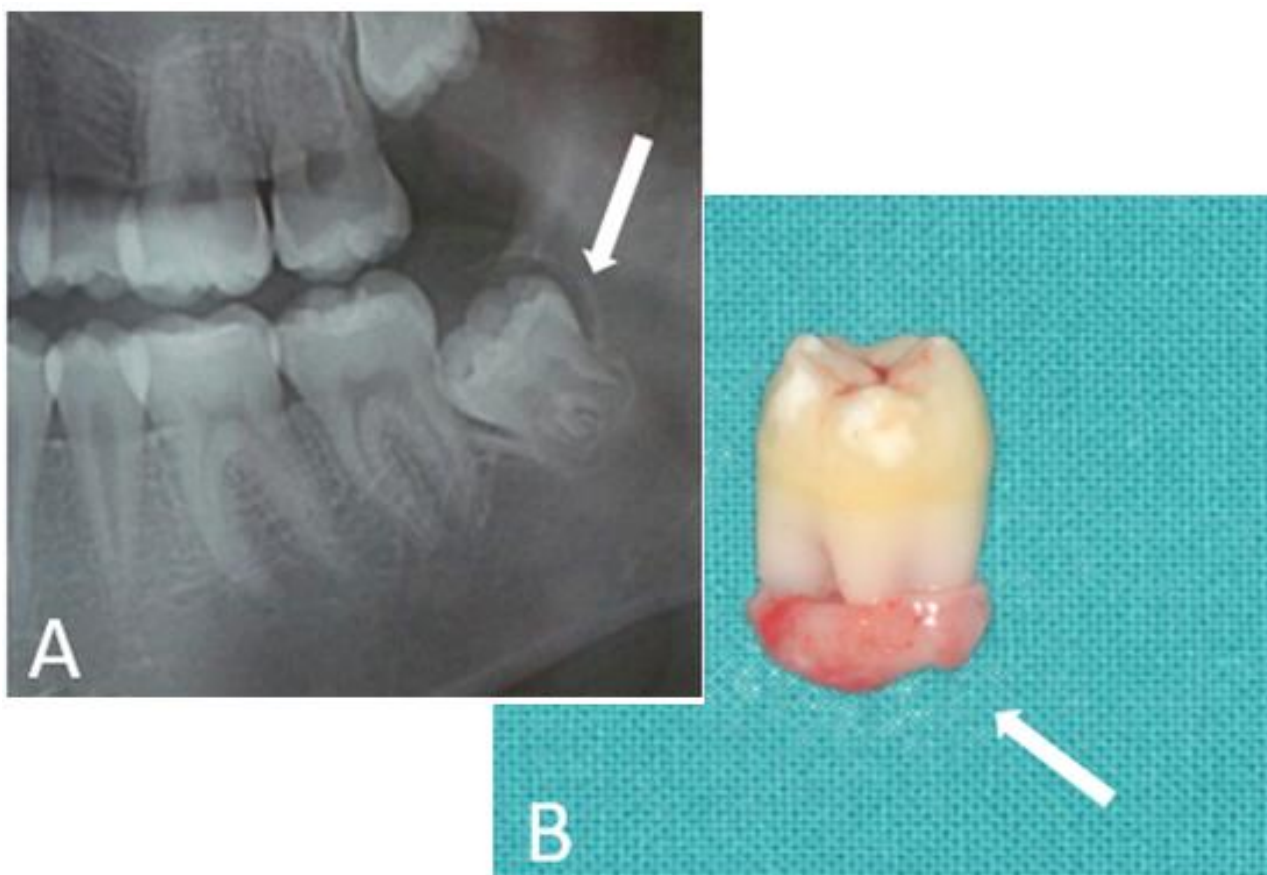


## **4. REZULTATI**

## 4. REZULTATI

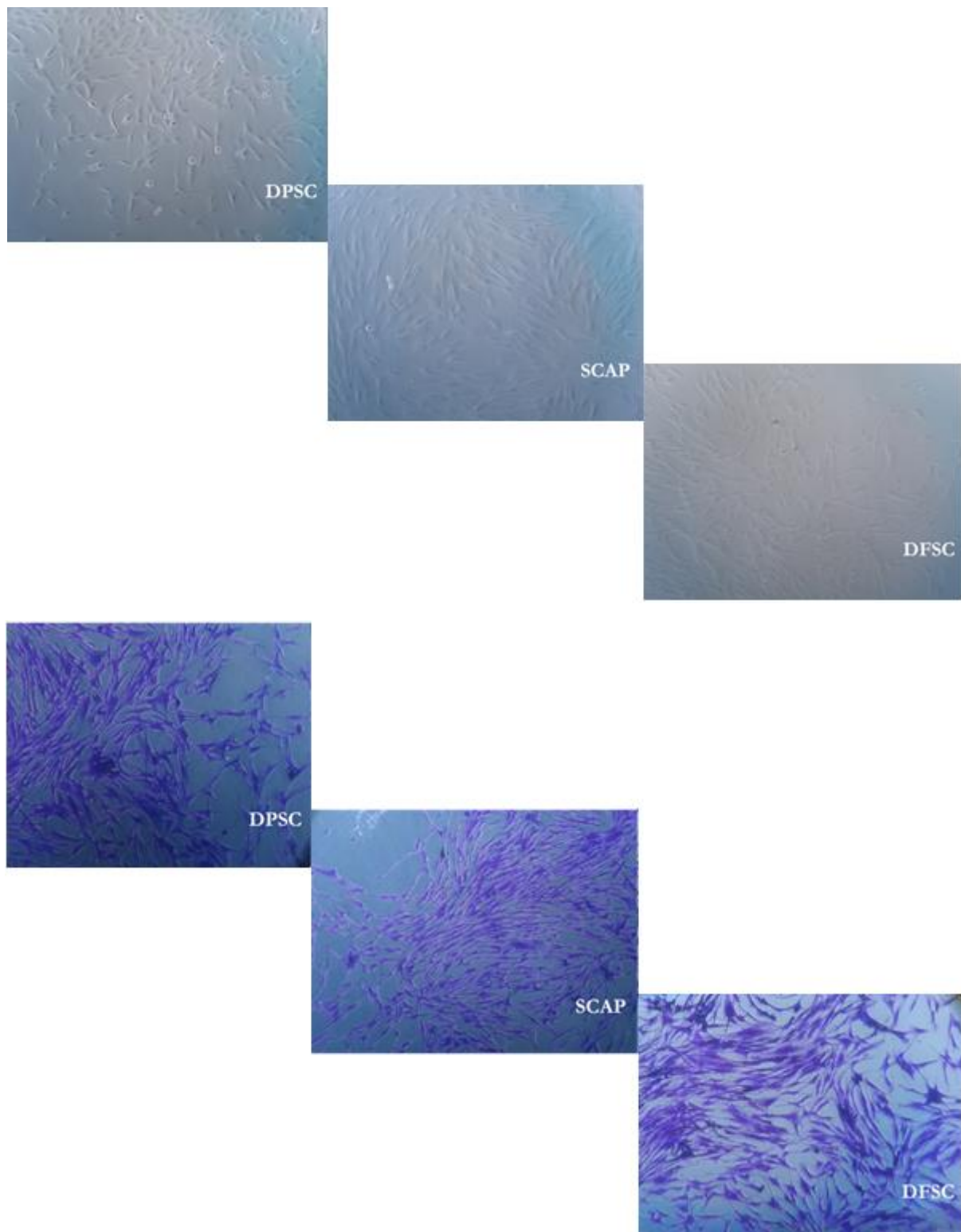
### 4.1. Izolacija i kultivacija MMC iz zubnih tkiva

Nakon vađenja zuba iz transportnog medijuma i ispiranja DPBS-om, jasno se uočava mekano tkivo zubnog folikula i apikalne pulpe (slika 11). Mekano tkivo apikalne papile je lagano presečeno u nivou mineralizovanog korena, a zatim usitnjeno na odgovarajuće dimenzije za zasejavanje u flaskove za ćelijske kulture. Folikul koji se pružao oko vrata zuba, pažljivo je uklonjen skalpelom i usitnjen do odgovarajućih dimenzija i tako tkivo je zasejano u flaskove. Korišćenjem stege, zub u sterilnoj kesi je polomljen dužno, pa je gracilno tkivo pulpe izvučeno i usitnjeno, a zatim zasejano. U flaskovima (T-25) u kojima je tkivo zasejano nalazilo se 3-4ml medijuma za kultivaciju.



**Slika 11.** Izgled umnjaka sa dva tkiva izvora DMĆ, slika A. Strelicom označen folikul, slika B. Strelicom označen izgled apikalne papile nakon vađenja zuba.

Nakon 3-4 dana uočene su prve ćelije oko komadića zasejanih tkiva u flaskovima kako formiraju primarne kolonije i u postojeći medijum je dodato još 2-3 ml svežeg kompletnog medijuma. Nakon 7-10 dana od izolacije uočen je znatno veći broj ćelija, pa je medijum za kultivaciju prvi put zamenjen u potpunosti svežim medijumom. Nakon 14-21 dan postignuta je konfluentnost, odnosno prekrivenost od 70% površine flaska, čime su stečeni uslovi za pasažu (P1). Nakon prve pasaže, ćelije su prikazale bržu proliferaciju, te je konfluentnost dostignuta za 7-10 dana. Ćelije su zadržavale karakterističan vretenasti, fibroblastima sličan oblik (slika 10). Ćelije su pasažirane do osme pasaže, ne gubeći svoje morfološke karakteristike niti sposobnost proliferacije. Nakon svake pasaže ćelije su krioprezervirane na  $-70^{\circ}$  C za potrebe istraživanja, a manji deo zasejavan u flaskove za dalje pasažiranje.

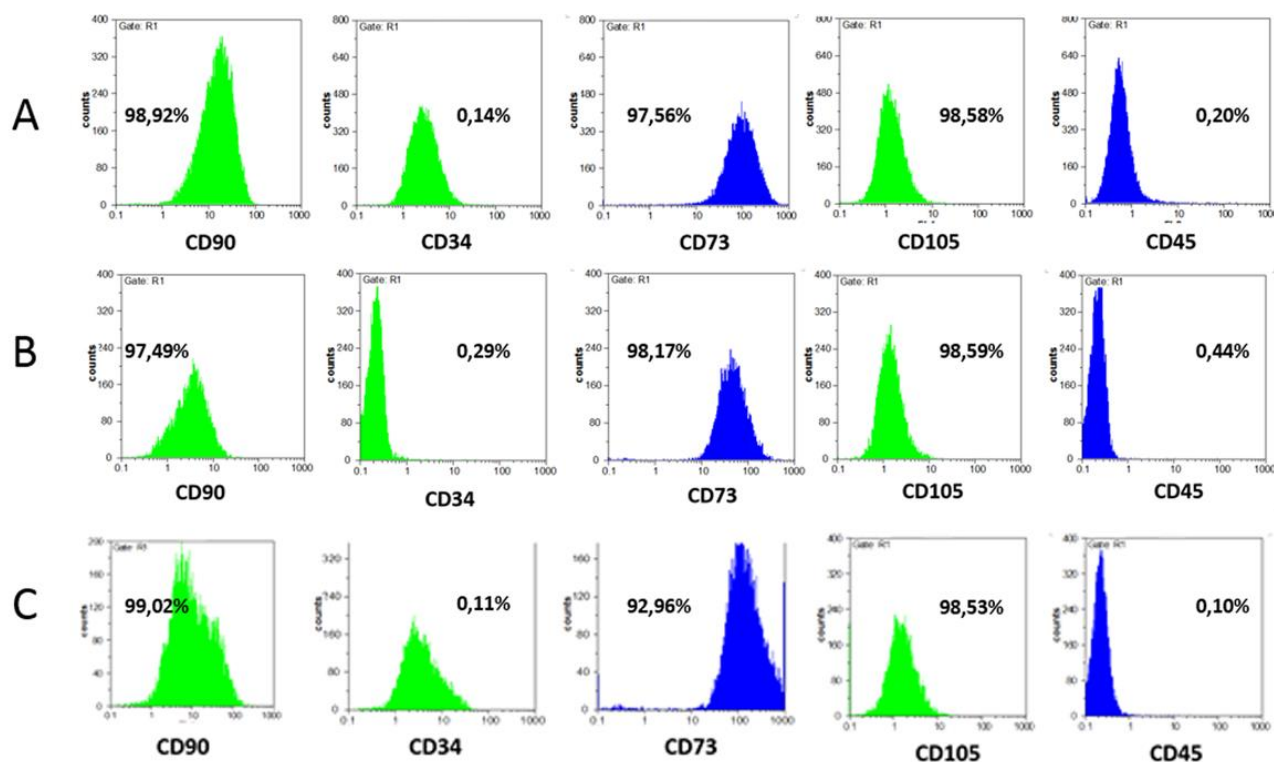


**Slika 12.** Izgled ćelija posmatranih invertnim mikroskopom bez bojenja i sa bojenjem Kristal Violetom.

## 4.2. Dokazivanje matičnosti

### 4.2.1. Protočna citometrija

Protočnom citometrijom ispitana je ekspresija transmembranskih markera matičnosti.



**Slika 13.** Protočna citometrija-Ekspresija transmembranskih markera matičnosti, **A-DPSC B-DFSC C-SCAP**

Ćelije su u visokom procentu ekspimirale mezenhimalne markere:

- CD73,
- CD 90 i
- CD105,

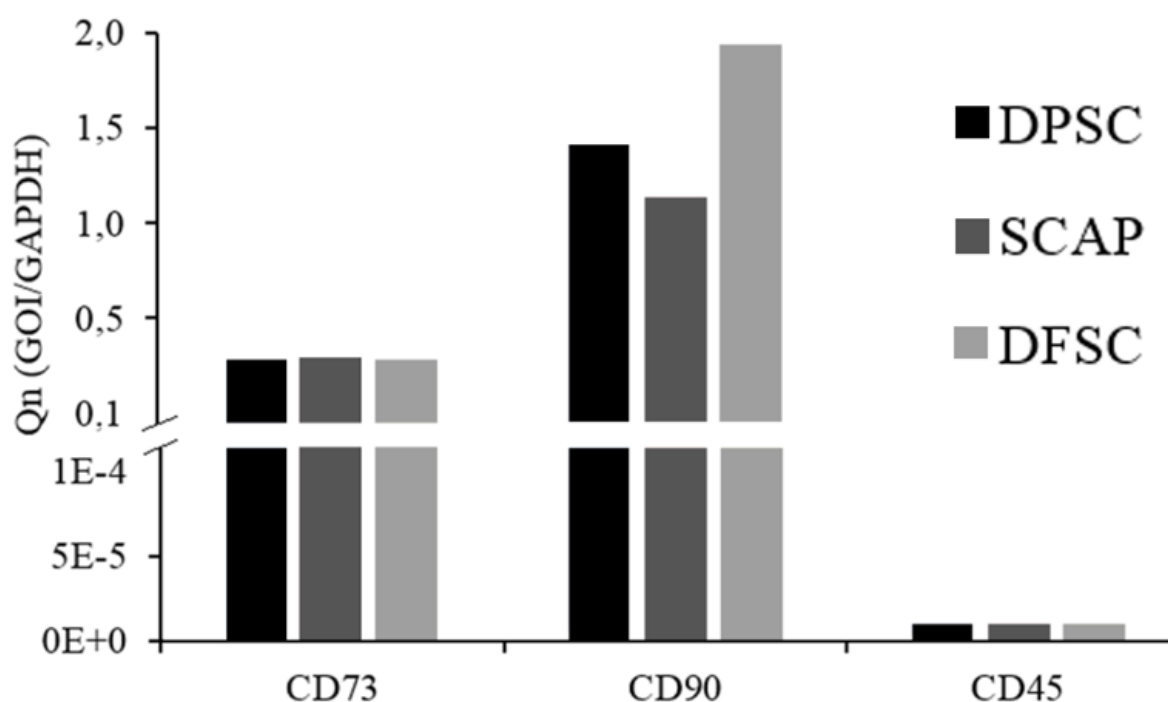
a u zanemarljivom procentu bile su pozitivne na ekspresiju hematopoetskih markera:

- CD34 i
- CD45.

Na ovaj način je dokazana njihova mezenhimalna priroda (Slika 13).

#### 4.2.2. Real-time analiza genske ekspresije

Metodom Real-Time PCR-a upoređena je ekspresija mezenhimalnih markera CD 73, CD90 i hematopoetskog markera CD45. Za razliku od skoro ujednačene ekspresije CD 73, ekspresija CD90 (Thy-1) značajno se razlikovala između izolovanih ćelija. Real-time analiza je, očekivano, potvrdila rezultate protočne citometrije u smislu zanemarljive ekspresije hematopoetskog CD 45 markera u sva tri tipa analiziranih ćelija (Slika 14).



Slika 14. Real Time PCR- ekspresija markera matičnosti

Na osnovu pozitivnih rezultata ekspresije mezenhimalnih markera dobijenih primenom metode protočne citometrije i real-time PCR analize, kao i odsustva hematopoeznih markera, izolovane ćelije su okarakterisane kao mezenhimalne matične ćelije

#### 4.2.3. Potencijal diferencijacije

##### 4.2.3.1. Osteogena diferencijacija

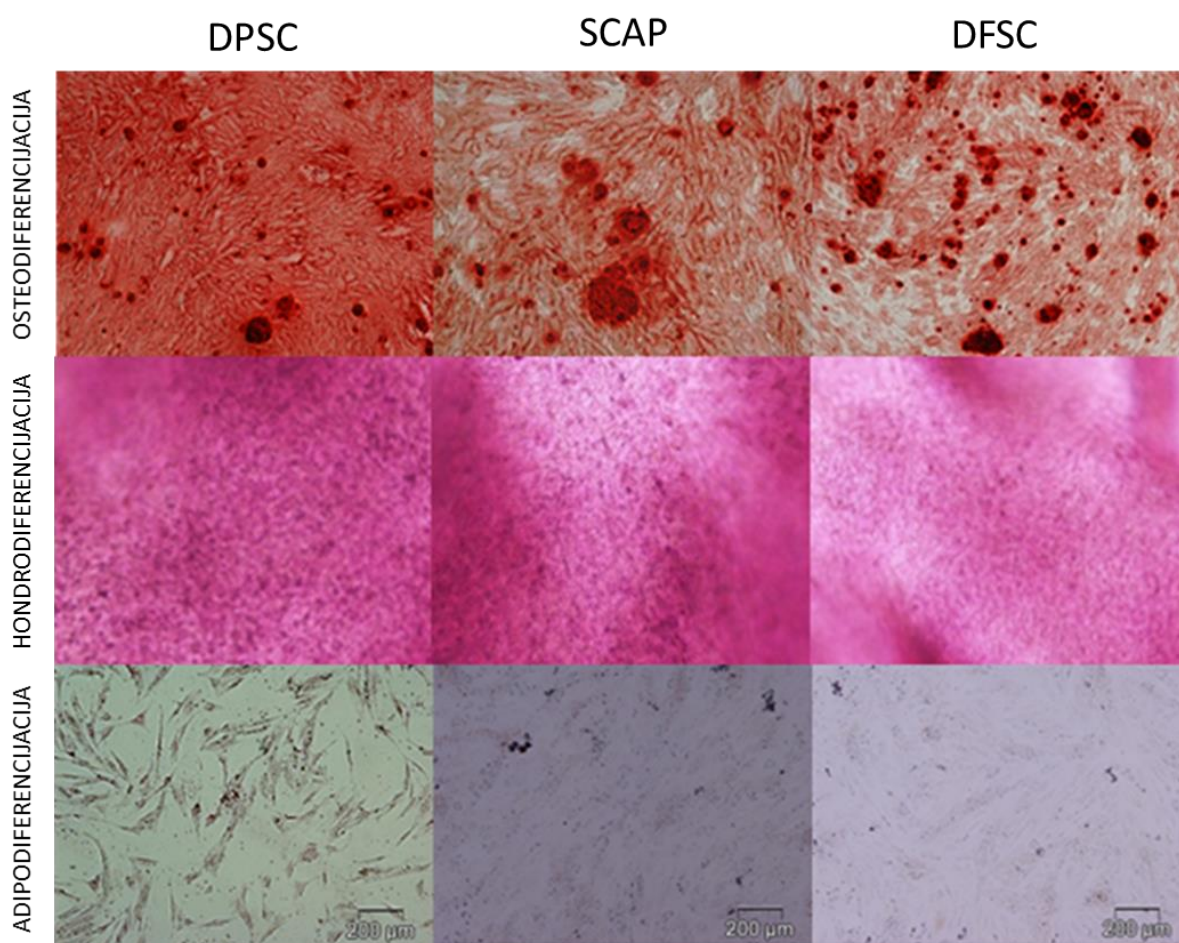
Sposobnost ćelija apikalne papile, dentalnog folikula i pulpe da se u *in vitro* uslovima diferenciraju u ćelije koštanog tkiva dokazana je bojenjem Alizarinom Red S, 21 dan nakon kultivacije ćelija u komercijalnom medijumu za koštanu diferencijaciju. Bojenjem je dokazana akumulacija minerala kalcijuma, odnosno stvaranja mineralizovanog koštanog tkiva (slika 15).

#### 4.2.3.2. Hondrogena diferencijacija

Kapacitet hondrogene diferencijacije ispitivan je pomoću bojenja histološkom bojom Safranin O i praćenjem promene ćelijske morfologije. Nakon 28 dana kultivacije ćelija poreklom od sva tri ispitivana tkiva (papilla, folikul, pulpa) u komercijalnom medijumu za diferencijaciju u hrskavičavo tkivo, ćelije su posmatrane pod mikroskopom i uočena je promena ćelijske morfologije. Naime, ćelije su izgubile karakterističan vretenasti oblik, a kontrolnim bojenjem potvrđena je akumulacija karakterističnih glikoproteina, čime je dokazana sposobnost ćelija da se uspešno diferenciraju u ćelije hrskavičavog tkiva (slika 15).

#### 4.2.3.3 Adipogena diferencijacija

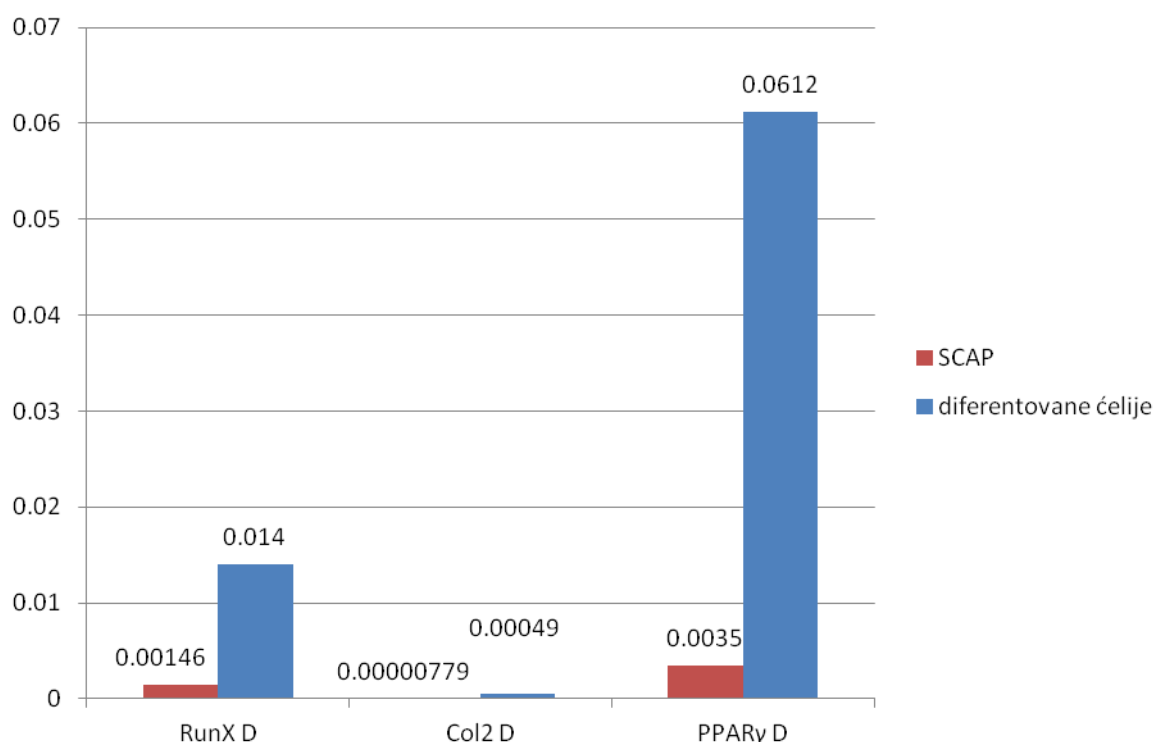
Nakon 21. dana kultivacije u komercijalnom medijumu za adipogenu diferencijaciju, ćelije apikalne papile, dentalnog folikula i pulpe, posmatrane su pod mikroskopom, i uočena je promena njihove morfologije; zatim su ćelije fiksirane PFA, pa obojene adekvatnim histološkim protokolom, radi dokazivanja intracelularnog nakupljanja lipida, histološkom bojom Oil Red O. Po ispiranju boje, ćelije su posmatrane invertnim mikroskopom, pod kojim je uočena intracelularna akumulacija lipidnih kapljica. U negativnim kontrolama, bojenje nije prikazalo akumulacije masnih vakuola intracelularno. Rezultati ukazuju na sposobnost uspešne diferencijacije u ćelije masnog tkiva (slika 15).



