



UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET



**BIOKOMPATIBILNOST,  
CITOTOKSIČNOST I  
OSTEOINDUKTIVNOST RAZLIČITIH  
KOŠTANIH ZAMENIKA NA MATIČNIM  
ĆELIJAMA PULPE MLEČNIH ZUBA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:  
prof. dr Branislav Bajkin

Kandidat:  
dr Dragica Bulajić

Novi Sad, 2022. godine

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА<sup>1</sup>

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Драгица Булајић
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	Проф. др Бранислав Бајкин, ванредни професор, Медицински факултет Нови Сад
Наслов рада:	Биокомпатибилност, цитотоксичност и остеоиндуктивност различитих коштаних заменика на матичним ћелијама пулпе млечних зуба
Језик публикације (писмо):	Српски (латиница)
Физички опис рада:	Унети број: Страница: 110 Поглавља: 7 Референци: 265 Табела: 5 Слика: 20 Графикона: 0 Прилога: 0
Научна област:	Стоматологија
Ужа научна област (научна дисциплина):	Орална хирургија
Кључне речи / предметна одредница:	ткивни инжењеринг; мезенхималне стем ћелије; носачи ткива; биокомпатибилни материјали; зубна пулпа; млечни зуби; замене за кости; остеообласти; дентин
Резиме на језику рада:	<b>Увод:</b> Ткивни инжењеринг је мултидисциплинарно поље које има за циљ да обнови, одржи или побољша функције ткива која су оштећена или су изгубљена услед различитих патолошких стања, било развојем адекватних биолошких замена или реконструкцијом ткива. За успех у инжењерингу ткива веома су важни следећи фактори: избор извора матичних ћелија, стратегије које се користе за изоловање и пасажирање специфичних ћелија, избор биоматеријала који ће се користити као скафолд (носач) и повезаност међу њима. Скафолди могу бити различитог порекла, па тако имамо аутографте, алографте, ксенографте и алопластичне материјале. Биомеханички систем кости је сложен тако да идеалан скафолд треба да испуњава следеће услове: биокомпатибилност, остеоиндуктивност, остеоиндуктивност, способност ангиогенезе. Један

<sup>1</sup> Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истоветности штапане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штапаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

од најперспективнијих извора матичних ћелија за реконструкцију коштаних оштећења јесте зубна пулпа. Матичне ћелије зубне пулпе се једноставно изолују како из млечних (*SHED*) тако и сталних зуба (*DPSC*), у *in vitro* условима се лако уможавају и за надокнаду оштећења костију се могу користити у комбинацији са или без скафолда. Ове ћелије су изузетно пролиферативне и способне за остеогено, дентиногено, адипогено, хондрогено, и неурогено диференцирање.

**Циљ** ове дисертације је била изолација и карактеризација мезенхималних матичних ћелија зубне пулпе пореклом из хуманих млечних зуба који се налазе у својој физиолошкој смени, и потом одређивање биокомпатибилности испитиваних биоматеријала (*Bio-oss®* (*Geistlich, Switzerland*, дентинских опиљака и *SBA-16/HA*), и евалуација ћелијске вијабилности након контакта са њима. Након тога је циљ био диференцирати и имунохистолошки потврдити остеобластичну трансформацију мезенхималних матичних ћелија зубне пулпе гајених у остеогеном медијуму, које су касније коришћене у испитивању остеоиндуктивног потенцијала различитих коштаних заменика.

**Материјал и методе:** Експериментални део истраживања је подељен на пет делова. У првом делу истраживања је вршена изолација и карактеризација *SHED* на проточном цитометру, у другом делу је вршена синтеза и карактеризација *SBA-16/HA* материјала, у трећем делу експеримента је вршено испитивање биокомпатибилности три материјала на основу стандардних тестова биокомпатибилности: *DET* теста, *MTT* теста. У четвртном делу вршена је диференцијација и испитивање остеогеног капацитета *SHED*. Потврда добијених остеобласта је вршена ализарин ред тестом и имунофлуоресцентним бојењем следећих приматних антитела: остеопонтин, *SOX2*, *Ki-67* и *Coll-1*. У последњем, петом делу експерименталне студије одређивана је експресија остеогених маркера у *SHED* третираним испитиваним материјалима. Најпре је изолована *iRNK* из ћелија, потом је реакцијом реверзне транскрипције преведена у *iDNK* и на крају је квантификована у Реал тиме *PCR* анализи. У анализи су коришћени *RUNX2* и *ALPL* гени.

**Резултати:** Изоловањем *SHED* добили смо ћелије које имају висок пролиферативни потенцијал и позитивно експримирају маркере матичних ћелија на проточном цитометру, чиме испуњавају неопходне критеријуме да буду дефинисане као хумане мезенхималне стем ћелије. На тестовима биокомпатибилности, *MTT* и *DET*, новосинтетисани *SBA-16/HA* материјал и контролни *Bio-oss®* су показали биокомпатибилни и пролиферишући ефекат на *SHED*; док су дентински опиљци показали благи цитотоксични ефекат. Након периода инкубације од три недеље у остеогеном медијуму, *SHED* су се диференцирале у остеобласте. То смо доказали присуством обојених комплекса у култури ћелија након бојења ализарин црвеним и позитивним имунофлуоресцентним бојањем остеогеним маркерима; ћелије су показале високу експресију анти-*Coll1* и Остеопонтин, док је експресија *Ki-67* и анти-*SOX2* антитела била нешто слабија. Од свих испитиваних материјала, само су дентински опиљци показали статистички значајна остеоиндуктивна својства, експримирајући *ALPL* и *RUNX2* гене. Материјал *Bio-oss®* је у све три групе показао експресију оба гена која је нижа од контролне групе, док је *SBA-16/HA* само у групи екстракта старог 1. дан имао благо повишену експресију *ALPL* гена, гена ране остеобластичне диференцијације.