**Slika 15.** Diferencijacija u tri loze adekvatnim bojenjem Alizarinom Red S (potvrda osteodiferencijacije), Safraninom O (potvrda hondrodiferencijacije), Oil Red O (potvrda adipodiferencijacije).

#### 4.2.3.4 Dokazivanje diferencijacije analizom genske ekspresije markera adipo, osteo i hondro-loze

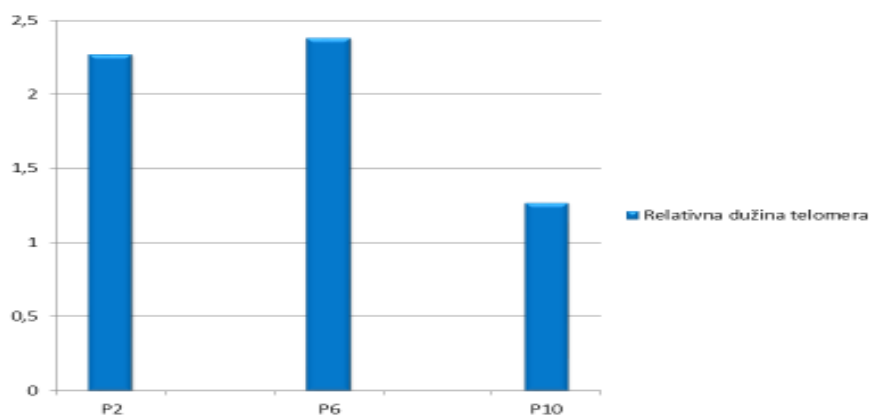
Real time PCR analizom genske ekspresije potvrđena je uspešna diferencijacija matičnih ćelija (u ovom eksperimentu korišćene su samo ćelije apikalne papile). Diferentovane ćelije su u odnosu na kontrolnu grupu pokazale višestruko povećanu ekspresiju *RunX* – markera koštanog tkiva (9,59 x više od kontrolne grupe), *Col2* – markera hrskavičavog tkiva (62,90 x) i *PPAR $\gamma$*  – markera masnog tkiva (17,48 x) (Slika 16).



**Slika 16.** Razlike u ekspresiji markera koštanog, hrskavičavog i masnog tkiva, pre diferencijacije (SCAP) i nakon diferencijacije

#### 4.3. Određivanje dužine telomera

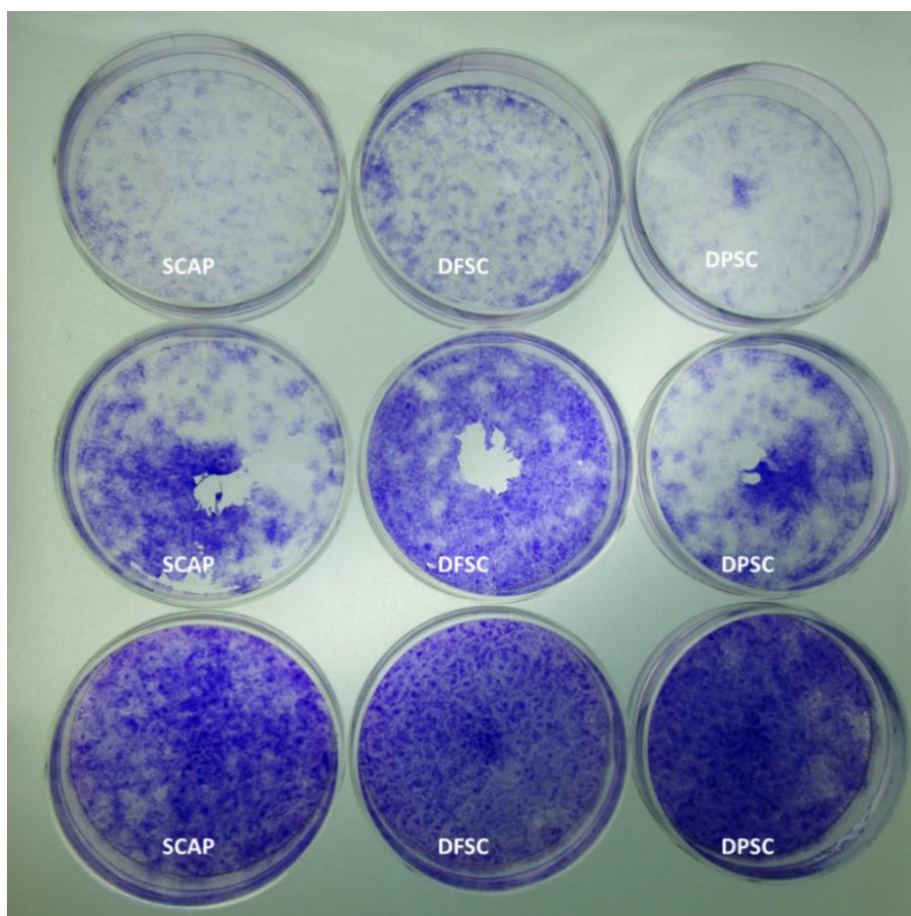
Kao dopunski test dugotrajnog održavanja stanja matičnosti ispitivanih mezenhimalnih ćelija, određena je i dužina njihovih telomera tokom većeg broja pasaža. Prema očekivanjima, bez obzira na malo skraćivanje telomera tokom vremena, nije uočena statistički značajna razlika između dužina telomera ćelija prvih deset pasaža, odnosno nije došlo da ćelijskog starenja koje bi se manifestovalo skraćivanjem telomera. Na slici 17 prikazane su dužine telomere SCAP, u nekoliko odabranih pasaža (na početku, u sredini i na kraju eksperimenta).



**Slika 17.** Relativne dužine telomere nakon druge, šeste i desete pasaže SCAP

#### 4.4. Test formiranja kolonija (CFU test)

Na slici 18 prikazane su ćelije sva tri tipa nakon 7, 10 i 14 dana. Uočljiv je visok klonogeni potencijal i značajna proliferacija već nakon 7 dana. Nakon 10 dana došlo je do značajnog povećanja broja ćelija i kolonija, a nakon 14 dana površina bunarića bila je kompletno prekrivena ćelijama.

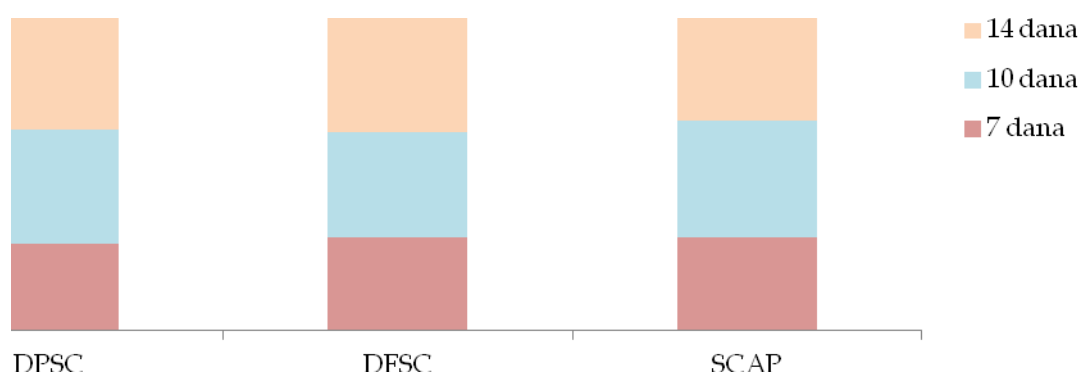


**Slika 18.** Proliferacija tri ćelijske linije nakon 7, 10 i 14 dana



Analizom intenziteta akumulirane boje uz pomoć softvera dobijeni rezultati su predstavljeni dijagramom (slika 19).

Nije uočena statistički značajna razlika u kapacitetu diferencije tri vrste ćelija.



**Slika 19.** Proliferacija ćelija nakon 7,10 i 14 dana

#### 4.5. Ramanska spektromikroskopija

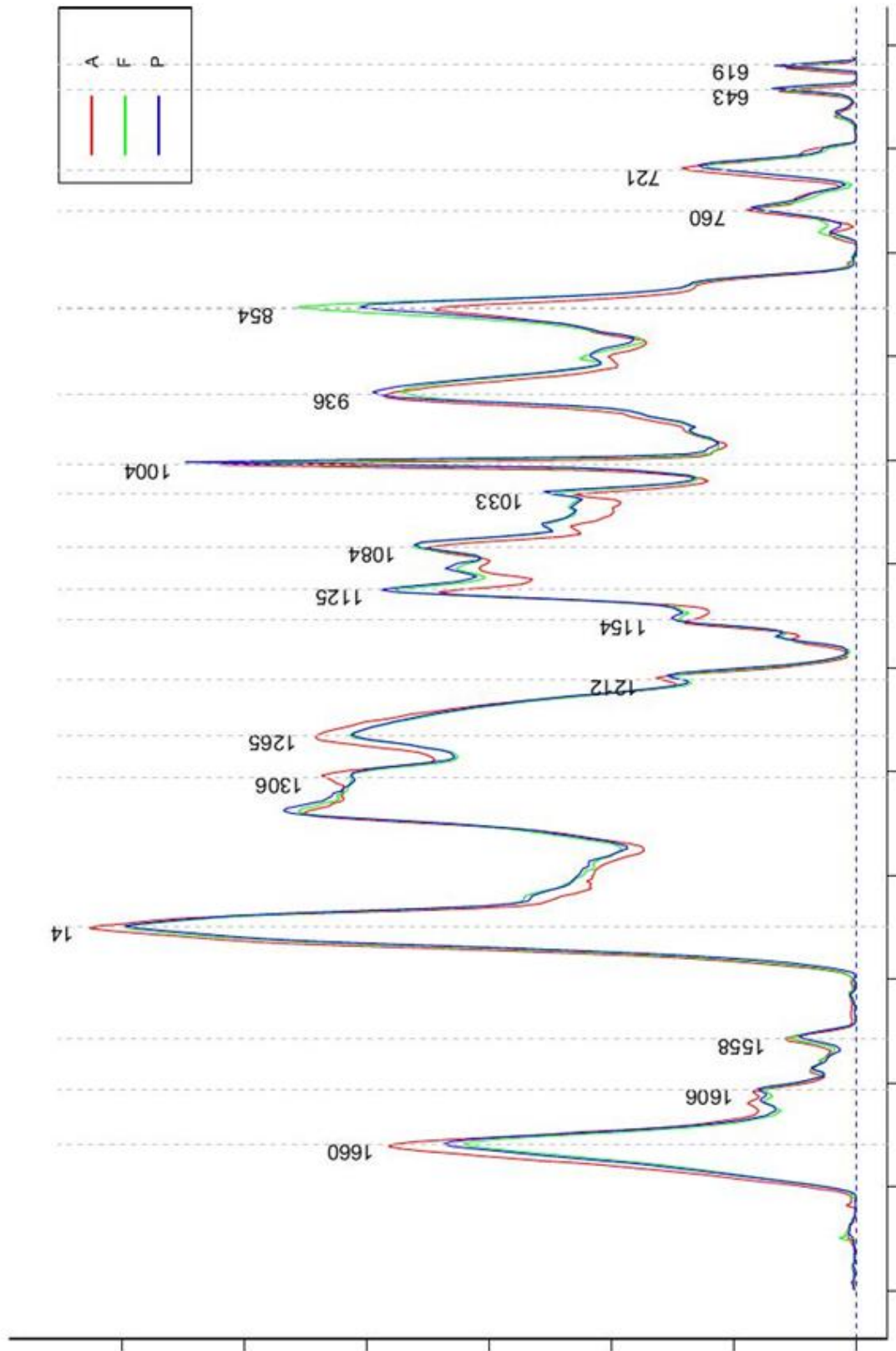
Ramanskom spektromikroskopijom dobijeni su karakteristični spektri sve tri ćelijske linije izolovane od tri pacijenta (Slike 20, 21, 22, 23).

Usrednjeni spektri DPSC, DFSC i SCAP pokazuju jasne sličnosti u glavnim Ramanovim pikovima. Međutim, uočene su i značajne razlike između njih. Uopšteno govoreći, najvažnije razlike primećene su između DFSC i DPSC; naime od 20 pikova, 11 se statistički značajno razlikovalo. Statistički značajne su i razlike između SCAP i DFSC u 8 pikova, dok su statističke značajnosti između SCAP i DPSC zabeležene samo u 4 pika (Slike 20, 21, 22, 23). R4 marker matičnosti, odn. nediferentovanosti ćelija (odnos između proteina i nukleinskih kiselina na talasnim dužinama 748/770), koji se smatra pouzdanim parametrom za diskriminaciju više od manje diferenciranih ćelija, pokazao je značajnu razliku između sva tri tipa ćelija (SCAP - DFSC,  $P = 0,018$ ; SCAP - DPSC,  $P < 0,001$ ; DFSC - DPSC,  $P = 0,009$ ).

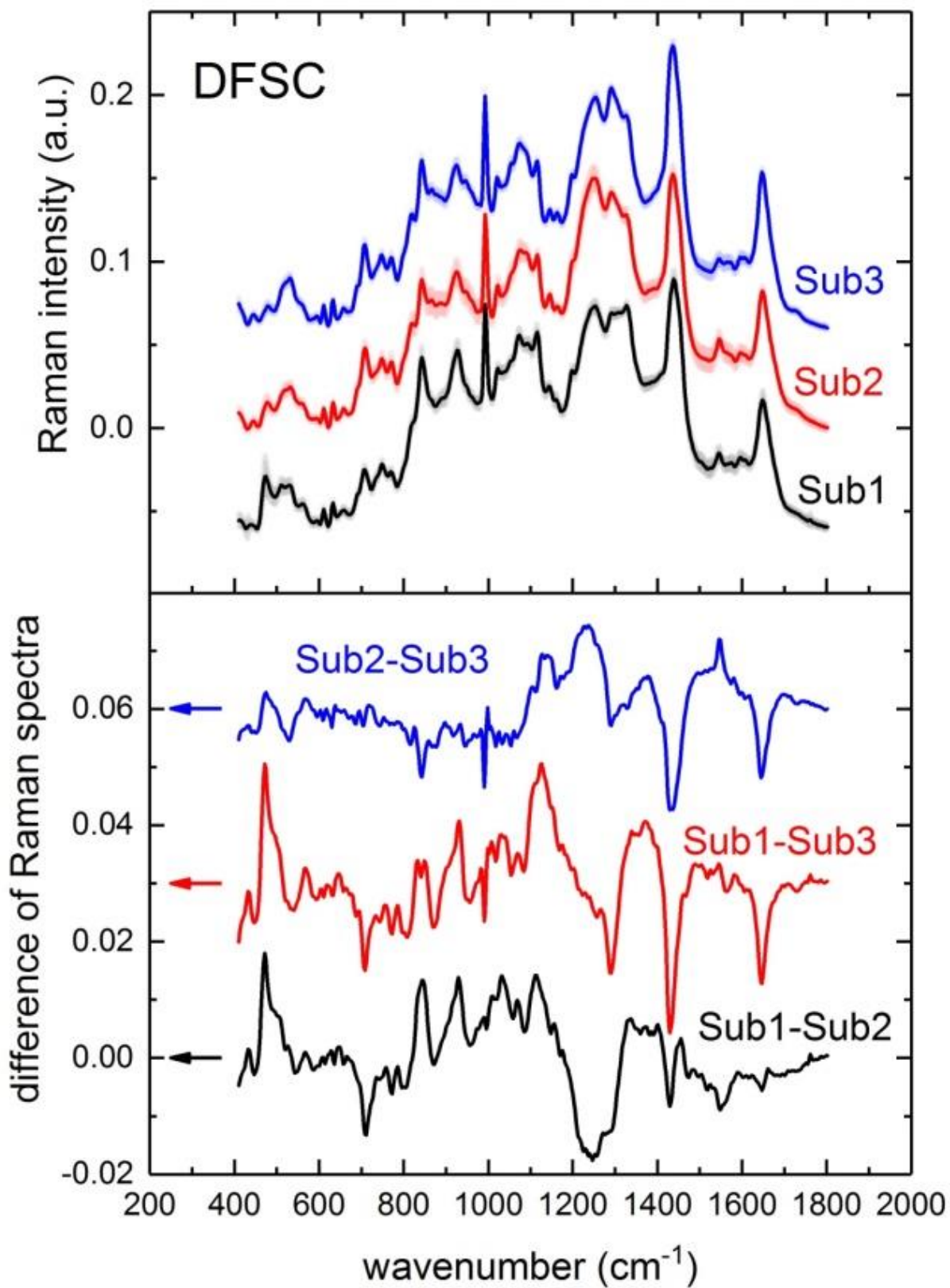
Prema vrednostima R4 može se uslovno zaključiti da opada potencija analiziranih ćelija u sledećem odnosu SCAP > DFSC > DPSC, odnosno da ćelije apikalne papile pokazuju najveću matičnost, a ćelije pulpe najmanju. (Tabela 6).

Tabela 6. Položaj Ramanskih spektara i vrednosti SCAP, DFSC i DPSC

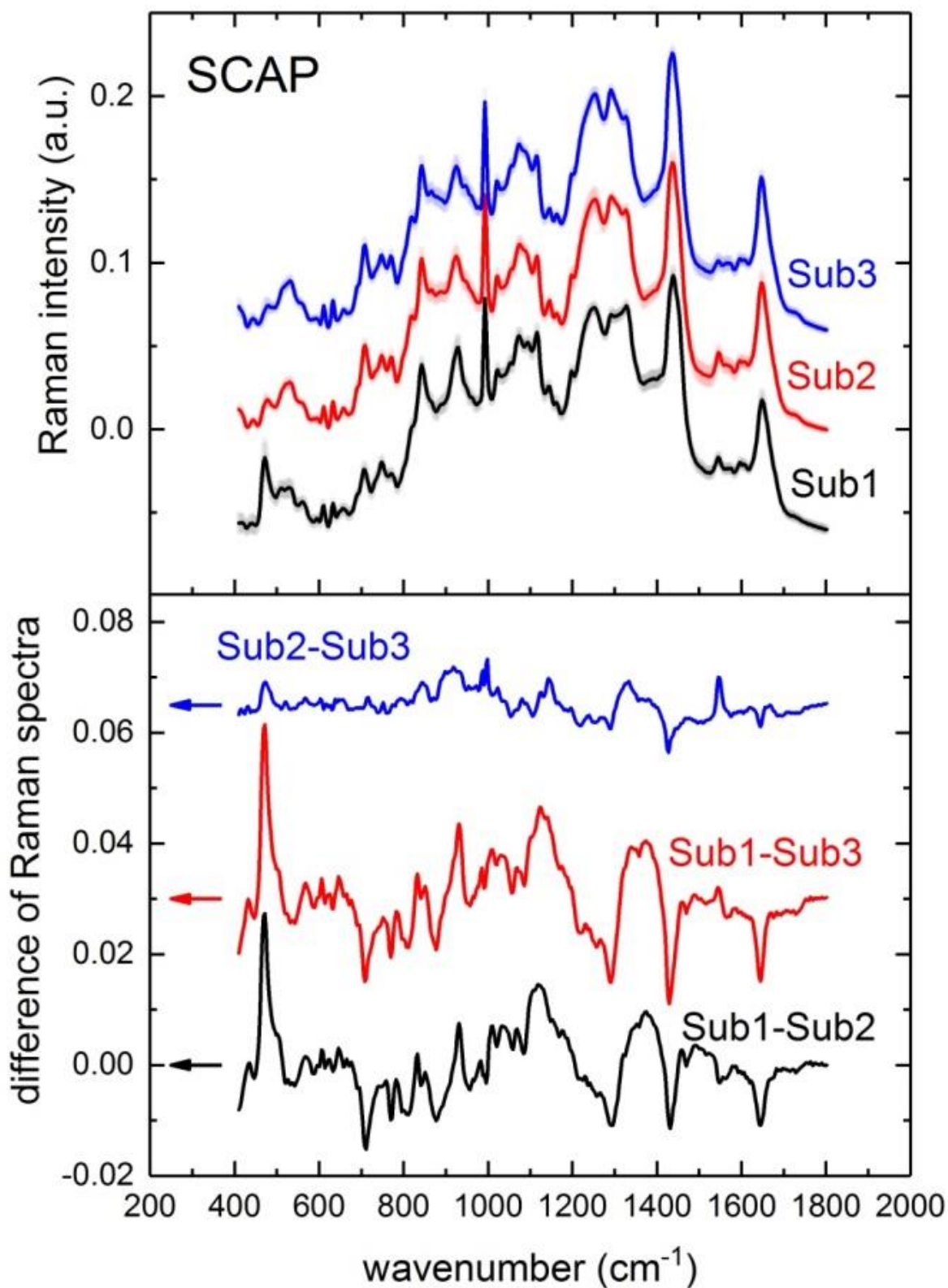
Položaj Ramanovih pikova (cm <sup>-1</sup> )	Intenzitet Raman pika			<i>p</i> -vrednosti		
	Apikalna papila ( <i>ap</i> )	Folikul ( <i>f</i> )	Pulpa ( <i>p</i> )	<i>ap</i> vs. <i>f</i>	<i>ap</i> vs. <i>p</i>	<i>f</i> vs. <i>p</i>
471 glikogen*	-0.043 (0.021)	-0.047 (0.012)	-0.047 (0.038)	0.008	0.501	0.166
612 C-C istežanje	-0.046 ± 0.002	-0.048 ± 0.002	-0.047 ± 0.002	<0.001	0.001	0.376
706 lipidi*	-0.013 (0.011)	-0.013 (0.012)	-0.014 (0.013)	NS	NS	NS
748 protein	-0.017 ± 0.003	-0.018 ± 0.004	-0.017 ± 0.004	NS	NS	NS
754 protein	-0.021 ± 0.003	-0.022 ± 0.004	-0.021 ± 0.004	NS	NS	NS
785 DNK-RNK	-0.032 ± 0.003	-0.033 ± 0.003	-0.033 ± 0.003	NS	NS	NS
843 glikoprotein	0.040 ± 0.006	0.037 ± 0.009	0.044 ± 0.010	0.079	0.002	<0.001
929 glikoprotein	0.042 ± 0.008	0.038 ± 0.008	0.044 ± 0.012	0.010	0.267	<0.001
993 triptofan	0.078 ± 0.007	0.074 ± 0.008	0.077 ± 0.011	0.004	0.392	0.131
1023 proteini	0.032 ± 0.005	0.030 ± 0.006	0.034 ± 0.007	0.111	0.024	<0.001
1074 lipidi	0.053 ± 0.005	0.051 ± 0.006	0.055 ± 0.009	0.194	0.041	<0.001
1094 DNK*	0.045 (0.020)	0.045 (0.006)	0.046 (0.012)	0.108	0.164	0.006
1116 protein*	0.046 (0.010)	0.043 (0.010)	0.045 (0.020)	0.016	0.495	0.002
1198 nukleinske kis.*	0.033 (0.010)	0.035 (0.010)	0.031 (0.000)	0.028	0.004	<0.001
1252 lipidi	0.078 ± 0.006	0.081 ± 0.008	0.075 ± 0.008	0.010	0.163	<0.001
1293 lipidi*	0.080 (0.010)	0.081 (0.010)	0.079 (0.010)	0.086	0.194	0.004
1329 guanine	0.070 ± 0.004	0.068 ± 0.004	0.070 ± 0.006	0.043	0.978	0.023
1439 lipidi, proteini*	0.100 (0.010)	0.096 (0.020)	0.100 (0.020)	NS	NS	NS
1546 nukleinske kis.	0.091 ± 0.004	0.090 ± 0.006	0.089 ± 0.008	<0.001	0.269	<0.001
1649 proteini	0.026 ± 0.008	0.025 ± 0.008	0.022 ± 0.010	0.816	0.020	0.088
754/785	0.690 ± 0.060	0.612 ± 0.085	0.648 ± 0.068	<0.001	0.001	0.004



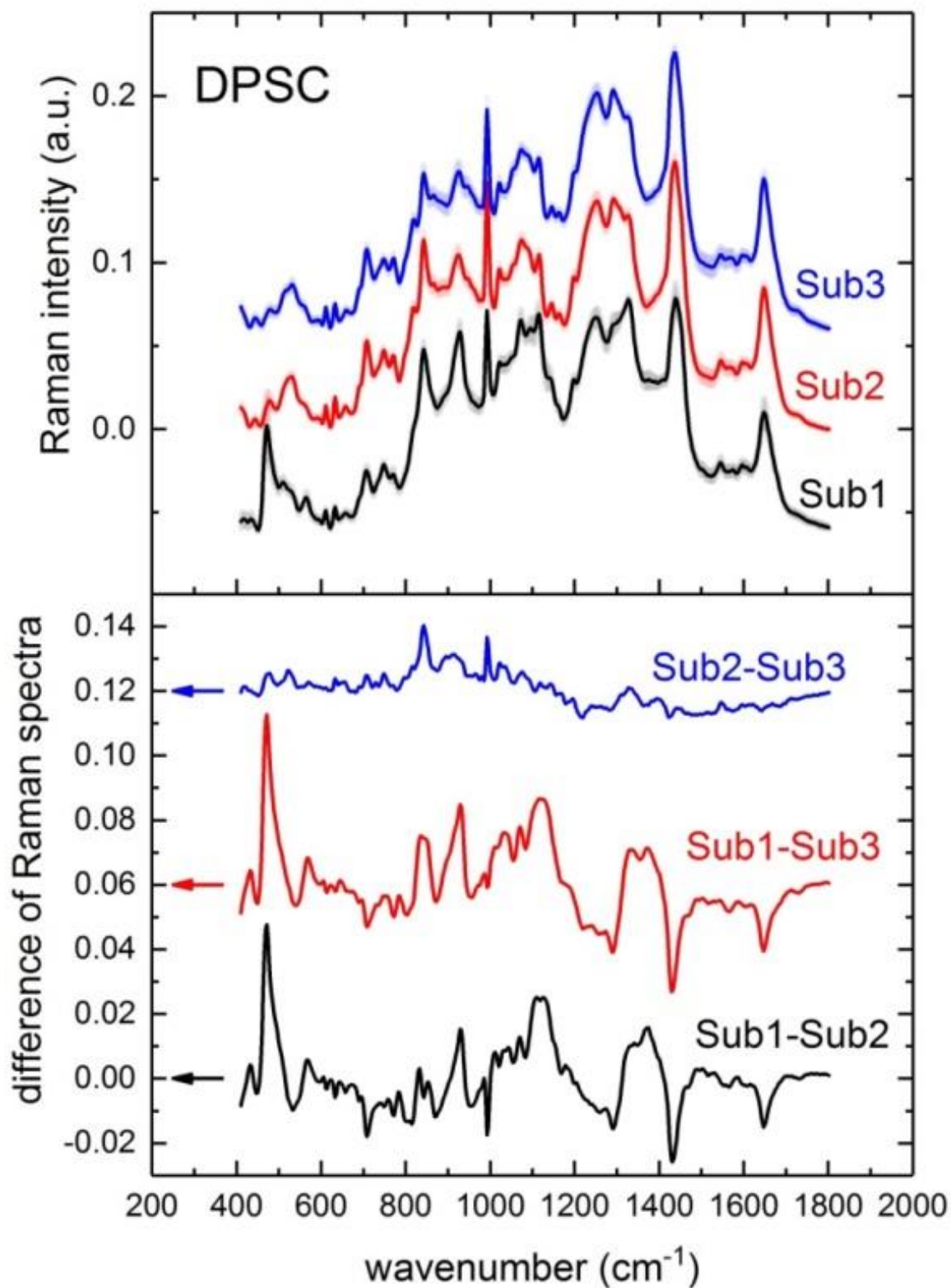
**Slika 20.** Ramanski spektri SCAP (A), DFSC (F) i DPSC (P) prvog pacijenta



**Slika 21.** Ramanski spektri DFSC sva tri pacijenta



Slika 22. Ramanski spektri SCAP sva tri pacijenta

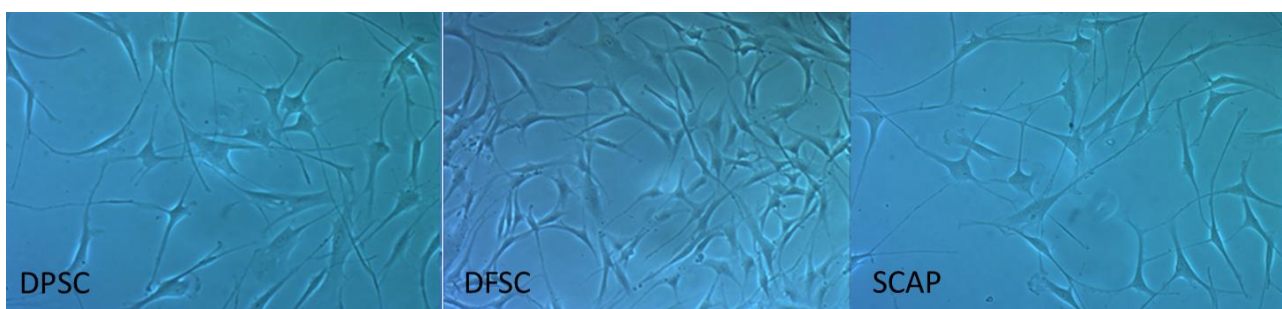


**Slika 23.** Ramanski spektri DPSC sva tri pacijenta

## 4.6. Neurogena diferencijacija

### 4.6.1 Svetlosna mikroskopija ćelija nakon neuroindukcije

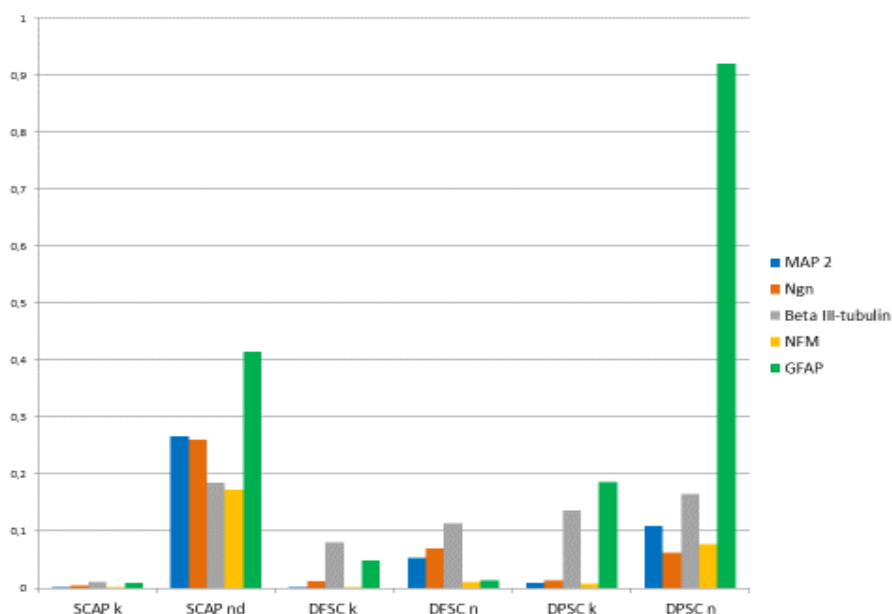
Eksperimenti neurogene diferencijacije matičnih ćelija apikalne papile, dentalnog folikula i pulpe uz pomoć odgovarajućeg medijuma za neurodiferencijaciju, u trajanju 5-7 dana, pokazali su pod svetlosnim mikroskopom postojanje jasnih promena ćelijske morfologije. Nakon nedelju dana kulture, nemoguće je bilo očekivati zrele neurone, ali oblik ćelija je upućivao na pojavu neuronima sličnih ćelija (neuron-like cells), odnosno nezrelih neurona. Ćelije su imale trouglasta tela i dugačke, gracilne produžetke, kojima su se međusobno povezivale (slika 24.). U pogledu morfologije, ćelije poreklom od sva tri ispitivana zubna tkiva izgledale su slično nakon neuroindukcije.



**Slika 24.** Promene u ćelijskoj morfologiji nakon neuroindukcije u sva tri tipa dentalnih matičnih ćelija.

### 4.6.2. Analiza ekspresije gena specifičnih za neurodiferencijaciju

Kvantitativnim PCR-om pokazano je da sve tri vrste dentalnih matičnih ćelija (SCAP, DFSC, DPSC) eksprimiraju markere neurogene loze, ali se nivoi ekspresije značajno razlikuju od jednog do drugog tipa ćelije (Slika 25).



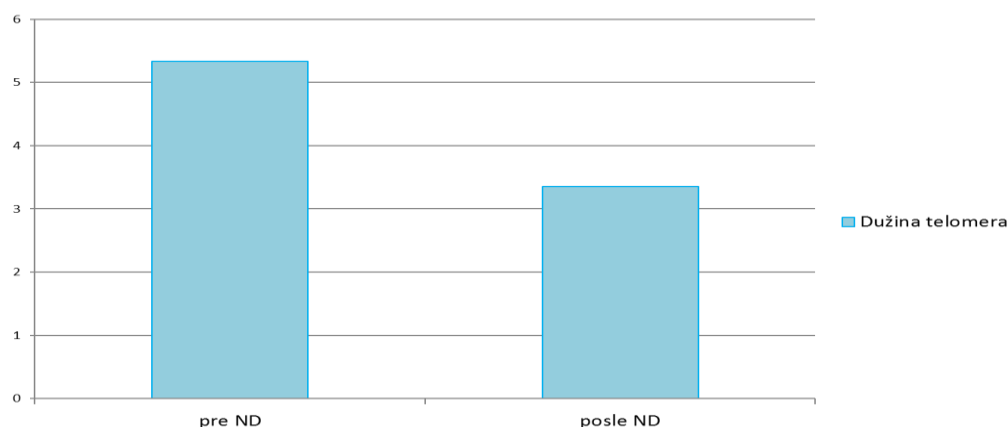
**Slika 25.** Relativni nivo genske ekspresije odabranih markera neurodiferencijacije u ćelijama apikalne papile, dentalnog folikula i pulpe pre i nakon neuroindukcije

Bez obzira što su sva tri tipa ćelija nakon neuroindukcije pokazala porast markera neuro-loze, taj porast je ubedljivo bio najizraženiji u ćelijama apikalne papile. MAP2, Ngn i NFM su pokazali najveći porast u ćelijama papile, u odnosu na preostala dva tipa matičnih ćelija. Zanimljivo je da je i marker neuroglije (GFAP) takođe porastao u svim ćelijama, sa izuzetkom dentalnog folikula. Porast GFAP bio je najveći u ćelijama pulpe (Slika 25).

#### 4.6.3. Dužina telomere nakon neurodiferencijacije

Na osnovu prethodnih eksperimenata ustanovljeno je da ćelije apikalne papile (a) poseduju najveću matičnost odnosno da su najnezrelije (utvrđeno ramanskom mikrospektroskopijom) i (b) pokazuju najviši nivo ekspresije neuralnih markera. Stoga su one odabrane za dalja istraživanja neurodiferencijacije.

Relativna dužina telomere proverena je nakon neuroindukcije i, prema očekivanju, proces ćelijske diferencijacije rezultovao je skraćanjem telomera (Slika 26). U ovom eksperimentu korišćene su ćelije pete pasaže.



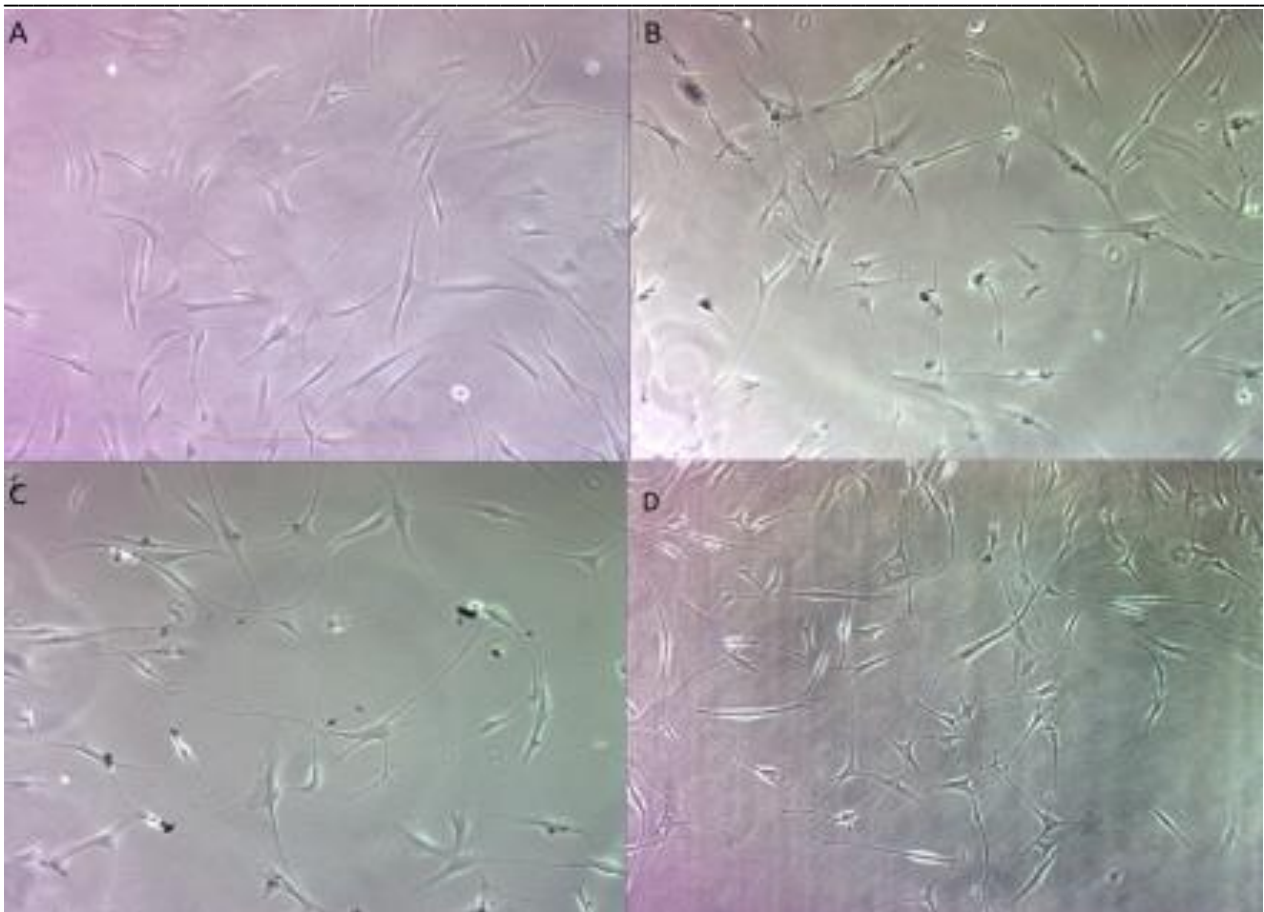
**Slika 26.** Relativna dužina telomere nakon procesa neurodiferencijacije (prikazana je srednja vrednost dužina telomere nakon 5. pasaže)

#### 4.6.4. Neuroindukcija potpomognuta nanomaterijalima

Kako je prethodno napomenuto, zbog boljih karaktersitika neuroinduktivnosti, dalji eksperimenti su rađeni na ćelijama apikalne papile. U novom eksperimentu neurodiferencijacija vršena je u prisustvu nanomaterijala (grafenske disperzije i karbonskih nanotuba). Ćelije su svakodnevno posmatrane i praćene pod svetlosnim mikroskopom. Sedmog dana od neuroindukcije su fotografisane (slika 27).

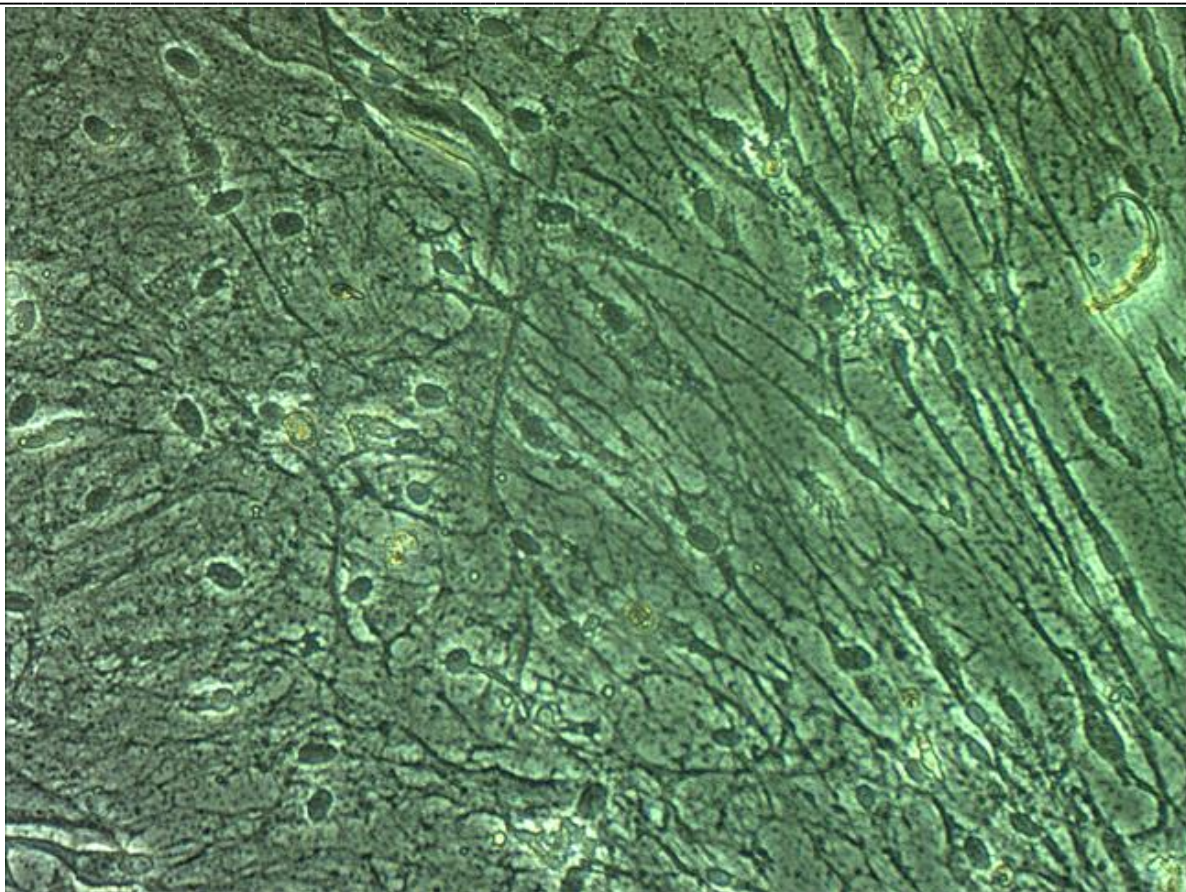
Ćelije gajene u okviru ova četiri protokola pokazale su izvesne razlike u morfologiji. Kod ćelija gajenih u medijumu za diferencijaciju bez dodatih nanomaterijala (A), uočena je očekivana morfologija nezrelih neurona, kao i kod ćelija gajenih sa SWCNT (B). Protokol C, odnosno ćelije koje su gajene sa grafenskom disperzijom pokazale su najduže tanke produžetke i trouglasta ćelijska tela karakteristična za neuronima slične ćelije. U slučaju kombinacije nanomaterijala SWCNT i grafenske disperzije (D) ćelije su takođe postigle ubedljivu neuronsku morfologiju.





**Slika 27.** Morfologija neuro indukovanih ćelija gajenih po A, B, C i D protokolu na svetlosnom invertnom mikroskopu

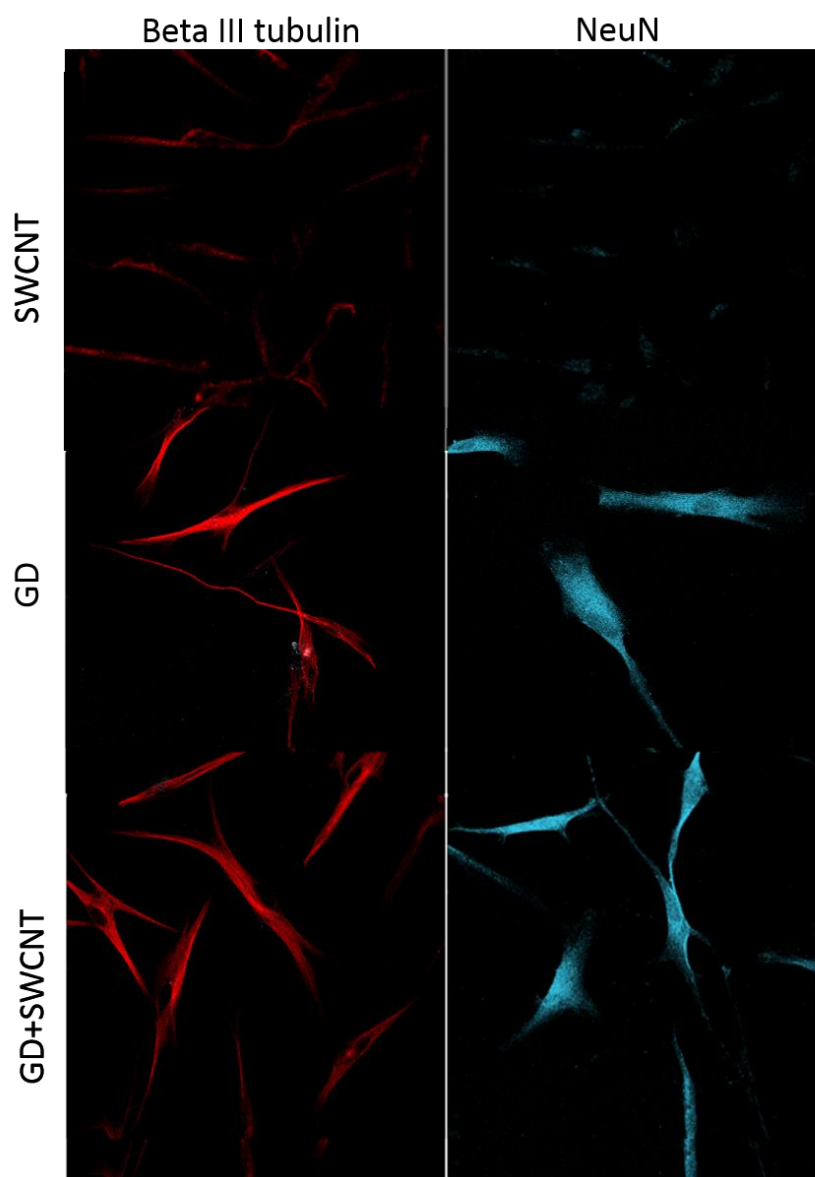
U odvojenom eksperimentu u kom su ćelije bile izložene neuroindukciji sa SWCNT, pod istim uslovima kako je opisano, a nakon 15 dana kultivacije u medijumu za neurodiferencijaciju, uočene su takođe izražene promene morfologije, odnosno ćelije su posedovale neuronu sličan oblik i veoma izdužene nastavke (aksone), a pored toga su pokazivale i tendenciju međućelijskog povezivanja (Slika 28). Dalja kultivacija ćelija u istom medijumu rezultovala je postupnim gubitkom tipične morfologije neurona.



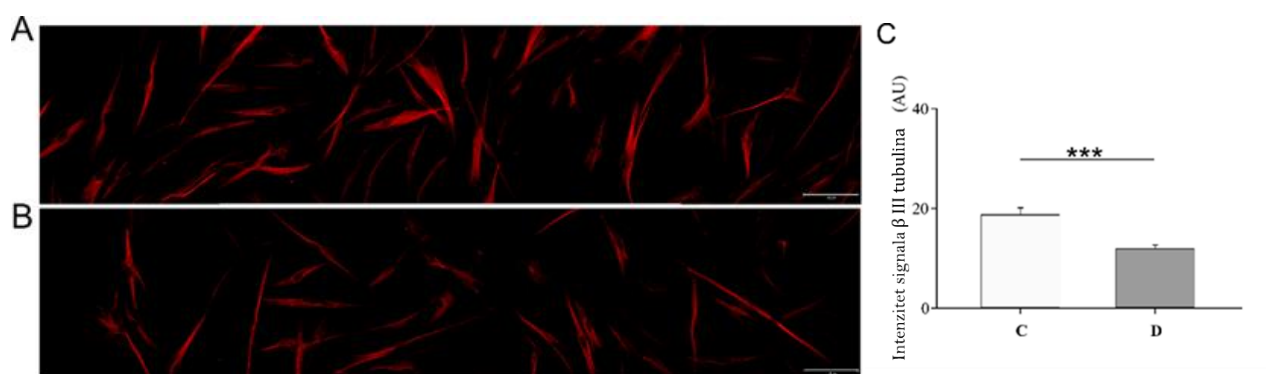
**Slika 28.** Ćelije apikalne papile nakon 15 dana kultivacije u medijumu sa SWCNT, sa izraženim kraćim i dužim nastavcima

#### 4.6.5. Dokazivanje neurodiferencijacije imunocitohemijom

Pored karakteristične morfologije pokazane svetlosnom mikroskopijom, neuronska morfologija kultivisanih ćelija, potvrđena je i imunofluorescentnom mikroskopijom. Naime, sem karakterističnog oblika, ćelije su ekspimirale i markere neuralne loze, sa njihovom očekivanom ćelijskom lokalizacijom. U prvoj seriji eksperimenata urađena je komparativna studija tri protokola u kojima su korišćeni nanomaterijali i imunocitohemija je potvrdila ekspresiju beta III tubulina i NeuN, sa različitim nivoom ekspresije u zavisnosti od primenjenog protokola (Slika 29). Na slici 30 dat je prikaz kvantifikacije beta III tubulina koja je pokazala statistički značajnu razliku u imunobojenju ćelija između protokola u kom je korišćen GD (protokol C) i GD+SWCNT (protokol D).

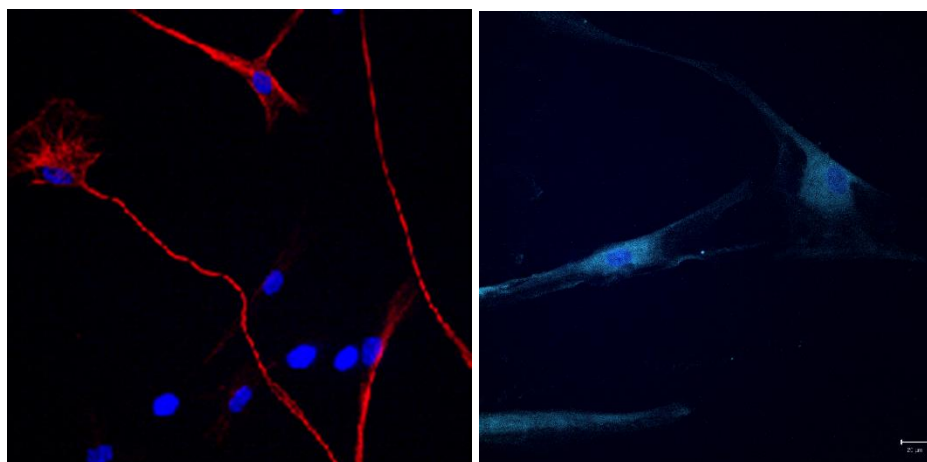


**Slika 29.** Uporedna imunocitohemijska analiza dva markera neurodiferencijacije (beta III tubulin i NeuN) u ćelijama gajenim po tri različita protokola

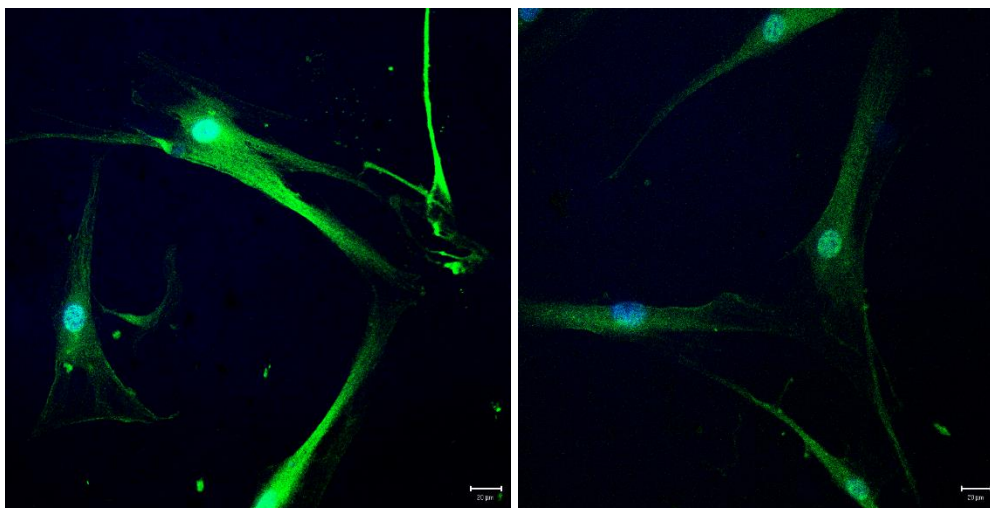


**Slika 30.** (A) ekspresija  $\beta$  III tubulina bila je veća kod ćelija gajenih samo sa GD u odnosu na ćelije gajene sa GD i SWCNT-PABS (B). Razlika u ekspresiji  $\beta$  III tubulina pokazuje statističku značajnost (C).

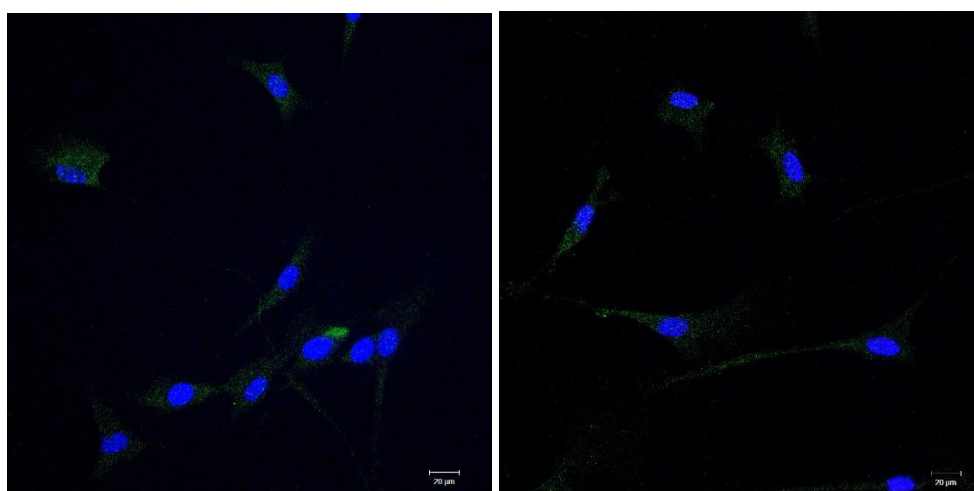
Protokol sa grafenskom disperzijom dao je najjači imunofluorescentni signal. Stoga je imunocitohemijska analiza ponovljena još sa dva markera (MAP2 i GFAP), ali koristeći isključivo pomenuti protokol (protokol C). Na slikama 31, 32 i 33 dato je još nekoliko reprezentativnih mikrografija dobijenih konfokalnom mikroskopijom za sva tri neuralna markera (beta III tubulin, NeuN i MAP2) kao i za glijalni marker GFAP. U generisanim ćelijskim kulturama, pored dominantne ekspresije neuralnih markera, u pojedinim ćelijama utvrđeno je prisustvo markera specifičnog za neurogliju (GFAP-glijalni fibrilarni kiseli protein), što upućuje na zaključak da su u procesu diferencijacije malobrojne ćelije indukovane i u tom pravcu.



**Slika 31.** Ekspresija beta III tubulina i NeuN



**Slika 32.** Ekspresija neuralnog markera MAP2



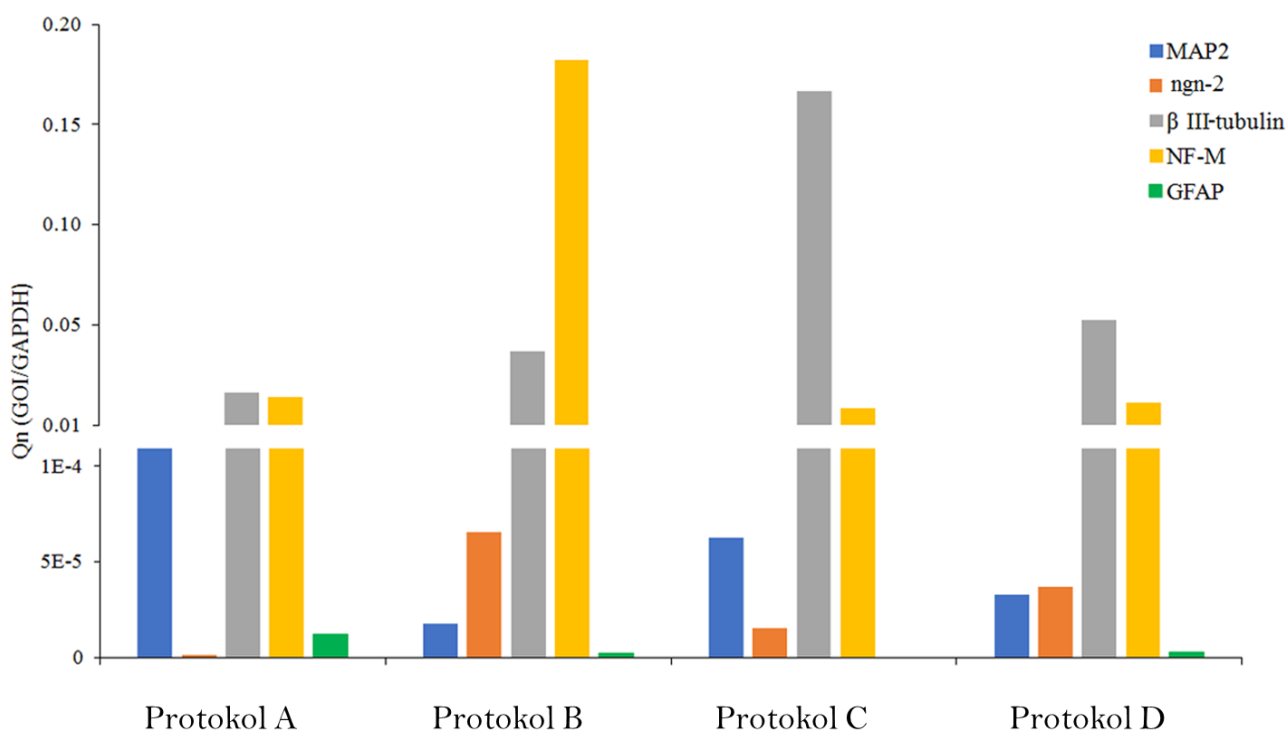
**Slika 33.** Diskretna ekspresija GFAP-neurogljalni markera

#### 4.6.6. Dokazivanje neurodiferencijacije preko genske ekspresije specifičnih markera

Na osnovu prethodno urađenih pilot eksperimenata, utvrđeno je da je optimalni period za analizu ekspresije markera neurodiferencijacije i postizanje karakteristične morfologije, otprilike 7 dana nakon neuroindukcije. Analiza relativne ekspresije pet neuralnih markera MAP2 (mikrotubularni protein 2), NF-M (neurofilament medijum), Ngn (neurogenin),  $\beta$  III tubulin i GFAP (glijalni fibrilarni kiseli protein) predstavljene su na slici 34.

Ispostavilo se da su sva četiri protokola pokazala pozitivan efekat na neurodiferencijaciju, s tim da su bile prisutne varijacije u pogledu ekspresije različitih markera. Zanimljivo je da je ekspresija MAP2 gena koji kodira sintezu glavne komponente neuronskog citoskeleta i markera neurogeneze, bila najizraženija u kulturama gajenim bez dodatka nanomaterijala. Ekspresija gena NF-M, koji takođe kodira komponentu neuronskog citoskeleta od presudnog značaja za razvoj aksona, kao i proneuronskog gena ngn-2 bila je najviša u ćelijama gajenim u prisustvu karbonskih nanotubica (SWCNT). Protokoli C i D (samo grafenska disperzija, odnosno kombinacija SWCNT i GD) imali su slične efekte u smislu relativno visoke ekspresije  $\beta$  III tubulina i NF-M-a, a nešto niži nivo MAP2.

Takođe je primećeno da su sva tri protokola koja su uključivala nanomaterijale, izrazito favorizovala neurogenu indukciju, dok je protokol bez nanomaterijala uticao i na pojavu pratećih, glijalnih ćelija, ako je suditi po ekspresiji glijalnog fibrilarnog proteina GFAP.

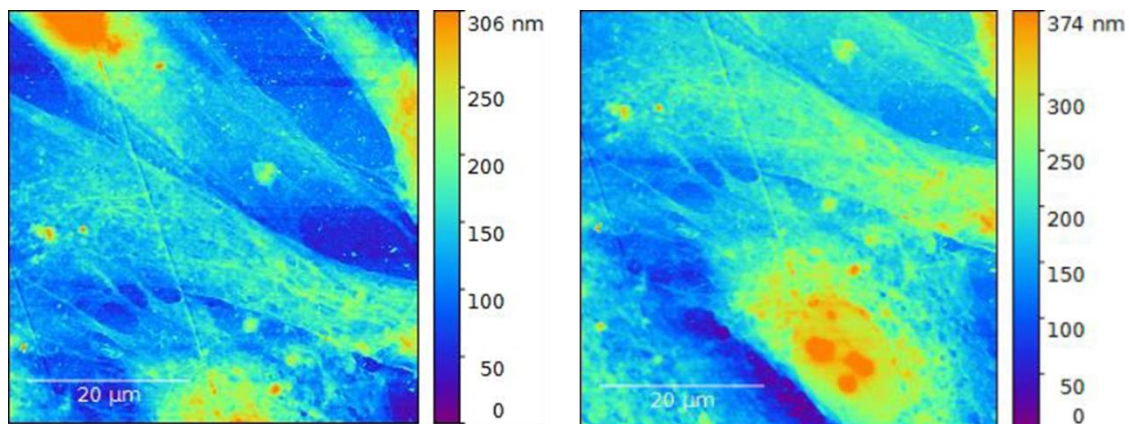


**Slika 34.** Ekspresija markera neurodiferencijacije nakon četiri protokola

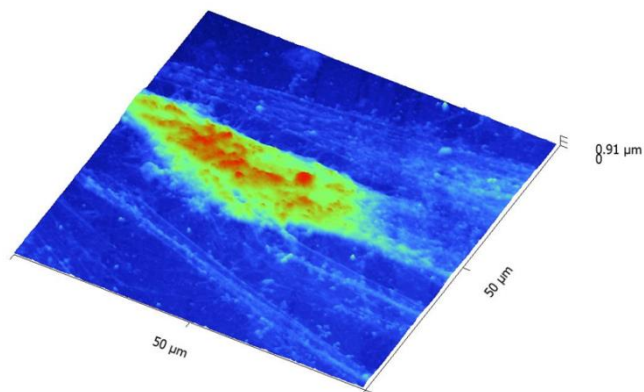
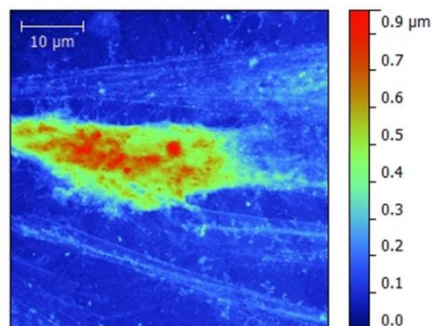
#### 4.6.7. Mikroskopija atomskih sila (AFM)

Uočena je očekivana razlika u morfologiji ćelija kontrolne grupe i ćelija gajenih u medijumu za neuroindukciju (Slika 35 i 36)

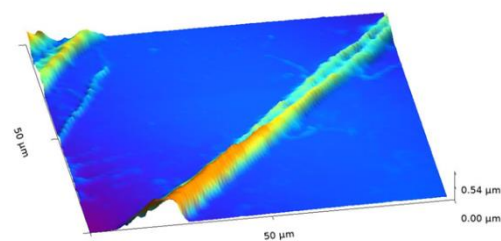
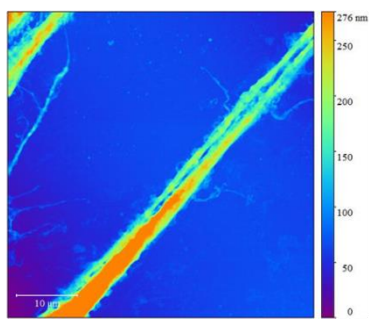
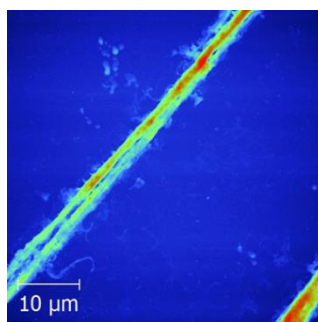
Takođe na slici su jasno vidjivi dugački tanki produžeci neuroindukovanih ćelija (Slika 37).



**Slika 35. Morfologija ćelija kontrolne grupe ( nediferencirane ćelije) , AFM**



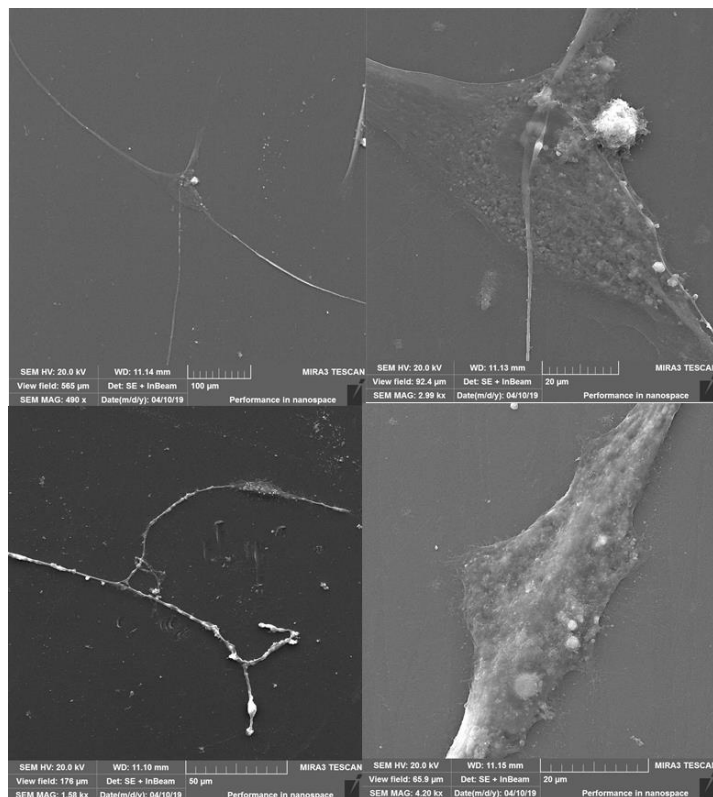
**Slika 36. Morfologija tela diferencirane ćelije, AFM**



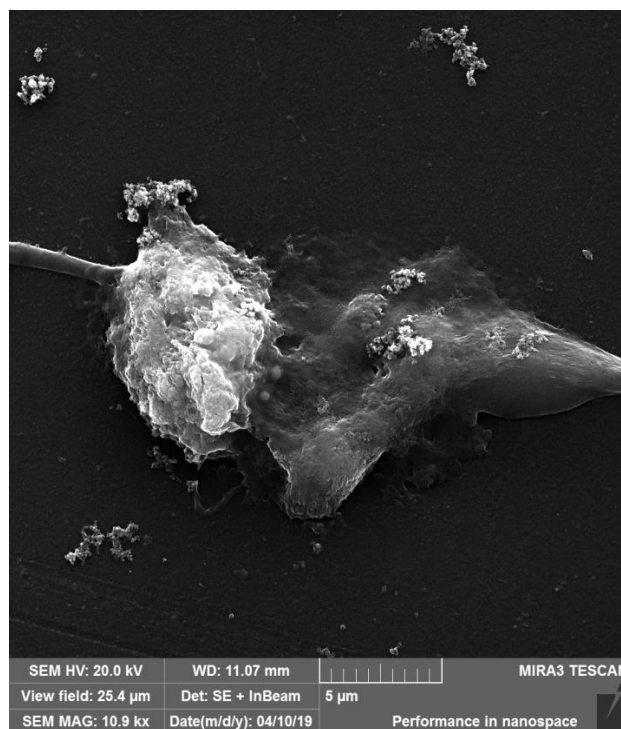
**Slika 37. Izgled citoplazmatskih produžetaka diferenciranih ćelija, AFM**

#### 4.6.8. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Ovom metodom uočena su trouglasta tela diferentovanih ćelija i jako dugački i tanki produžeci. Na i u ćelijama vidljivi su delovi grafenskog monosloja (Slika 38 i 39).



**Slika 38.** SEM diferentovanih SCAP; dugački produžeci i trouglasta tela ćelija

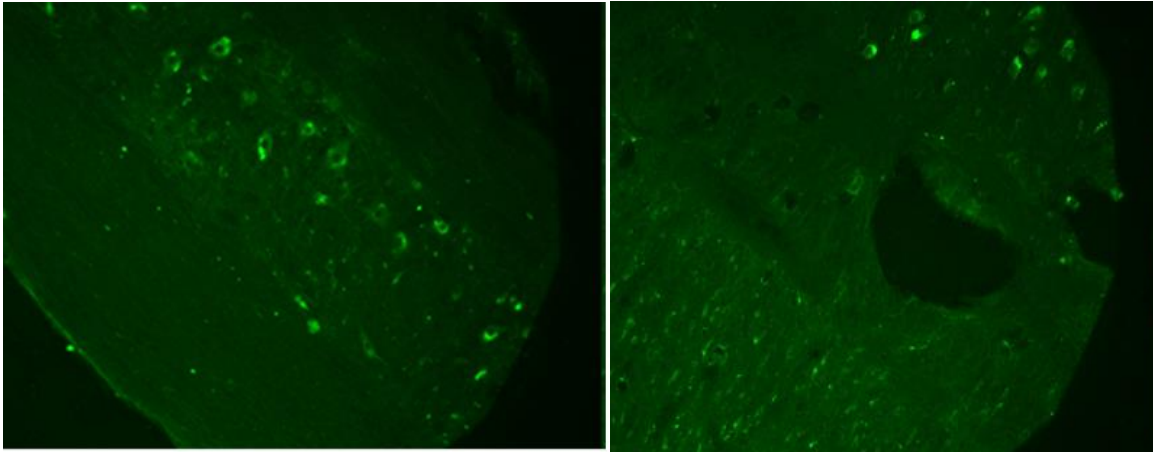


**Slika 39.** SEM: Međućelijski kontakt dve diferentovane ćelije



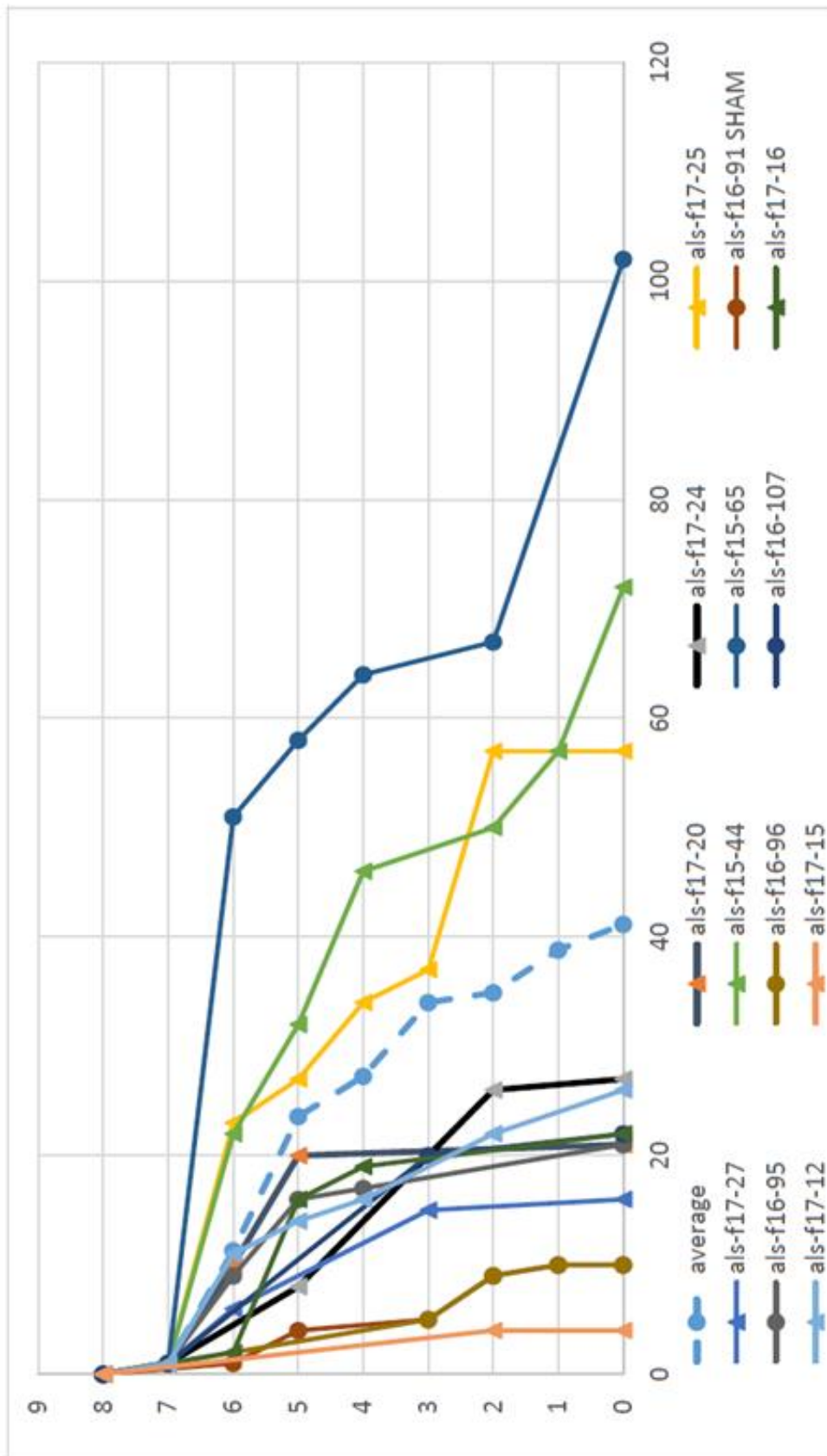
#### 4.7. *In vivo* neurogena diferencijacija

Za *in vivo* eksperimente korišćene su samo kulture SCAP, koje su se uslovno pokazale kao najpotentnije matične ćelije od tri ispitivana tipa ćelija u okviru ove doktorske disertacije. Na početku *in vivo* eksperimenata, jasno je pokazano pomoću fluorescentne mikroskopije da je intratekalna aplikacija humanim matičnih ćelija u eksperimentalne životinje bila uspešna. Potvrđeno je prisustvo adenovirusom obeleženih ćelija u prednjim rogovima kičmene moždine, 2 cm kaudalno i kranijalno, u odnosu na mesto uboda, odnosno transplantacije matičnih ćelija. Na slici 40 prikazana je jasna fluorescentna emisija tela humanih SCAP u kičmenoj moždini pacova.

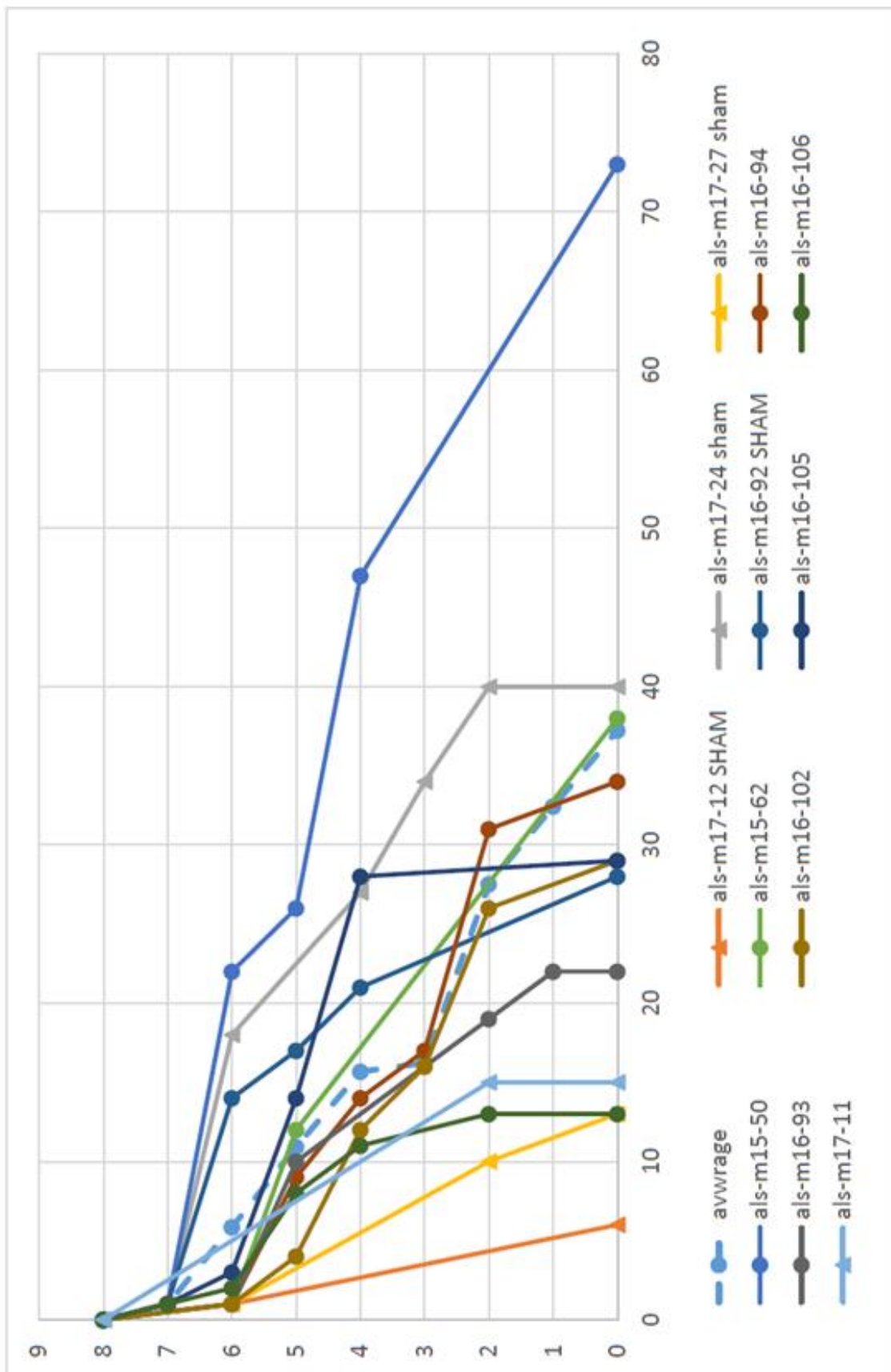


**Slika 40.** Fluorescentno obeležene matične ćelije naselile su prednje rogove kičmene moždine

Višemesečnim praćenjem tretiranih životinja, pokazano je da su pojedini pacovi nakon aplikovane terapije MĆ imali odložen početak bolesti, a nekoliko obolelih životinja je imalo životni vek statistički značajno produžen (slike 41 i 42).



**Slika 41.** Preživljavanje tretiranih životinja transplantiranim matičnim ćelijama iz apikalne papile



Slika 42. Preživljavanje tretiranih životinja transplantiranim matičnim ćelijama iz apikalne papile

## **5. DISKUSIJA**

## 5. DISKUSIJA

Tkivna regeneracija i imunomodulatorni efekat se smatraju najvećim prednostima terapije matičnim ćelijama. Regeneracija tkiva postiže se zamenom oštećenih struktura diferenciranim egzogenim MĆ ili *de novo* indukcijom regenerativnog kapaciteta endogenih MĆ sa remodelovanjem njihove niše. Pogodnosti upotrebe MĆ leže i u antiinflamatornom efektu koji doprinosi boljoj regeneraciji i zaceljivanju tkiva.

U fiziološkim uslovima i ranoj patogenezi oboljenja tkivne MĆ uspevaju da u najvećoj meri održavaju homeostazu. Međutim, u uznapredovaloj patogenezi potreban je po pravilu dodatni, egzogeni izvor MĆ kako bi došlo do regeneracije tkiva. Specifična adultna mezenhimalna tkiva, sve su interesantnija za potencijalnu primenu njihovih matičnih ćelija u regenerativnoj terapiji različitih oboljenja i stanja. DMĆ pokazale su izrazit afinitet za diferencijaciju ka osteogenoj, odontogenoj, dentinogenoj, cementogenoj, hondrogenoj, adipogenoj, miogenoj i neurogenoj lozi. Zbog lake izolacije i gajenja, zbog nepostojanja etičkih problema kao kod embrionalnih MĆ, kao i zbog manje opasnosti od neželjenih efekata upotrebe ove vrste terapije, matične ćelije dentalnih tkiva postaju sve interesantnije kao egzogeni izvor ćelija u regeneraciji kako dentalnih tako i tkiva istog ili sličnog razvojnog porekla.

U brojnim studijama pokazan je pozitivan uticaj kako prirodnih tako i novih sintetskih materijala, na poboljšanje karakteristika potentnosti i kapaciteta za diferencijaciju matičnih ćelija, uključujući i matične ćelije dentalnog porekla.

Za regenerativnu terapiju neurodegenerativnih stanja i povreda, izolovanje neuralnih adultnih matičnih ćelija predstavlja ogroman izazov, s obzirom na njihov vrlo mali broj i izrazito slabu dostupnost. Upravo je u tome značaj nalaženja alternativnih egzogenih izvora kompatibilnih matičnih ćelija koje bi se lako mogle diferencirati u nervnu lozu.

S obzirom na široku rasprostranjenost i laku dostupnost matičnih ćelija zubnih tkiva, a pogotovo imajući u vidu činjenicu da dentalna tkiva nastaju od ektomezenhima, odnosno vode poreklo od nervnog grebena, dentalne matične ćelije su sve više u žiži interesovanja istraživača kao potencijalni kandidati za neuroregenerativnu terapiju. Smatra se da matične ćelije poreklom od nervnog grebena poseduju karakteristike koje omogućavaju bržu i efikasniju neuro-diferencijaciju i oporavak nervnog tkiva u odnosu na neke druge matične ćelije.

Istraživanja su pokazala da intraspinalno ili intratekalno injektovane matične ćelije, nisu se zadržavale na mestu aplikacije već su imale sposobnost migracije i uspešno su kraniokaudalno naseljavale kičmenu moždinu, pa čak i mozak (Kim *et al.*, 2020)(Bakshi *et al.*, 2004; Lepore *et al.*, 2005). Povoljan efekat primene ovih ćelija nije samo u njihovoj diferencijaciji u lozu pogođenu degeneracijom, već i u izraženoj imunomodulatornoj aktivnosti, što sveukupno doprinosi regulisanju narušene tkivne homeostaze (Caplan and Correa, 2011; Kim *et al.*, 2012, 2015; Lee *et al.*, 2017; Lee, Na and Chang, 2018) Injektovane matične ćelije bivaju privučene inflamatornim faktorima i naseljavaju pogođene, oštećene zone. Pozitivan imunomodulatorni efekat uočen je i kod modela drugih oboljenja kao što su diabetes melitus, gde je od posebnog značaja u terapiji dijabetične polineuropatije (Omi *et al.*, 2016), infarkt miokarda (Armiñán *et al.*, 2009), autoimuna oboljenja (Pierdomenico *et al.*, 2005) i dr.

U literaturi su definisana dva osnovna protokola za izolaciju matičnih ćelija iz adultnih tkiva: enzimskom digestijom i metodom prerastanja (outgrowth method-OGM) (Bakopoulou *et al.*, 2011; Hilkens *et al.*, 2013). Enzimskom digestijom se uklanjaju delovi ekstracelularnog matriksa vezivnog tkiva, a izoluje se više ćelijskih vrsta, što dovodi do heterogenije primarne ćelijske kulture. Metoda prerastanja podrazumeva usitnjavanje tkiva na što manje delove koji omogućavaju izdvajanje i prerastanje ćelija iz datog tkiva. S obzirom da se na ovaj način favorizuje opstanak ćelija koje imaju afinitet za plastičnu podlogu i migraciju, a ostale ćelije se spiraju i dezintegrišu, u ovom istraživanju korišćena je OGM. Literaturni podaci ukazuju da se na ovaj način dobija homogenija populacija ćelija (Hilkens *et al.*, 2013).

Prema kriterijumima za karakterizaciju matičnih ćelija koji su definisani 2006. godine (Dominici *et al.*, 2006), sva tri tipa ćelija izolovanih iz dentalnih tkiva koja su bila predmet ove doktorske disertacije (apikalna papila, dentalni folikul i pulpa) pokazale su očekivana svojstva MČ, odnosno:

-sposobnost migracije, proliferacije, klonogeni potencijal i afinitet za plastičnu podlogu (tzv. adhezivnost za plastiku); ove karakteristike su se manifestovale tokom same kultivacije ćelija

-ekspimiranje karakterističnih membranskih mezenhimalnih markera matičnosti uz simultani izostanak ekspresije markera hematopoetskih matičnih ćelija, je dokazano metodom protočne citometrije i analizom genske ekspresije real-time PCR metodom. Dobijeni rezultati pokazali su da sva tri tipa ćelija ispoljavaju visoku ekspresiju mezenhimalnih markera CD73, CD 90 i CD105 i odsustvo ekspresije hematopoetskih markera CD34 i CD45

-mogućnost diferencijacije u najmanje tri ćelijske linije poreklom od mezoderma, što je u našim eksperimentima dokazano kroz uspešnu diferencijaciju sva tri tipa matičnih ćelija, odnosno ćelija pulpe (DPSC), folikula (DFSC) i apikalne papile (SCAP) u koštano, hrskavičavo i masno tkivo

Imajući u vidu važnost da se u regenerativnoj terapiji pronade što adekvatniji tip matičnih ćelija, koje bi se lako i uspešno mogle diferencijovati u željene zrele ćelije, pojavila se potreba za osetljivim i preciznim metodama koje bi bile u stanju da utvrde eventualno postojanje finih razlike između matičnih ćelija u pogledu njihove potentnosti.

Dentalne matične ćelije koje su odabrane za ovu studiju, u prethodnim istraživanjima su bile analizirane i upoređivane u smislu njihovih sposobnosti diferencijacije, ekspresije površinskih i drugih markera, brzini proliferacije, primenjivosti u regenerativnim postupcima, i drugih karakteristika. Međutim još uvek nema konačnih zaključaka o tome koji tip ćelije poseduje optimalna svojstva koja ga kvalifikuju za određenu terapeutsku aplikaciju.

Matične ćelije zubnih tkiva, iako istog porekla, pored velike i očekivane sličnosti, međusobno pokazuju i razlike koje se pre svega odnose na sposobnost diferencijacije, kao i stepena zrelosti. Po određenim literaturnim podacima SCAP se smatraju najnezrelijim ćelijama/tkivom, pa samim tim i ćelijama sa najvećim potencijalom za diferencijaciju.

U ovoj studiji protočna citometrija je nedvosmisleno potvrdila da ćelije izolovane iz tkiva papile, dentalnog folikula i pulpe poseduju karakteristike mezenhimalnih MĆ. Naime u sve tri kulture (SCAP, DFSC i DPSC) zastupljenost ćelija koje eksprimiraju mezenhimalne markere CD73, CD90 i CD105 se kretala između 97% i 99%. Istovremeno je pokazano da u kulturama nisu prisutne matične ćelije hematopoeze, s obzirom da su markeri hematopoeznih ćelija nađeni u svega 0,1% do 0,3%. Rezultati dobijeni protočnom citometrijom potvrđeni su i analizom genske ekspresije na nivou iRNK primenom kvantitativnog PCR-a (analizirani su CD73 i CD90 od mezenhimalnih markera i CD45 od hematopoeznih). Dobijeni podaci bili su u potpunoj saglasnosti sa osnovnom definicijom (karakteristikom) mezenhimalnih matičnih ćelija (Horwitz *et al.*, 2005; Dominici *et al.*, 2006).

Međutim, ni protočna citometrija ni kvantitativna PCR analiza nisu omogućile uočavanje razlike u ekspresiji ispitivanih mezenhimalnih markera između tri tipa matičnih ćelija, što je bio jedan od ciljeva ove disertacije. Ovaj podatak svakako ukazuje na veliku sličnost između tri tipa ispitivanih ćelija, ali verovatno ukazuje i na nedovoljnu osetljivost primenjene metode da uoči najfinije molekularne razlike između ćelija apikalne papile, folikula i pulpe. Drugim rečima, ispostavilo se da protočna citometrija i kvantitativni PCR nisu najpodesniji pristup za određivanje stepena matičnosti ispitivanih ćelija, uz ogradu da je broj analiziranih markera ipak bio ograničen i da bi upotrebom nekih drugih, možda i bila uočena razlika između SCAP, DFSC i DPSC. Treba naglasiti da su u literaturi ipak opisane razlike u ekspresiji površinskih markera između različitih DMĆ, ali bez jasnog povezivanja sa njihovim karakteristikama, u smislu matičnosti (Huang, Gronthos and Shi, 2009).

Sposobnost ćelija apikalne papile, dentalnog folikula i pulpe da se u *in vitro* uslovima diferenciraju u ćelije koštanog, hrskavičavog i masnog tkiva je takođe jedna od uobičajenih metoda za utvrđivanje njihove matičnosti. U ovoj studiji sva tri tipa ćelija su pokazala izrazit potencijal diferencijacije u sve tri pomenute loze, čime je dodatno potvrđena njihova matičnost. Sposobnost diferencijacije dentalnih matičnih ćelija u tri loze pokazana je specifičnim bojenjem produkata karakterističnih za osteo, hondro i adipo-indukciju, kao i preko genske ekspresije odgovarajućih markera (RunX – markera koštanog tkiva, Col2 – markera hrskavičavog tkiva i PPAR $\gamma$  – markera masnog tkiva). Međutim ni ovaj pristup nije dao željeni rezultat u smislu otkrivanja razlika u potentnosti SCAP, DFSC i DPSC, tj. nije utvrđeno da određena ćelija ima manji (ili veći) potencijal diferencijacije u poređenju sa ostalima. Ipak, postoje studije u kojima je ustanovljeno da neke od ćelija pokazuju izraženiji kapacitet za diferencijaciju u određenu lozu, od drugih. Tako su npr. Son i saradnici ustanovili da DPSC imaju veći potencijal osteo/odontogene diferencijacije od SCAP i DFSC (Son *et al.*, 2021), dok su Petrescu i saradnici ustanovili da u standardnim uslovima kultivacije DFSC pokazuju najizraženiji potencijal osteogene diferencijacije (Petrescu *et al.*, 2020). Potpuno suprotno tome, u studiji Qu i saradnika, DFSC su pokazale najniži potencijal osteogene diferencijacije kada su poređene sa više drugih tipova mezenhimalnih matičnih ćelija (Qu *et al.*, 2021). Sve ovo govori o velikoj šarolikost rezultata i još uvek prisutnim nejasnoćama u pogledu potentnosti različitih dentalnih matičnih ćelija. Podataka o komparativnoj analizi potencijala hondrogene i adipogene diferencijacije SCAP, DFSC i DPSC, odnosno o kvantifikaciji tog potencijala, praktično i nema.

Sva tri ispitana tipa ćelija imala su visoki klonogeni potencijal i pokazala su visok kapacitet proliferacije, sudeći po CFU testu urađenom nakon 7, 10 i 14 dana, ali bez statistički značajne razlike između njih. Početna brzina proliferacije bila je niža kod SCAP nego kod ostala dva tipa ćelija, ali je potom, između 7.og i 14.og dana, kod SCAP nastupio najveći skok u brojnosti populacije i to je u saglasnosti sa podacima Sonoyama i sar. koji su pokazali da se ove ćelije u odnosu na ostale razlikuju pre svega po brzini proliferacije i dupliranja ćelijske populacije (Sonoyama *et al.*, 2006).

U našoj studiji je pokazano da se relativna dužina telomera (RDT), kao važan genetički parametar ćelijskog starenja, održava tokom dužeg perioda kultivacije ćelija, odnosno kroz veći broj pasaža, što je ne samo još jedan podatak u korist matičnosti ispitivanih ćelija, već govori i o stabilnom održavanju ovog stanja matičnosti u vremenu. Iako je nakon desete pasaže došlo do izvesnog skraćanja telomera, ono ipak nije bilo statistički značajno u poređenju sa ranijim pasažama. Ovi se rezultati unekoliko razlikuju od rezultata Pilbauerove i saradnika koji su konstatovali da u DPSC tokom pasaža dolazi do atricije (skraćanja) telomera, dok u slučaju kultivacije ćelija bez pasažiranja, nakon dve nedelje dolazi do produžetka telomera (Pilbauerova *et al.*, 2021). U našim eksperimentima RDT bila je nešto veća kod SCAP u odnosu na druga dva tipa ćelija, mada bez statističke razlike. Iako je izostala statistička značajnosti, ovaj rezultat podržava nalaze Jeon-a i saradnika koji su u SCAP pronašli viši nivo telomerazne aktivnosti, enzima zaduženog za održavanje dužine telomera, nego u ćelijama folikula i pulpe, što SCAP teorijski čini „najmlađim“ ćelijama. Stoga autori pomenutog rada zaključuju da su SCAP veoma pogodan izvor matičnih ćelija u regenerativnoj medicini (Jeon *et al.*, 2011).

Kao što je već istaknuto, protočna citometrija, kvantitativni PCR i sposobnost diferencijacije SCAP, DFSC i DPSC u adipogenu, hondrogenu i osteogenu lozu, su ključni pristupi u utvrđivanju ćelijske matičnosti, ali nisu bile metode kojima je mogla da bude izvedena jasna diskriminacija između manje i više potentnih dentalnih matičnih ćelija.

Test proliferacije delimično je upućivao na to da SCAP možda ima superiorniju proliferativnost u odnosu na preostala dva tipa ćelija. Slično tome, i analiza relativne dužine telomera je donekle ukazivala na veću matičnost SCAP u poređenju sa ćelijama folikula i pulpe. Međutim ove karakteristike veće matičnosti SCAP bile su samo u naznakama i neophodno ih je bilo potvrditi adekvatnijim, osetljivijim metodama.

Ramanska spektromikroskopija (RS) predstavlja izuzetno senzitivnu metodu kojom je moguće veoma precizno odrediti intracelularni, biohemijski sastav upotrebom lasera. U literaturi je opisan značaj ramanske spektrofotometrije u dijagnostici oboljenja, proceni zrelosti odnosno diferentovanosti matičnih ćelija, u određivanju stepena mineralizacije čvrstih tkiva i dr. Na primer, ramanska spektromikroskopija je prethodno primenjena u diskriminaciji mezenhimalnih matičnih ćelija od embrionalnih matičnih ćelija na osnovu količine unutarćelijskih lipida (Pijanka *et al.*, 2010). Pomoću RS su takođe identifikovane različite faze diferencijacije matičnih ćelija miša i humanog embriona (Notingher *et al.*, 2004; Heraud *et al.*, 2010; Pijanka *et al.*, 2010), a korišćena je i u postupku terapijske transplantacije ćelija, da bi se razlikovale normalne od abnormalnih ćelija u *ex vivo* kulturama (Harkness *et al.*, 2012). Stoga se činilo da bi RS mogla da bude metoda izbora u diskriminaciji SCAP, DPSC i DFSC. S obzirom na složenost analize, nije bilo moguće uraditi je na svim pacijentima već je izvedena na svega tri. I zaista, diskretne razlike između tri ispitivane vrste matičnih ćelija najbolje smo uočili upravo metodom ramanske spektromikroskopije. Inače, intracelularni lipidi, glikogen i odnos između količine proteina i RNK smatraju se dobrim pokazateljima stepena diferentovanosti matičnih ćelija.

Glikogen je izuzetno važan intracelularni sastojak MĆ, a njegova količina je direktno povezana sa kapacitetom za diferencijaciju i sa matičnošću ćelija. Sva tri pika karakteristična za glikogen (470, 841 i 927  $\text{cm}^{-1}$ ) su uočena u ispitivanim ćelijama; pokazana je i visoka koncentracija ove komponente u sve tri vrste posmatranih ćelija. Kod prvog pacijenta su bile najizraženije razlike u koncentraciji glikogena između tri vrste matičnih ćelija, što se posebno ogledalo u piku 470  $\text{cm}^{-1}$  koji je ubedljivo najviši bio kod SCAP, a najniži kod DFSC. Iako nije do kraja razjašnjena uloga povećanog sadržaja glikogena u matičnim ćelijama, ipak je ustanovljeno da je glikogen važan za samoobnavljanje, preživljavanje, proliferaciju, brzinu rasta kao i diferencijaciju ćelija. Visoke koncentracije ove ćelijske komponente uočene su kod indukovanih pluripotentih matičnih ćelija i kod embrionalnih matičnih ćelija (Konorov *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2015). Lipidi su isto tako izuzetno važan intracelularni sastojak za određivanje matičnosti (Heraud *et al.*, 2010; Folmes, Park



and Terzic, 2013). Uočeno je da je sadržaj lipida direktno povezan sa stepenom diferencijacije; preciznije, tokom sazrevanja ćelija dolazi do opadanja nivoa lipida. Sva tri tipa ispitivanih ćelija su pokazivala jasne pikove povezane sa lipidima, ali SCAP, pre svega ćelije izolovane iz trećih molara prvog pacijenta, su se posebno isticale u tom pogledu i imale ubedljivo najizraženije pikove povezane sa koncentracijom lipida ( $1662\text{ cm}^{-1}$  i  $721\text{ cm}^{-1}$ ) u odnosu na ostala dva tipa MĆ.

Količina nukleinskih kiselina smatra se takođe direktno proporcionalnom kapacitetu diferencijacije (Cai, Weiss and Rao, 2004; Kelly and Gatie, 2017). Drugim rečima, to znači da u toku sazrevanja, dolazi do smanjenja njihove koncentracije, isto kao što je slučaj sa lipidima. A nivoi proteina, predstavljeni aminokiselinom triptofan ( $993\text{ cm}^{-1}$ ), tokom diferencijacije se povećavaju, odnosno, što je ćelija zrelija biće veća koncentracija proteina u njoj. U literaturi je posebno naznačena važnost odnosa između triptofana i nukleinskih kiselina, kao pokazatelja ćelijske matičnosti (Pijanka *et al.*, 2010; Ji *et al.*, 2015). Odnos pikova ova dva elementa (proteini/RNK) je nazvan indikatorom matičnosti (R4 indikator, odnos pikova triptofana i nukleinskih kiselina,  $748$  naspram  $770\text{ cm}^{-1}$ ). U ovoj studiji dobijeni rezultati su ukazali da je R4 indikator najveći kod DPSC, nešto je niži kod DFSC, a najmanji je kod SCAP, što upućuje na činjenicu da je kapacitet za diferencijaciju najveći kod SCAP, a najmanji kod DPSC.

Rezultati Ramanske spektromikroskopije ukazali su da se ćelije izolovane iz zubnih tkiva prvog pacijenta najviše razlikuju međusobno. U odnosu na uočene razlike pikova glikogena, lipida i R4 markera, moglo bi se zaključiti da su kod prvog pacijenta najnezrelije, a samim tim i najpotentnije matične ćelije izolovane iz apikalne papile, što bi išlo u prilog rezultatima iz literature i ekspresiji markera pluripotentnosti CD24 i STRO-1 (Sonoyama *et al.*, 2006). Kod druga dva pacijenta razlike između tri tipa matičnih ćelija su bile nešto manje izražene što bi možda moglo da se objasni različitim starošću pacijenata, odnosno stadijumom razvića i stepena zrelosti njihovih zubnih tkiva. Ipak, R4 indikator je nakon statističke obrade podataka, ukazao na SCAP kao najnediferentovanije ćelije (Simonović *et al.*, 2019).

Matične ćelije zubnih tkiva kao što je već više puta naglašeno, eksprimiraju veliki broj mezenhimalnih markera, a uz njih naravno i markere pluripotentnosti Nanog, Sox2, Oct3/4. Zanimljivo je da dentalne matične ćelije eksprimiraju i markere nervnih ćelija beta 3 tubulin, Nestin, neurofilament, MAP2, bez prethodne indukcije ili stimulacije. Takođe sekretuju neke neurotrofične i neuroprotektivne faktore koji potpomažu neurogenezu, gliogenezu i regeneraciju. Stoga ove ćelije zaista predstavljaju obećavajući materijal, odnosno dobru polaznu osnovu za njihovo dalje potpomognuto usmeravanje ka zrelijim formama neurona.

U literaturi je opisan veliki broj različitih protokola za neurodiferencijaciju, varijabilne efikasnosti i pouzdanosti (El-Bialy *et al.*, 2014; Hong *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2016; Azmitia and Capetian, 2018). Uspešnost potupaka neuroindukcije u velikoj je meri zavisila od korišćenih izvora matičnih/pluripotentnih ćelija i od vrste nervne ćelije koja se finalno želi dobiti u postupku diferencijacije.

U ovom radu usmeravanje matičnih ćelija apikalne papile, dentalnog folikula i pulpe u neurogenu lozu, uz pomoć odgovarajućeg medijuma za neurodiferencijaciju, pokazalo je jasnu promenu ćelijske morfologije tokom trajanja eksperimenta. Nakon nedelju dana kultivacije, MĆ su poprimitile oblik neuronima sličnih ćelija (neuron-like cells), odnosno nezrelih neurona. Ćelije su imale trouglasta tela i dugačke, gracilne produžetke, kojima su se umrežavale. U pogledu morfologije, ćelije poreklom od sva tri ispitivana zubna tkiva izgledale su slično nakon neuroindukcije, uz ogradu da je za tu morfološku analizu korišćena isključivo svetlosna mikroskopija, odnosno invertni mikroskop. Međutim, analiza genske ekspresije nekoliko ključnih neuralnih markera nedvosmisleno je pokazala da su ćelije apikalne papile te koje ispoljavaju najizraženije karakteristike nezrelih neurona. Izuzetno je malo podataka u naučnoj literaturi na temu

neuroindukcije SCAP, ali upravo su nedavno do rezultata sličnih našima u pogledu ekspresije MAP2, NF-M i NeuN u ćelijama apikalne papile došli i Chen i saradnici (Chen *et al.*, 2021).

Stoga su SCAP selektovane za dalje ispitivanje neuroindukcije korišćenjem originalne modifikacije nekih od postojećih protokola, a glavna inovativnost ove disertacije je ležala u primeni kombinacije dve vrste nanomaterijala nove generacije, grafena i karbonskih nanotubica.

Nanomaterijali su sve interesantniji u regenerativnoj terapiji kako zbog njihovih karakteristika koje podsećaju na karakteristike ekstraćelijskog matriksa, tako i zbog njihovog stimulativnog dejstva na ćelije u smislu diferencijacije. Stalni je porast broja nosača koji se ispituju u tkivnom inženjeringu, a pre svega na polju neuroregeneracije. Posebno upečatljiv doprinos u najnovijoj naučnoj literaturi dali su ugljenični nanomaterijali (Wang *et al.*, 2012; Simonovic *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2021; Madanagopal *et al.*, 2021)

Ugljenične nanocevi ili ugljenične nanotube (engl. CNT - Carbon nanotubes) su alotropska modifikacija ugljenika u obliku cilindrične nanostrukture. Građene su od grafenske ravni u obliku pravilne heksagonalne mreže uvijene u bešavni cilindar (Sinnott and Andrews, 2001). Nanocevi svojim impresivnim fizičkim, hemijskim, ali i biološkim svojstvima privukle su pažnju velikog broja istraživača, pa su njihovi pozitivni efekti opisani u mnogim interdisciplinarnim studijama. Ugljenične nanotube sa jednim zidom (SWCNTs – Single Wall Carbon Nano Tubes) su u literaturi predstavljene kao obećavajući nanomaterijal kako zbog svojih fizičkih karakteristika u smislu provodljivosti impulsa, imitacije ECM nervnog tkiva, tako i zbog svoje biokompatibilnosti. Studije su pokazale da se ćelijske kulture mogu zasejati na sloju SWCNT ili se SWCNT mogu dodati u formi vodenog rastvora u ćelijsku kulturu. Primećen je pozitivan efekat ovakvog tretmana na rast aksonskih nastavaka (Koppes *et al.*, 2016) i šire, na rast i diferencijaciju neurona i rekonstrukciju nervnih mreža (Fabbro, Prato and Ballerini, 2013).

Grafenski nanomaterijali su ugljenični kristalni alotropi dvodimenzionalne strukture i prema podacima iz literature pokazali su se kao superiorni nanomaterijal za neurodiferencijaciju i neuroregeneraciju zahvaljujući njihovoj jedinstvenoj strukturi, hemijskoj stabilnosti, izvanrednim mehaničkim karakteristikama, baktericidnom potencijalu i biokompatibilnosti (Zhang, Zhang and Yin, 2019). Ovaj jednoatomski sloj ugljenika pokazuje sposobnost apsorpcije faktora rasta i mogućnost elektroprovodljivosti, što je od posebnog interesa u neurodegenerativnim studijama. Pokazano je da povećavaju adheziju ćelija i promovišu njihovu diferencijaciju u glijalne i neuronske ćelijske loze (Convertino *et al.*, 2020; Domínguez-Bajo *et al.*, 2020). Pored najispitivanijeg grafenskog nanomaterijala, grafen oksida, postoje i drugi oblici grafena koji su biokompatibilni i netoksični, ali njihovi pozitivni efekti u smislu neuroregeneracije i neurodiferencijacije nisu još uvek dovoljno ispitani. To je slučaj i sa grafenskom disperzijom koja je bila predmet istraživanja ove doktorske disertacije (GD- graphene dispersion).

Uprkos sličnostima, SWCNTs i GD imaju različit efekat na ćelije (Hong *et al.*, 2014). Prema dostupnoj literaturi, matične ćelije podvrgnute neurodiferencijaciji na podlogama presvučenim grafenom pokazivale su izraženiju neuronsku morfologiju i eksprimirale više nivoa neuralnih markera (MAP2, Sinapsin, beta t, th, Nestin, GFAP), dok su SWCNT manje-više ujednačeno potpomagale diferencijaciju matičnih ćelija i u pravcu glija ćelija i u pravcu neurona (Solanki *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015).

U ovom radu korišćene su karbonske nanotube sa jednim zidom (Single Wall Carbon Nano Tubes) u vodenom rastvoru (water soluble-ws) koje se označavaju kao wsSWCNTs, i grafenska disperzija, pojedinačno i u kombinaciji, zajedno sa standardnim medijumom za neurodiferencijaciju. Ovo je prv put da se ispituje uticaj grafenske disperzije na diferencijaciju matičnih ćelija, bilo dentalnih bilo drugih MČ.

U eksperimentu u kom su ćelije bile izložene samo medijumu za neurodiferencijaciju, postignuta je željena neuronska morfologija, odnosno ćelije su razvile duge i tanke produžetke, preko kojih su ostvarivale međusobni kontakt. Imunocitohemijom dokazana je ekspresija neuralnih i nešto manje, glijalnih markera. Real time PCR metodom pokazana je višestruka razlika u ekspresiji neuralnih markera pre i nakon diferencijacije. Ovim je dokazana njihova potentnost ka neurodiferencijaciji koja je u skladu sa navedenim rezultatima u literaturi.

Pokazano je takođe i da grafenska disperzija može imati stimulatívne efekte na SCAP u smislu neurodiferencijacije. Naime, ćelije kultivisane u medijumu za neurodiferencijaciju u prisustvu grafenske suspenzije, u poređenju sa drugim protokolima, pokazale su visok nivo beta III-tubulina, proteina neuronskih mikrotubula koji je posebno ispoljen tokom neurogeneze i koji se smatra odgovornim za rast aksona. Nivo MAP2, citoskeletnog elementa bitnog za povezivanje i stabilizaciju neuronskih mikrotubula koji ima ključne implikacije u razviću neurona, takođe je bio viši kod ćelija uzgajanih sa grafenskom disperzijom nego kod ćelija uzgajanih prema druga dva protokola sa nano materijalima. Nivo ngn-2, inhibitora transkripcionog faktora rasta glijalnih ćelija, bio je nizak, a opet gliogeneza izgledala je potisnuta, sudeći i prema nedostatku ekspresije GFAP-a, glijalnog markera, što se može pripisati efektima grafenske disperzije. U literaturi ne postoje podaci o delovanju grafenske disperzije na neurogenezu matičnih ćelija, ali naši su rezultati su na liniji rezultata dobijenih primenom grafen oksida (GO). Naime, u prisustvu GO, embrionalne matične ćelije miša su se vrlo uspešno diferencirale u dopaminergične neurone, do čega nije dolazilo u prisustvu karbonskih tuba ili običnog grafena (Yang *et al.*, 2014).

Matične ćelije uzgajane sa SWCNT pokazale su bolju neuralnu diferencijaciju u poređenju sa ćelijama uzgajanim bez dodavanja nanomaterijala, rezultat koji je u skladu sa prethodno navedenim podacima iz literature. Das i saradnici su pokazali pozitivne efekte primene SWCNT na ubrzavanje hondrogeneze i neurogeneze psećih mezenhimalnih matičnih ćelija (Das *et al.*, 2017). Nivoi ngn-2, beta III-tubulina i NF-M, neuronskog citoskeletnog elementa koji su prisutni u visokoj koncentraciji u aksonima, bili su viši u ćelijama uzgajanim sa SWCNT nego u osnovnom neuroinduktivnom medijumu.

Kombinacija dva nanomaterijala rezultirala je naizgled najbolje usaglašenim odnosom NF-M i beta III-tubulina, koji je dodatno bio praćen izraženom ekspresijom NeuN. Ovaj tretman je za posledicu imao pojavu najubedljivije morfologije ćelija sa krupnim trouglastim telima neurona i dugim procesusima.

Naša *in vivo* pilot studija na ograničenom broju eksperimentalnih životinja koje se koriste kao model za izučavanje amiotrofne lateralne skleroze (SOD-superoksid dizmutaza- mutantni pacovi), pokazala je da je transplantacija humanih matičnih ćelija apsolutno izvodljiva. Ćelije su bile u stanju da migriraju duž kičmene moždine kaudalno i rostralno u odnosu na mesto uboda. Ovo je jasno pokazano na prvim, probno injektovanim životinjama koje su nakon nekoliko dana žrtvovane da bi se proverila uspešnost tehnike intratekalnog ubacivanja ćelije. Da bi se sa sigurnošću znalo da su humane matične ćelije dospale u kičmenu moždinu pacova, one su prethodno obeležene fluorescentnom bojom. Na histološkim preparatima sukcesivnih preseka kičmene moždine pacova jasno su bile uočljive zeleno obojene humane ćelije. Humane matične ćelije (SCAP) nisu izazvale neuroinflamaciju i nije došlo do njihovog odbacivanja. S druge strane, pokazano je i izvesno odlaganje početka simptoma ALS-a, kod životinja koje su tretirane na ovaj način, praćeno usporenijim tokom i dužim trajanjem bolesti, odnosno blagim produžetkom života. Zanimljiva je činjenica da su ćelije u većoj meri naseljavale prednje robove kičmene moždine, koja upravo odgovara zoni degeneracije motornih neurona u ALS-u. U ovom eksperimentu cilj je bio da se ispita preživljavanje ALS pacova transplantiranih sa SCAP, pa su tako životinje ostavljene da im se bolest odvija svojim tokom koji je mogao da potraje i preko dva meseca. Nakon tog perioda, nije više bilo moguće prepoznati humane ćelije u moždinskom tkivu pacova, s obzirom da je fluorescentna boja kojom su ćelije bile obeležene u momentu ubrizgavanja, tokom tih šezdesetak

---

dana koliko je trajao eksperiment potpuno izbledela. Stoga, moguće su samo pretpostavke o sudbini ubrizganih ćelija apikalne papile u okruženju nervnog tkiva pacova. U *in vitro* uslovima pokazale su sposobnost diferencijacije u pravcu neurogene loze, i u manjoj meri u pravcu neuroglije. Ne treba gubiti iz vida da je uloga glija ćelija izuzetno kompleksna, i izuzetno bitna za održanje homeostaze nervnog sistema, tako da i eventualna diferencijacija SCAP u pravcu glije može da ima pozitivne efekte na preživljavanje ALS životinja (Serio and Patani, 2018; Xing *et al.*, 2018).

Jasna predispozicija ćelija apikalne papile da se diferenciraju prema neuronskim lozama, kao i neuroinduktivna svojstva grafenske disperzije i karbonskih nanotuba, trebalo bi da pokrenu dalja istraživanja dentalnih matičnih ćelija, s ciljem pronalaženja najboljeg rešenja za autolognu neuroregenerativnu terapiju.

## **6. ZAKLJUČCI**

## 6. ZAKLJUČCI

### A. Karakterizacija MĆ

1. Matične ćelije se uspešno i lako mogu izolovati iz tkiva zubne pulpe, folikula i apikalne papile trećeg molara sa nezavršenim rastom korena
2. Dentalne matične ćelije izolovane iz pulpe, folikula i apikalne papile (DPSC, DFSC i SCAP) eksprimiraju visok nivo mezenhimalnih markera i zanemarljiv nivo hematopoetskih markera, što je pokazano protočnom citometrijom i analizom genske ekspresije. Time je jasno potvrđena mezenhimalna priroda ovih ćelija.
3. Sva tri tipa ćelija su pokazala visok klonogeni potencijal i brzu proliferaciju u *in vitro* uslovima.
4. DPSC, DFSC i SCAP se uspešno diferenciraju u osteogenu, hondrogenu i adipogenu lozu što je dokazano primenom svetlosne i elektronske mikroskopije, kao i analizom genske ekspresije specifičnih markera.
5. Ramanskom spektromikroskopijom pokazana je velika sličnost između tri vrste DMĆ, ali je ova metoda ukazala i na suptilne razlike koje među njima postoje. Uz pomoć važnog indikatora matičnosti, tzv. R4 indikatora (odnos pikova triptofana i pikova DNK) ustanovljen je različit stepen zrelosti tri tipa ćelija (SCAP<DFSC<DPSC), odnosno ćelije izolovane iz apikalne papile bile su najnezrelije, što je upućivalo na njihovu najveću moć diferencijacije.

### B. Neuroindukcija MĆ

6. Na osnovu analize markera neurogene diferencijacije ustanovljeno je da sva tri tipa DMĆ pokazuju sposobnost neurodiferencijacije, ali da je ona najizraženija kod SCAP. Matične ćelije apikalne papile uspešno su diferencirane u “neuronima slične ćelije” (neuron-like cells) i eksprimiraju neuronalne markere beta III tubulin, MAP2, ngn2, NF-M i NeuN.
7. Upotrebom karbonskih nanomaterijala (nanocevi i grafenske disperzije) moguće je pospešiti neurodiferencijaciju. Neurodiferencijacijom u prisustvu ova dva nanomaterijala dobijene su visoke vrednosti ekspresije markera neurogene loze (beta III tubulina, NF-M, MAP2 i ngn2) uz niske vrednosti ekspresije glijalnog markera GFAP.
8. Nakon intratekalne transplantacije humanih matičnih ćelija poreklom iz apikalne papile u životinje sa amiotrofičnom lateralnom sklerozom, matične ćelije pokazale su sposobnost migracije, pošto su naselile prednje rogove kičmene moždine životinja kranio-kaudalno od mesta uboda i dovele do blagog produžetka života tretiranih ALS pacova.

## **7. LITERATURA**

## 7.LITERATURA

- Abe, S., Yamaguchi, S. and Amagasa, T. (2007) 'Multilineage Cells from Apical Pulp of Human Tooth with Immature Apex', *Oral Science International*. doi: 10.1016/s1348-8643(07)80011-5.
- Aimetti, M. *et al.* (2018) 'Regenerative Treatment of Periodontal Intrabony Defects Using Autologous Dental Pulp Stem Cells: A 1-Year Follow-Up Case Series', *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*. doi: 10.11607/prd.3425.
- Akintoye, S. O. *et al.* (2006) 'Skeletal site-specific characterization of orofacial and iliac crest human bone marrow stromal cells in same individuals', *Bone*. doi: 10.1016/j.bone.2005.10.027.
- Apel, C. *et al.* (2009) 'The neuroprotective effect of dental pulp cells in models of Alzheimer's and Parkinson's disease', *Journal of Neural Transmission*. doi: 10.1007/s00702-008-0135-3.
- Armiñán, A. *et al.* (2009) 'Cardiac differentiation is driven by nkx2.5 and gata4 nuclear translocation in tissue-specific mesenchymal stem cells', *Stem Cells and Development*. doi: 10.1089/scd.2008.0292.
- Arthur, A. *et al.* (2008) 'Adult Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate Toward Functionally Active Neurons Under Appropriate Environmental Cues', *Stem Cells*. doi: 10.1634/stemcells.2007-0979.
- Azmitia, L. and Capetian, P. (2018) 'Single-step plasmid based reprogramming of human dermal fibroblasts to induced neural stem cells', in *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., pp. 31–41. doi: 10.1007/978-1-4939-8697-2\_2.
- Bakopoulou, A. *et al.* (2011) 'Assessment of the impact of two different isolation methods on the osteo/odontogenic differentiation potential of human dental stem cells derived from deciduous teeth', *Calcified Tissue International*. doi: 10.1007/s00223-010-9438-0.
- Bakshi, A. *et al.* (2004) 'Minimally invasive delivery of stem cells for spinal cord injury: advantages of the lumbar puncture technique.', *Journal of neurosurgery. Spine*, 1(3), pp. 330–337. doi: 10.3171/spi.2004.1.3.0330.
- Behnia, A. (2014) 'Transplantation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth for bone regeneration in the dog mandibular defect', *World Journal of Stem Cells*, 6(4), p. 505. doi: 10.4252/wjsc.v6.i4.505.
- Borstlap, W. A. *et al.* (1990) 'Early secondary bone grafting of alveolar cleft defects. A comparison between chin and rib grafts', *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. doi: 10.1016/S1010-5182(05)80411-1.
- Cai, J., Weiss, M. L. and Rao, M. S. (2004) 'In search of "stemness"', *Experimental Hematology. Exp Hematol*, pp. 585–598. doi: 10.1016/j.exphem.2004.03.013.
- Caplan, A. I. (1991) 'Mesenchymal stem cells', *Journal of Orthopaedic Research*. doi: 10.1002/jor.1100090504.
- Caplan, A. I. and Correa, D. (2011) 'The MSC: An injury drugstore', *Cell Stem Cell*. Cell Press, pp. 11–15. doi: 10.1016/j.stem.2011.06.008.
- Carpenter, M. K., Rosler, E. and Rao, M. S. (2003) 'Characterization and differentiation of human embryonic stem cells', *Cloning and Stem Cells*. doi: 10.1089/153623003321512193.



- Chai, Y. *et al.* (2000) 'Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis', *Development*.
- Chen, R. J. *et al.* (2015) 'Variations in Glycogen Synthesis in Human Pluripotent Stem Cells with Altered Pluripotent States', *PLoS ONE*, 10(11), p. e0142554. doi: 10.1371/journal.pone.0142554.
- Cho, J. *et al.* (2018) 'A review of clinical trials: mesenchymal stem cell transplant therapy in type 1 and type 2 diabetes mellitus.', *American journal of stem cells*.
- Cho, Y. A. *et al.* (2015) 'Melatonin promotes hepatic differentiation of human dental pulp stem cells: Clinical implications for the prevention of liver fibrosis', *Journal of Pineal Research*. doi: 10.1111/jpi.12198.
- Chung, I. H. *et al.* (2009) 'Stem cell property of postmigratory cranial neural crest cells and their utility in alveolar bone regeneration and tooth development', *Stem Cells*. doi: 10.1002/stem.2.
- Clough, B. H. *et al.* (2017) 'An allograft generated from adult stem cells and their secreted products efficiently fuses vertebrae in immunocompromised athymic rats and inhibits local immune responses', *Spine Journal*, 17(3), pp. 418–430. doi: 10.1016/j.spinee.2016.10.009.
- Convertino, D. *et al.* (2020) 'Graphene promotes axon elongation through local stall of nerve growth factor signaling endosomes', *Nano Letters*, 20(5), pp. 3633–3641. doi: 10.1021/acs.nanolett.0c00571.
- Das, K. *et al.* (2017) 'Functionalized carbon nanotubes as suitable scaffold materials for proliferation and differentiation of canine mesenchymal stem cells', *International Journal of Nanomedicine*, 12, pp. 3235–3252. doi: 10.2147/IJN.S122945.
- Datta, I. *et al.* (2017) 'Functional recovery upon human dental pulp stem cell transplantation in a diabetic neuropathy rat model', *Cytotherapy*. doi: 10.1016/j.jcyt.2017.07.009.
- Diekwisch, T. G. H. (2001) 'The developmental biology of cementum', *International Journal of Developmental Biology*. doi: 10.1387/ijdb.11669371.
- Domínguez-Bajo, A. *et al.* (2020) 'Graphene Oxide Microfibers Promote Regenerative Responses after Chronic Implantation in the Cervical Injured Spinal Cord', *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 6(4), pp. 2401–2414. doi: 10.1021/acsbiomaterials.0c00345.
- Dominici, M. *et al.* (2006) 'Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement', *Cytotherapy*. doi: 10.1080/14653240600855905.
- Donovan, C. M. G. *et al.* (1993) 'Autologous calvarial and iliac onlay bone grafts in miniature swine', *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. doi: 10.1016/S0278-2391(10)80112-0.
- Duailibi, M. T. *et al.* (2004) 'Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells', *Journal of Dental Research*. doi: 10.1177/154405910408300703.
- El-Bialy, T. *et al.* (2014) 'Ultrasound effect on neural differentiation of gingival stem/progenitor cells', *Annals of Biomedical Engineering*, 42(7), pp. 1406–1412. doi: 10.1007/s10439-014-1013-9.
- Estrela, C. *et al.* (2011) 'Mesenchymal stem cells in the dental tissues: Perspectives for tissue regeneration', *Brazilian Dental Journal*. doi: 10.1590/s0103-64402011000200001.
- F.N., S.-P. *et al.* (2015) 'Dental pulp stem cells: A new cellular resource for corneal stromal regeneration', *Stem Cells Translational Medicine*.
- Fabbro, A., Prato, M. and Ballerini, L. (2013) 'Carbon nanotubes in neuroregeneration and repair', *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier, pp. 2034–2044. doi: 10.1016/j.addr.2013.07.002.

- Ferraro, F., Lo Celso, C. and Scadden, D. (2010) 'Adult stem cells and their niches', *Advances in Experimental Medicine and Biology*. doi: 10.1007/978-1-4419-7037-4\_11.
- Folmes, C. D. L., Park, S. and Terzic, A. (2013) 'Lipid metabolism greases the stem cell engine', *Cell Metabolism*. Cell Press, pp. 153–155. doi: 10.1016/j.cmet.2013.01.010.
- Fortier, L. A. (2005) 'Stem cells: Classifications, controversies, and clinical applications', *Veterinary Surgery*. doi: 10.1111/j.1532-950X.2005.00063.x.
- Fournier, B. P. J. *et al.* (2010) 'Multipotent progenitor cells in gingival connective tissue', *Tissue Engineering - Part A*. doi: 10.1089/ten.tea.2009.0796.
- Friedenstein, A. J. (1980) 'Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo.', *Haematology and blood transfusion*. doi: 10.1007/978-3-642-67319-1\_3.
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K. and Lalykina, K. S. (1970) 'THE DEVELOPMENT OF FIBROBLAST COLONIES IN MONOLAYER CULTURES OF GUINEA-PIG BONE MARROW AND SPLEEN CELLS', *Cell Proliferation*. doi: 10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x.
- Fujii, H. *et al.* (2015) 'Dopaminergic differentiation of stem cells from human deciduous teeth and their therapeutic benefits for Parkinsonian rats', *Brain Research*. doi: 10.1016/j.brainres.2015.04.001.
- Gandia, C. *et al.* (2008a) 'Human Dental Pulp Stem Cells Improve Left Ventricular Function, Induce Angiogenesis, and Reduce Infarct Size in Rats with Acute Myocardial Infarction', *Stem Cells*. doi: 10.1634/stemcells.2007-0484.
- Gandia, C. *et al.* (2008b) 'Human Dental Pulp Stem Cells Improve Left Ventricular Function, Induce Angiogenesis, and Reduce Infarct Size in Rats with Acute Myocardial Infarction', *Stem Cells*, 26(3), pp. 638–645. doi: 10.1634/stemcells.2007-0484.
- Gay, I. C., Chen, S. and MacDougall, M. (2007) 'Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells', *Orthodontics and Craniofacial Research*. doi: 10.1111/j.1601-6343.2007.00399.x.
- Giuliani, A. *et al.* (2013) 'Three Years After Transplants in Human Mandibles, Histological and In-Line Holotomography Revealed That Stem Cells Regenerated a Compact Rather Than a Spongy Bone: Biological and Clinical Implications', *STEM CELLS Translational Medicine*. doi: 10.5966/sctm.2012-0136.
- Gomes, J. Á. P. *et al.* (2010) 'Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp stem cells', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. doi: 10.1167/iovs.09-4029.
- Gong, T. *et al.* (2016) 'Current Advance and Future Prospects of Tissue Engineering Approach to Dentin/Pulp Regenerative Therapy', *Stem Cells International*. doi: 10.1155/2016/9204574.
- Govindasamy, V. *et al.* (2011) 'Differentiation of dental pulp stem cells into islet-like aggregates', *Journal of Dental Research*. doi: 10.1177/0022034510396879.
- Gronthos, S. *et al.* (2000) 'Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.240309797.
- Gronthos, S. *et al.* (2002) 'Stem cell properties of human dental pulp stem cells', *Journal of Dental Research*. doi: 10.1177/154405910208100806.

- Guimarães, E. T. *et al.* (2013) 'Transplantation of stem cells obtained from murine dental pulp improves pancreatic damage, renal function, and painful diabetic neuropathy in diabetic type 1 mouse model', *Cell Transplantation*. doi: 10.3727/096368912X657972.
- Guo, W., Gong, K., *et al.* (2012) 'Dental follicle cells and treated dentin matrix scaffold for tissue engineering the tooth root', *Biomaterials*. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.068.
- Guo, W., Chen, L., *et al.* (2012) 'Heterogeneous dental follicle cells and the regeneration of complex periodontal tissues', *Tissue Engineering - Part A*. doi: 10.1089/ten.tea.2011.0261.
- Guzmán-Urbe, D. *et al.* (2013) 'Development of A Three-Dimensional Tissue Construct from Dental Human Ectomesenchymal Stem Cells: In Vitro and In Vivo Study', *The Open Dentistry Journal*. doi: 10.2174/1874210601206010226.
- Han, F. *et al.* (2021) 'Strategy for Designing a Cell Scaffold to Enable Wireless Electrical Stimulation for Enhanced Neuronal Differentiation of Stem Cells', *Advanced Healthcare Materials*, p. 2100027. doi: 10.1002/adhm.202100027.
- Han, J. *et al.* (2009) 'Collection and culture of alveolar bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells from older individuals', *Journal of Cellular Biochemistry*. doi: 10.1002/jcb.22224.
- Harkness, L. *et al.* (2012) 'Identification of abnormal stem cells using raman spectroscopy', *Stem Cells and Development*, 21(12), pp. 2152–2159. doi: 10.1089/scd.2011.0600.
- He, S., Nakada, D. and Morrison, S. J. (2009) 'Mechanisms of stem cell self-renewal', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113248.
- Heil, M. *et al.* (2004) 'A Different Outlook on the Role of Bone Marrow Stem Cells in Vascular Growth: Bone Marrow Delivers Software not Hardware', *Circulation Research*. doi: 10.1161/01.RES.0000124603.46777.EB.
- Heng, B. C. *et al.* (2016) 'An overview of protocols for the neural induction of dental and oral stem cells in vitro', *Tissue Engineering - Part B: Reviews*. doi: 10.1089/ten.teb.2015.0488.
- Heraud, P. *et al.* (2010) 'Fourier transform infrared microspectroscopy identifies early lineage commitment in differentiating human embryonic stem cells', *Stem Cell Research*, 4(2), pp. 140–147. doi: 10.1016/j.scr.2009.11.002.
- Hilkens, P. *et al.* (2013) 'Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells', *Cell and Tissue Research*. doi: 10.1007/s00441-013-1630-x.
- Hilkens, P. *et al.* (2016) 'Cryopreservation and banking of dental stem cells', in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. doi: 10.1007/978-3-319-45457-3\_17.
- Honda, M. J. *et al.* (2006) 'Preliminary study of tissue-engineered odontogenesis in the canine jaw', *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. doi: 10.1016/j.joms.2005.10.020.
- Honda, M. J. *et al.* (2010) 'Dental follicle stem cells and tissue engineering.', *Journal of oral science*. doi: 10.2334/josnusd.52.541.
- Honda, M. J. *et al.* (2011) 'Stem cells isolated from human dental follicles have osteogenic potential', in *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.08.004.
- Hong, S. W. *et al.* (2014) 'Enhanced neural cell adhesion and neurite outgrowth on graphene-based biomimetic substrates', *BioMed Research International*. doi: 10.1155/2014/212149.
- Horwitz, E. M. *et al.* (2005) 'Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society

---

for Cellular Therapy position statement’, *Cytotherapy*. doi: 10.1080/14653240500319234.

Huang, G. T.-J., Gronthos, S. and Shi, S. (2009) ‘Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs. Those from Other Sources’, *Journal of Dental Research*.

Huang, G. T. J. *et al.* (2008) ‘The Hidden Treasure in Apical Papilla: The Potential Role in Pulp/Dentin Regeneration and BioRoot Engineering’, *Journal of Endodontics*. doi: 10.1016/j.joen.2008.03.001.

Huangfu, D. *et al.* (2008) ‘Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2’, *Nature Biotechnology*. doi: 10.1038/nbt.1502.

Igarashi, A. *et al.* (2007) ‘Selection of common markers for bone marrow stromal cells from various bones using real-time RT-PCR: Effects of passage number and donor age’, *Tissue Engineering*. doi: 10.1089/ten.2006.0340.

Ikeda, E. *et al.* (2008) ‘Multipotent cells from the human third molar: Feasibility of cell-based therapy for liver disease’, *Differentiation*. doi: 10.1111/j.1432-0436.2007.00245.x.

Iohara, K. *et al.* (2011) ‘Complete pulp regeneration after pulpectomy by transplantation of CD105+ stem cells with stromal cell-derived factor-1’, *Tissue Engineering - Part A*. doi: 10.1089/ten.tea.2010.0615.

Ishikawa, J. *et al.* (2016) ‘Factors secreted from dental pulp stem cells show multifaceted benefits for treating experimental rheumatoid arthritis’, *Bone*, 83, pp. 210–219. doi: 10.1016/j.bone.2015.11.012.

Ishkitiev, N. *et al.* (2010) ‘Deciduous and Permanent Dental Pulp Mesenchymal Cells Acquire Hepatic Morphologic and Functional Features In Vitro’, *Journal of Endodontics*. doi: 10.1016/j.joen.2009.12.022.

Jeon, B. G. *et al.* (2011) ‘Comparative analysis of telomere length, telomerase and reverse transcriptase activity in human dental stem cells’, *Cell Transplantation*, 20(11–12), pp. 1693–1705. doi: 10.3727/096368911X565001.

Ji, M. *et al.* (2015) ‘Detection of human brain tumor infiltration with quantitative stimulated Raman scattering microscopy’, *Science Translational Medicine*, 7(309). doi: 10.1126/scitranslmed.aab0195.

Kanafi, M. M. *et al.* (2013) ‘Transplantation of islet-like cell clusters derived from human dental pulp stem cells restores normoglycemia in diabetic mice’, *Cytotherapy*. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.05.008.

Kelly, G. M. and Gatie, M. I. (2017) ‘Mechanisms Regulating Stemness and Differentiation in Embryonal Carcinoma Cells’, *Stem Cells International*. Hindawi Limited. doi: 10.1155/2017/3684178.

Kerkis, I. *et al.* (2008) ‘Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic?’, *Journal of Translational Medicine*. doi: 10.1186/1479-5876-6-35.

Khorsand, A. *et al.* (2013) ‘Autologous dental pulp stem cells in regeneration of defect created in canine periodontal tissue’, *Journal of Oral Implantology*. doi: 10.1563/AAID-JOI-D-12-00027.

Kim, D. H. *et al.* (2015) ‘GDF-15 secreted from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells delivered through the cerebrospinal fluid promotes hippocampal neurogenesis and synaptic activity in an Alzheimer’s disease model’, *Stem Cells and Development*, 24(20), pp. 2378–2390. doi: 10.1089/scd.2014.0487.

- Kim, H. *et al.* (2020) ‘Intrathecal injection in a rat model: A potential route to deliver human wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells into the brain’, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4). doi: 10.3390/ijms21041272.
- Kim, H. J. *et al.* (2016) ‘PIN1 suppresses the hepatic differentiation of pulp stem cells via Wnt3a’, *Journal of Dental Research*. doi: 10.1177/0022034516659642.
- Kim, H. S. *et al.* (2010) ‘Immunomodulatory effect of canine periodontal ligament stem cells on allogenic and xenogenic peripheral blood mononuclear cells’, *Journal of Periodontal and Implant Science*. doi: 10.5051/jpis.2010.40.6.265.
- Kim, J. Y. *et al.* (2012) ‘Soluble intracellular adhesion molecule-1 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell reduces amyloid-B plaques’, *Cell Death and Differentiation*, 19(4), pp. 680–691. doi: 10.1038/cdd.2011.140.
- Klein, O. D. and Nör, J. E. (2015) ‘Craniofacial stem cells in health and disease’, *Journal of Dental Research*. doi: 10.1177/0022034515608368.
- Konorov, S. O. *et al.* (2011) ‘Absolute quantification of intracellular glycogen content in human embryonic stem cells with Raman microspectroscopy’, *Analytical Chemistry*, 83(16), pp. 6254–6258. doi: 10.1021/ac201581e.
- Koole, R., Bosker, H. and van der Dussen, F. N. (1989) ‘Late secondary autogenous bone grafting in cleft patients comparing mandibular (ectomesenchymal) and iliac crest (mesenchymal) grafts’, *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. doi: 10.1016/S1010-5182(89)80036-8.
- Koppes, A. N. *et al.* (2016) ‘Robust neurite extension following exogenous electrical stimulation within single walled carbon nanotube-composite hydrogels’, *Acta Biomaterialia*, 39, pp. 34–43. doi: 10.1016/j.actbio.2016.05.014.
- Kuo, T. F. *et al.* (2008) ‘Regeneration of dentin-pulp complex with cementum and periodontal ligament formation using dental bud cells in gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold in swine’, *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. doi: 10.1002/jbm.a.31746.
- Kushnerev, E. *et al.* (2016) ‘Regeneration of corneal epithelium with dental pulp stem cells using a contact lens delivery system’, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. doi: 10.1167/iovs.15-17953.
- Langer, R. and Vacanti, J. P. (1993) ‘Tissue engineering’, *Science*. doi: 10.1126/science.8493529.
- Lanza, R., Langer, R. and Vacanti, J. P. (2013) *Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition*, *Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition*. doi: 10.1016/C2011-0-07193-4.
- Lee, J. R. *et al.* (2015) ‘Behaviors of stem cells on carbon nanotube’, *Biomaterials Research*. doi: 10.1186/s40824-014-0024-9.
- Lee, N. K. *et al.* (2017) ‘Agouti related peptide secreted via human mesenchymal stem cells upregulates proteasome activity in an Alzheimer’s disease model’, *Scientific Reports*, 7. doi: 10.1038/srep39340.
- Lee, N. K., Na, D. L. and Chang, J. W. (2018) ‘Killing two birds with one stone: The multifunctional roles of mesenchymal stem cells in the treatment of neurodegenerative and muscle diseases’, *Histology and Histopathology*. *Histology and Histopathology*, pp. 629–638. doi: 10.14670/HH-11-951.
- Lee, S.-M., Zhang, Q. and Le, A. D. (2014) ‘Dental Stem Cells: Sources and Potential Applications’, *Current Oral Health Reports*, 1(1), pp. 34–42. doi: 10.1007/s40496-014-0012-0.

- Leong, W. K. *et al.* (2012) ‘Human Adult Dental Pulp Stem Cells Enhance Poststroke Functional Recovery Through Non-Neural Replacement Mechanisms’, *STEM CELLS Translational Medicine*. doi: 10.5966/sctm.2011-0039.
- Lepore, A. C. *et al.* (2005) ‘Neural precursor cells can be delivered into the injured cervical spinal cord by intrathecal injection at the lumbar cord’, *Brain Research*, 1045(1–2), pp. 206–216. doi: 10.1016/j.brainres.2005.03.050.
- Lerou, P. H. and Daley, G. Q. (2005) ‘Therapeutic potential of embryonic stem cells’, *Blood Reviews*. doi: 10.1016/j.blre.2005.01.005.
- Li, Z. *et al.* (2014) ‘Immunomodulatory properties of dental tissue-derived mesenchymal stem cells’, *Oral Diseases*. doi: 10.1111/odi.12086.
- Liao, J. *et al.* (2011) ‘Cells isolated from inflamed periapical tissue express mesenchymal stem cell markers and are highly osteogenic’, *Journal of Endodontics*, 37(9), pp. 1217–1224. doi: 10.1016/j.joen.2011.05.022.
- Lindroos, B. *et al.* (2008) ‘Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.01.081.
- Liu, J. *et al.* (2015) ‘Concise reviews: Characteristics and potential applications of human dental tissue-derived mesenchymal stem cells’, *Stem Cells*. doi: 10.1002/stem.1909.
- Lunn, J. S., Sakowski, S. A. and Feldman, E. L. (2014) ‘Concise review: Stem cell therapies for amyotrophic lateral sclerosis: Recent advances and prospects for the future’, *Stem Cells*. Wiley-Blackwell, pp. 1099–1109. doi: 10.1002/stem.1628.
- Madanagopal, T. T. *et al.* (2021) ‘Pulsed electromagnetic fields synergize with Graphene to enhance dental pulp stem cell-derived neurogenesis by selectively targeting trpc1 channels’, *European Cells and Materials*, 41, pp. 216–232. doi: 10.22203/eCM.v041a16.
- Martin, G. R. (1981) ‘PNAS-1981-Martin-7634-8’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Martínez-Sarrà, E. *et al.* (2017) ‘Human dental pulp pluripotent-like stem cells promote wound healing and muscle regeneration’, *Stem Cell Research and Therapy*. doi: 10.1186/s13287-017-0621-3.
- Mason, C. and Dunnill, P. (2008) ‘A brief definition of regenerative medicine’, *Regenerative Medicine*. doi: 10.2217/17460751.3.1.1.
- Matsubara, T. *et al.* (2005) ‘Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: Differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells’, *Journal of Bone and Mineral Research*. doi: 10.1359/JBMR.041117.
- Mead, B. *et al.* (2016) ‘Mesenchymal stromal cell-mediated neuroprotection and functional preservation of retinal ganglion cells in a rodent model of glaucoma’, *Cytotherapy*. doi: 10.1016/j.jcyt.2015.12.002.
- Mead, B. *et al.* (2017) ‘Concise Review: Dental Pulp Stem Cells: A Novel Cell Therapy for Retinal and Central Nervous System Repair’, *Stem Cells*. doi: 10.1002/stem.2398.
- Mendes, S. C. *et al.* (2002) ‘Bone tissue-engineered implants using human bone marrow stromal cells: Effect of culture conditions and donor age’, *Tissue Engineering*. doi: 10.1089/107632702320934010.

- Mitrano, T. I. *et al.* (2010) ‘Culture and Characterization of Mesenchymal Stem Cells From Human Gingival Tissue’, *Journal of Periodontology*. doi: 10.1902/jop.2010.090566.
- Miura, M. *et al.* (2003) ‘SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.0937635100.
- Monteiro, B. G. *et al.* (2009) ‘Human immature dental pulp stem cells share key characteristic features with limbal stem cells’, *Cell Proliferation*. doi: 10.1111/j.1365-2184.2009.00623.x.
- Moore, K. A. and Lemischka, I. R. (2006) ‘Stem cells and their niches’, *Science*. doi: 10.1126/science.1110542.
- Morszeck, C., Moehl, C., *et al.* (2005) ‘In vitro differentiation of human dental follicle cells with dexamethasone and insulin’, *Cell Biology International*. doi: 10.1016/j.cellbi.2005.03.020.
- Morszeck, C., Götz, W., *et al.* (2005) ‘Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth’, *Matrix Biology*. doi: 10.1016/j.matbio.2004.12.004.
- Morszeck, C. (2015) ‘Dental Follicle Stem Cells’, in *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*. Elsevier Inc., pp. 271–277. doi: 10.1016/B978-0-12-397157-9.00022-9.
- Mueller, S. M. and Glowacki, J. (2001) ‘Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges’, *Journal of Cellular Biochemistry*. doi: 10.1002/jcb.1174.
- Nakamura, S. *et al.* (2009) ‘Stem Cell Proliferation Pathways Comparison between Human Exfoliated Deciduous Teeth and Dental Pulp Stem Cells by Gene Expression Profile from Promising Dental Pulp’, *Journal of Endodontics*, 35(11), pp. 1536–1542. doi: 10.1016/j.joen.2009.07.024.
- Nakamura, T. *et al.* (2003) ‘The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane’, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. doi: 10.1167/iovs.02-0195.
- Nakao, K. *et al.* (2007) ‘The development of a bioengineered organ germ method’, *Nature Methods*. doi: 10.1038/nmeth1012.
- Nakashima, M. *et al.* (2017) ‘Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical study’, *Stem Cell Research and Therapy*. doi: 10.1186/s13287-017-0506-5.
- Nakashima, M. and Iohara, K. (2017) ‘Recent Progress in Translation from Bench to a Pilot Clinical Study on Total Pulp Regeneration’, *Journal of Endodontics*. doi: 10.1016/j.joen.2017.06.014.
- Nesti, C. *et al.* (2011) ‘Human dental pulp stem cells protect mouse dopaminergic neurons against MPP+ or rotenone’, *Brain Research*. doi: 10.1016/j.brainres.2010.09.042.
- Nicola, F. do C. *et al.* (2017) ‘Neuroprotector effect of stem cells from human exfoliated deciduous teeth transplanted after traumatic spinal cord injury involves inhibition of early neuronal apoptosis’, *Brain Research*. doi: 10.1016/j.brainres.2017.03.015.
- Nosrat, I. V. *et al.* (2001) ‘Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury’, *Developmental Biology*. doi: 10.1006/dbio.2001.0400.
- Notingher, I. *et al.* (2004) ‘In situ spectral monitoring of mRNA translation in embryonic stem cells during differentiation in vitro’, *Analytical Chemistry*, 76(11), pp. 3185–3193. doi: 10.1021/ac0498720.

- 
- O'Donoghue, K. and Fisk, N. M. (2004) 'Fetal stem cells', *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2004.06.010.
- Okita, K. *et al.* (2008) 'Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors', *Science*. doi: 10.1126/science.1164270.
- Patil, R. *et al.* (2014) 'Multilineage potential and proteomic profiling of human dental stem cells derived from a single donor', *Experimental Cell Research*. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.10.005.
- Petrescu, N. B. *et al.* (2020) 'Cannabidiol and vitamin D3 impact on osteogenic differentiation of human dental mesenchymal stem cells', *Medicina (Lithuania)*, 56(11), pp. 1–23. doi: 10.3390/medicina56110607.
- Pierdomenico, L. *et al.* (2005) 'Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp', *Transplantation*. doi: 10.1097/01.tp.0000173794.72151.88.
- Pijanka, J. K. *et al.* (2010) 'Vibrational spectroscopy differentiates between multipotent and pluripotent stem cells', in *Analyst*. Royal Society of Chemistry, pp. 3126–3132. doi: 10.1039/c0an00525h.
- Pilbauerova, N. *et al.* (2021) 'The effect of cultivation passaging on the relative telomere length and proliferation capacity of dental pulp stem cells', *Biomolecules*, 11(3), pp. 1–14. doi: 10.3390/biom11030464.
- Pisciotta, A. *et al.* (2015) 'Stem cells isolated from human dental pulp and amniotic fluid improve skeletal muscle histopathology in mdx/SCID mice', *Stem Cell Research and Therapy*. doi: 10.1186/s13287-015-0141-y.
- Qu, G. *et al.* (2021) 'Comparison of Osteogenic Differentiation Potential of Human Dental-Derived Stem Cells Isolated from Dental Pulp, Periodontal Ligament, Dental Follicle, and Alveolar Bone', *Stem Cells International*, 2021. doi: 10.1155/2021/6631905.
- Rao, N. *et al.* (2019) 'Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth Ameliorate Diabetic Nephropathy in Vivo and in Vitro by Inhibiting Advanced Glycation End Product-Activated Epithelial-Mesenchymal Transition', *Stem Cells International*, 2019. doi: 10.1155/2019/2751475.
- Rodríguez-Lozano, F. J. *et al.* (2011) 'Mesenchymal stem cells derived from dental tissues', *International Endodontic Journal*. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01877.x.
- Roozafzoon, R. *et al.* (2015) 'Dental pulp stem cells differentiation into retinal ganglion-like cells in a three dimensional network', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.069.
- Rotter, N. *et al.* (2008) 'Isolation and characterization of adult stem cells from human salivary glands', *Stem Cells and Development*. doi: 10.1089/scd.2007.0180.
- Sakai, K. *et al.* (2012) 'Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms', *Journal of Clinical Investigation*. doi: 10.1172/JCI59251.
- Schofield, R. (1978) 'The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. A hypothesis', *Blood Cells*.
- Seo, B. M. *et al.* (2004a) 'Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament', *Lancet*, 364(9429), pp. 149–155. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16627-0.
- Seo, B. M. *et al.* (2004b) 'Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal



---

ligament’, *Lancet*. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16627-0.

Seo, B. M. *et al.* (2005) ‘Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament’, *Journal of Dental Research*. doi: 10.1177/154405910508401007.

Serio, A. and Patani, R. (2018) ‘Concise Review: The Cellular Conspiracy of Amyotrophic Lateral Sclerosis’, *Stem Cells*. Wiley-Blackwell, pp. 293–303. doi: 10.1002/stem.2758.

Simonovic, J. *et al.* (2018) ‘Differentiation of stem cells from apical papilla into neural lineage using graphene dispersion and single walled carbon nanotubes’, *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 106(10), pp. 2653–2661. doi: 10.1002/jbm.a.36461.

Simonović, J. *et al.* (2019) ‘Raman microspectroscopy: toward a better distinction and profiling of different populations of dental stem cells’, *Croatian Medical Journal*, 60(2), pp. 78–86. doi: 10.3325/croatmedj\_60\_0078.

Sinnott, S. B. and Andrews, R. (2001) ‘Carbon nanotubes: Synthesis, properties, and applications’, *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*. CRC Press LLC. doi: 10.1080/20014091104189.

Solanki, A. *et al.* (2013) ‘Axonal alignment and enhanced neuronal differentiation of neural stem cells on graphene-nanoparticle hybrid structures’, *Advanced Materials*. doi: 10.1002/adma.201302219.

Son, Y. B. *et al.* (2021) ‘Evaluation of odonto/osteogenic differentiation potential from different regions derived dental tissue stem cells and effect of 17 $\beta$ -estradiol on efficiency’, *BMC Oral Health*, 21(1), pp. 1–14. doi: 10.1186/s12903-020-01366-2.

Song, M. *et al.* (2017) ‘Human dental pulp stem cells are more effective than human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in cerebral ischemic injury’, *Cell Transplantation*. doi: 10.3727/096368916X694391.

Sonoyama, W. *et al.* (2006) ‘Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in Swine’, *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0000079.

Sonoyama, W. *et al.* (2008) ‘Characterization of the Apical Papilla and Its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth: A Pilot Study’, *Journal of Endodontics*. doi: 10.1016/j.joen.2007.11.021.

Stadtfeld, M. *et al.* (2008) ‘Induced pluripotent stem cells generated without viral integration’, *Science*. doi: 10.1126/science.1162494.

Stenderup, K. *et al.* (2001) ‘Number and proliferative capacity of osteogenic stem cells are maintained during aging and in patients with osteoporosis’, *Journal of Bone and Mineral Research*. doi: 10.1359/jbmr.2001.16.6.1120.

Stevens, A. *et al.* (2008) ‘Human dental pulp stem cells differentiate into neural crest-derived melanocytes and have label-retaining and sphere-forming abilities’, *Stem Cells and Development*. doi: 10.1089/scd.2008.0012.

Suchánek, J. *et al.* (2007) ‘Human dental pulp stem cells--isolation and long term cultivation.’, *Acta medica (Hradec Králové) / Universitas Carolina, Facultas Medica Hradec Králové*. doi: 10.14712/18059694.2017.82.

Sugiyama, M. *et al.* (2011) ‘Dental pulp-derived CD31-/CD146- side population stem/progenitor cells enhance recovery of focal cerebral ischemia in rats’, *Tissue Engineering - Part A*. doi: 10.1089/ten.tea.2010.0306.

- Sun, A. X. *et al.* (2016) ‘Direct Induction and Functional Maturation of Forebrain GABAergic Neurons from Human Pluripotent Stem Cells’, *Cell Reports*, 16(7), pp. 1942–1953. doi: 10.1016/j.celrep.2016.07.035.
- Sun, J. *et al.* (2017) ‘tBHQ Suppresses Osteoclastic Resorption in Xenogeneic-Treated Dentin Matrix-Based Scaffolds’, *Advanced Healthcare Materials*. doi: 10.1002/adhm.201700127.
- Syed-Picard, F. N. *et al.* (2015) ‘Dental Pulp Stem Cells: A New Cellular Resource for Corneal Stromal Regeneration’, *STEM CELLS Translational Medicine*. doi: 10.5966/sctm.2014-0115.
- Taghipour, Z. *et al.* (2012) ‘Transplantation of undifferentiated and induced human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells promote functional recovery of rat spinal cord contusion injury model’, *Stem Cells and Development*. doi: 10.1089/scd.2011.0408.
- Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006) ‘Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors’, *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Taşlı, P. N. *et al.* (2016) ‘Myogenic and neurogenic differentiation of human tooth germ stem cells (hTGSCs) are regulated by pluronic block copolymers’, *Cytotechnology*. doi: 10.1007/s10616-014-9784-2.
- Techawattanawisal, W. *et al.* (2007) ‘Isolation of multipotent stem cells from adult rat periodontal ligament by neurosphere-forming culture system’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.04.031.
- Thomson, J. A. (1998) ‘Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts’, *Science*. doi: 10.1126/science.282.5391.1145.
- Vishwakarma, A. *et al.* (2014) *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences, Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*. doi: 10.1016/C2011-0-07350-7.
- Volponi, A. A., Pang, Y. and Sharpe, P. T. (2010) ‘Stem cell-based biological tooth repair and regeneration’, *Trends in Cell Biology*. doi: 10.1016/j.tcb.2010.09.012.
- Wang, F. *et al.* (2017) ‘Dental pulp stem cells promote regeneration of damaged neuron cells on the cellular model of Alzheimer’s disease’, *Cell Biology International*. doi: 10.1002/cbin.10767.
- Wang, J. *et al.* (2010) ‘Stem cells from human-exfoliated deciduous teeth can differentiate into dopaminergic neuron-like cells’, *Stem Cells and Development*. doi: 10.1089/scd.2009.0258.
- Wang, L. *et al.* (2011) ‘Characterization of stem cells from alveolar periodontal ligament’, *Tissue Engineering - Part A*. doi: 10.1089/ten.tea.2010.0140.
- Wang, M., Yuan, Q. and Xie, L. (2018) ‘Mesenchymal stem cell-based immunomodulation: Properties and clinical application’, *Stem Cells International*. doi: 10.1155/2018/3057624.
- Wang, Y. *et al.* (2012) ‘Fluorinated graphene for promoting neuro-induction of stem cells’, *Advanced Materials*, 24(31), pp. 4285–4290. doi: 10.1002/adma.201200846.
- Wei, F. *et al.* (2013) ‘Functional tooth restoration by allogeneic mesenchymal stem cell-based bio-root regeneration in swine’, *Stem Cells and Development*. doi: 10.1089/scd.2012.0688.
- Weissman, I. L. (2000) ‘Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution’, *Cell*. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81692-X.
- Wobus, A. M. *et al.* (1984) ‘Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo’, *Experimental Cell Research*. doi: 10.1016/0014-4827(84)90246-5.

- Xing, C. *et al.* (2018) 'A potential gliovascular mechanism for microglial activation: Differential phenotypic switching of microglia by endothelium versus astrocytes', *Journal of Neuroinflammation*, 15(1). doi: 10.1186/s12974-018-1189-2.
- Xuan, K. *et al.* (2018) 'Deciduous autologous tooth stem cells regenerate dental pulp after implantation into injured teeth', *Science Translational Medicine*. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf3227.
- Yalvac, M. E. *et al.* (2009) 'Comparison and optimisation of transfection of human dental follicle cells, a novel source of stem cells, with different chemical methods and electro-poration', *Neurochemical Research*. doi: 10.1007/s11064-008-9905-4.
- Yalvac, M. E. *et al.* (2010) 'Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: Implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis', *Pharmacogenomics Journal*. doi: 10.1038/tpj.2009.40.
- Yalvaç, M. E. *et al.* (2011) 'Differentiation and neuro-protective properties of immortalized human tooth germ stem cells', *Neurochemical Research*. doi: 10.1007/s11064-011-0546-7.
- Yamada, Y. *et al.* (2013) 'Injectable bone tissue engineering using expanded mesenchymal stem cells', *Stem Cells*. doi: 10.1002/stem.1300.
- Yamaza, T. *et al.* (2010) 'Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth', *Stem Cell Research and Therapy*. doi: 10.1186/s13287-015-0154-6.
- Yamaza, T. *et al.* (2015) 'In vivo hepatogenic capacity and therapeutic potential of stem cells from human exfoliated deciduous teeth in liver fibrosis in mice', *Stem Cell Research and Therapy*. doi: 10.1186/s13287-015-0154-6.
- Yang, B. *et al.* (2017) 'Application of stem cells in oral disease therapy: Progresses and perspectives', *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A., p. 197. doi: 10.3389/fphys.2017.00197.
- Yang, C. *et al.* (2017) 'Potential of human dental stem cells in repairing the complete transection of rat spinal cord', *Journal of Neural Engineering*. doi: 10.1088/1741-2552/aa596b.
- Yang, D. *et al.* (2014) 'Graphene oxide promotes the differentiation of mouse embryonic stem cells to dopamine neurons', *Nanomedicine*. doi: 10.2217/nnm.13.197.
- Yao, S. *et al.* (2008) 'Differentiation of stem cells in the dental follicle', *Journal of Dental Research*. doi: 10.1177/154405910808700801.
- Yashiro, Y. *et al.* (2014) 'Function of chemokine (CXC motif) ligand 12 in periodontal ligament fibroblasts', *PLoS ONE*, 9(5). doi: 10.1371/journal.pone.0095676.
- Young, C. S. *et al.* (2002) 'Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds', *Journal of Dental Research*. doi: 10.1177/154405910208101008.
- Zhang, Q., Zhang, Z. and Yin, J. (2019) 'Free-Standing Buckle-Delaminated 2D Organic Nanosheets with Enhanced Mechanical Properties and Multifunctionality', *Advanced Materials Interfaces*, 6(17), p. 1900561. doi: 10.1002/admi.201900561.
- Zhang, X. *et al.* (2018) 'Transplanted Dental Pulp Stem Cells Migrate to Injured Area and Express Neural Markers in a Rat Model of Cerebral Ischemia', *Cellular Physiology and Biochemistry*. doi: 10.1159/000486772.
- Zhao, H. and Chai, Y. (2015) 'Stem cells in teeth and craniofacial bones', *Journal of Dental Research*. doi: 10.1177/0022034515603972.

Zins, J. E. and Whitaker, L. A. (1979) 'Membranous vs endochondral bone autografts: implications for craniofacial reconstruction.', *Surgical Forum*. doi: 10.1097/00006534-198203000-00146.

Zins, J. E. and Whitaker, L. A. (1983) 'Membranous versus endochondral bone: Implications for craniofacial reconstruction', *Plastic and Reconstructive Surgery*. doi: 10.1097/00006534-198312000-00005.

## **Prilog A**

STOMATOLOŠKI FAKULTET  
UNIVERZITET U BEOGRADU  
KLINIKA ZA ORALNU HIRURGIJU  
011/2685-268  
011/2685-064

### **INFORMATOR ZA ISPITANIKE**

#### **Naslov istraživanja:**

**“Izolacija, karakterizacija i uporedna analiza potencijala za neurodiferencijaciju matičnih ćelija poreklom iz različitih zubnih tkiva”**

#### **Plan i svrha istraživanja**

Studija se bavi istraživanjem matičnih ćelija koje se izoluju iz zubnih tkiva izvađenog trećeg kutnjaka (osmica tj. umnjak). Matične ćelije su sve interesantnije u medicini i stomatologiji u regeneraciji oštećenih i obolelih tkiva. S obzirom na karakteristike matičnih ćelija poreklom iz zubnih tkiva, kao i na činjenicu da su lako dostupne, sve je veće interesovanje za njihovu potencijalnu upotrebu u terapiji oboljenja kao što su Alchajmer, Parkinsonova bolest, infarkt mozga i povreda kičmene moždine.

Cilj ovog istraživanja biće ispitivanje mogućnosti dobijanja nervnih ćelija od matičnih ćelija poreklom iz zubnih tkiva, kao i njihovo međusobno poređenje.

Istraživanje će biti sprovedeno na Stomatološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, u okviru izrade doktorske disertacije.

Za učešće u studiji ne postoji novčana naknada.

Ne postoji sukob interesa od strane istraživača uključenih u studiju.

Nakon uzimanja istorije bolesti, standardne hiruške procedure vađenja zuba i potpisivanja **Saglasnosti**, izvađen umnjak će biti transportovan u odgovarajućem medijumu u laboratoriju Stomatološkog fakulteta radi daljeg istraživanja.

### **Rizici po pacijenta**

U literaturi ne postoje podaci o postojanju rizika u vezi sa ovakvim procedurama.

### **Značaj istraživanja**

Moguća korist ove studije odnosi se na razumevanje ponašanja matičnih ćelija i njihovoj eventualnoj budućoj terapijskoj primeni.

### **Tajnost podataka**

Dokumentacija o pacijentu je poverljiva. Uvid u medicinsku dokumentaciju, osim ordinirajućeg lekara, imaće samo članovi istraživačkog tima, a za objavljivanje će biti korišćeni isključivo anonimni studijski podaci.

### **Pacijent će blagovremeno biti obavešten ako nove informacije postanu dostupne**

Pacijent će na vreme biti obavešten ako dođe do bilo kakvih promena u istraživanju ili ako nove informacije u nauci i praksi postanu dostupne. Sve informacije će moći da dobije od članova istraživačkog tima.

### **Dobrovoljno učestvovanje i uslovi povlačenja iz studije**

Učestvovanje u studiji je potpuno dobrovoljno. Povlačenje iz studije je moguće u svakom trenutku iz bilo kog razloga, i neće imati uticaja na način i ishod terapije pacijenta.

### **Približan broj učesnika u studiji**

Približan broj učesnika u studiji će biti: 5 pacijenata (5 umnjaka).

### **Koga pitati**

Ukoliko u bilo kom trenutku poželite više informacija o ovom istraživanju, molimo Vas da se obratite dr Jeleni Simonović, sa Stomatološkog fakulteta u Beogradu (011/2646-280).

## SAGLASNOST

Nakon što sam pročitao/la *Informator za pacijente* gde je detaljno opisan postupak i izvođenje istraživanja, informisan/a sam o prirodi i ciljevima ove studije kao i o potencijalnim rizicima i koristima. Imao/la sam priliku da postavim pitanja u vezi sa studijom i dobio/la zadovoljavajuće odgovore.

Razumem da je učešće mog deteta

---

(Ime i prezime deteta)

potpuno dobrovoljno i da sam slobodan/na da povučem svoj pristanak u bilo kom trenutku bez davanja bilo kakvih razloga, što neće uticati na način i ishod terapije mog deteta.

Svaka informacija u vezi sa mojim detetom biće poverljiva, a samo će anonimni studijski podaci biti korišćeni za objavljivanje.

Slažem se da informacije u vezi sa mnom mogu biti poslate u druge zemlje, unutar i izvan Evropske unije.

Dobrovoljno dajem pristanak za učešće svog deteta i korišćenju matičnih ćelija koje se izoluju iz zubnih tkiva izvađenog trećeg umnjaka u istraživanju navedenom u okviru *Informatora za pacijente*

1. Ime i prezime roditelja/staratelja \_\_\_\_\_

(štampanim slovima)

potpis \_\_\_\_\_

2. Ime i prezime roditelja/staratelja \_\_\_\_\_

(štampanim slovima)

potpis \_\_\_\_\_

Beograd, 2016.

## ***Biografija***

Dr Jelena Simonović je rođena 14.08.1988. u Beogradu gde je završila osnovnu školu i Treću beogradsku gimnaziju, oba puta kao nosilac Vukove diplome. Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala 2007. godine, kao prva na rang listi, a 2012. godine je diplomirala sa prosečnom ocenom 9,02.

Pripravnički staž je obavila na istom Fakultetu, nakon čega je položila državni ispit.

Upisala je doktorske studije na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2013. godine, u okviru kojih je položila sve ispite sa prosečnom ocenom 9,93 (devet i 93/100).

Od januara 2014. godine je angažovana kao istraživač pripravnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije br. 175075 “Genetička kontrola i molekularni mehanizmi u malignim, inflamatornim i razvojnim patologijama orofacijalne regije”. A od 2017. godine je zaposlena na pomenutom projektu kao istraživač saradnik, Od školske 2014/2015, angažovana je kao saradnik u nastavi, a od 2018. godine i kao asistent na predmetu Opšta i oralna histologija i embriologija u okviru integrisanih akademskih studija Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Do sada je objavila 5 naučnih radova na SCI listi, 13 saopštenja sa međunarodnih skupova, jedno predavanje na međunarodnom kongresu za koje je nagrađena i dva saopštenja na domaćim skupovima.



## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Јелена М. Симоновић \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ 4005/2013 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Изолација, карактеризација и упоредна анализа потенцијала за

\_\_\_\_\_

неуродиференцијацију матичних ћелија пореклом из различитих зубних ткива

\_\_\_\_\_

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

Потпис аутора

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Јелена М. Симоновић \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ 4005/2013 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Докторске студије – Базична и клиничка истраживања у стоматологији \_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_\_\_\_ Изолација, карактеризација и упоредна анализа потенцијала за

\_\_\_\_\_ неуродиференцијацију матичних ћелија пореклом из различитих зубних ткива \_\_\_\_\_

Ментор \_\_\_\_\_ проф. др Јелена Милашин \_\_\_\_\_

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

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

Изолација, карактеризација и упоредна анализа потенцијала за неуродиференцијацију матичних ћелија пореклом из различитих зубних ткива

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_