**Закључак:** Из зубне пулпе млечних зуба деце изолују се ћелије које имају висок пролиферативни потенцијал и потенцијал диференцијације у остеобласте након периода инкубације од три недеље у остеогеном

	<p>медијуму. На основу овог истраживања, <i>SBA-16/HA</i> и <i>Bio-oss®</i> су показали показали задовољавајућ ниво биокомпатибилности. Са малом предношћу <i>SBA-16/HA</i> је био бољи од примењиваног златног стандарда <i>Bio-oss®</i>. Дентински опиљци који се већ користе у клиничкој пракси су показали нижи ниво биокомпатибилности, али висок остеоиндуктивни потенцијал.</p>
<p>Датум прихватања теме од стране надлежног већа:</p>	<p>15.06.2021. године</p>
<p>Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)</p>	
<p>Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)</p>	<p>Председник:</p> <p>Члан:</p> <p>Члан:</p> <p>Члан:</p>
<p>Напомена:</p>	

KEY WORD DOCUMENTATION<sup>2</sup>

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Dragica Bulajić
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Prof. dr Branislav Bajkin, associate professor, Faculty of Medicine Novi Sad
Thesis title:	Biocompatibility, cytotoxicity and osteoinductivity of different bone substitutes on deciduous tooth pulp stem cells
Language of text (script):	Serbian language (latin script)
Physical description:	Number of: Pages: 110 Chapters: 7 References: 265 Tables: 5 Illustrations: 20 Graphs: 0 Appendices: 0
Scientific field:	Dentistry
Scientific subfield (scientific discipline):	Oral surgery
Subject, Key words:	Tissue Engineering; Mesenchymal Stem Cells; Tissue Scaffolds; Biocompatible Materials; Dental Pulp; Tooth, Deciduous; Bone Substitutes; Osteoblasts; Dentin
Abstract in English language:	<b>Introduction:</b> Tissue engineering is a multidisciplinary field with a goal to restore, maintain or improve the functions of tissues that are damaged or lost due to various pathological conditions, either by developing adequate biological substitutes or tissue reconstruction. The following factors are very important for success in tissue engineering: choice of stem cell source, strategies used to isolate and passage specific cells, choice of biomaterial to be used as scaffold and the bond between them. Scaffolds can be of different origins, so we have autografts, allografts, xenografts and alloplastic materials. The biomechanical system of bone is complex so that the ideal scaffold should have the following properties: biocompatibility,

<sup>2</sup> The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

56 – Statement on the authority,

5B – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

osteoconductivity, osteoinductivity, ability of angiogenesis. One of the most promising sources of stem cells for the reconstruction of bone damage is dental pulp. Dental pulp stem cells are easily isolated from both deciduous (SHED) and permanent teeth (DPSC), are easily hardened in vitro, and can be used in combination with or without scaffold to compensate for bone damage. These cells are extremely proliferative and capable of osteogenic, dentinogenic, adipogenic, chondrogenic, and neurogenic differentiation.

**The aim** of this dissertation was to isolate and characterize mesenchymal stem cells of dental pulp originating from human deciduous teeth that are in their physiological shift, and then determine the biocompatibility of the tested biomaterials (Bio-oss<sup>®</sup> (Geistlich, Switzerland), dentin particles, and SBA/16-HA), and evaluation of cell viability after contact with them. After that, the goal was to differentiate and immunohistologically confirm the osteoblastic transformation of mesenchymal stem cells of dental pulp grown in osteogenic medium, which were later used in the study of the osteoconductive potential of different bone substitutes.

**Material and methods:** The experimental part of the research is divided into five parts. In the first part of the research the isolation and characterization of SHED on a flow cytometer was performed, in the second part the synthesis and characterization of SBA-16/HA materials was performed, in the third part of the experiment the biocompatibility of three materials was tested based on standard biocompatibility tests: DET and MTT test. The following materials were tested: Bio-oss<sup>®</sup> (Geistlich AG, Wolhusen, Switzerland), SBA-16/HA and dentin shavings prepared according to the manufacturer's instructions (*BonMaker, KDS, Korea*). In the fourth part, differentiation and examination of osteogenic capacity of SHED were performed. Confirmation of the obtained osteoblasts was performed by alizarin red test and immunofluorescent staining of the following primary antibodies: osteopontin, SOX2, Ki-67 and Coll-1. In the last, fifth part of the experimental study, the expression of osteogenic markers in SHED-treated test materials was determined. First, the mRNA was isolated from the cells, then converted to cDNA by reverse transcription, and finally quantified in Real time PCR analysis. The *RUNX2* and *ALPL* genes were used in the analysis.

**Results:** By isolating SHED, we obtained cells that have high proliferative potential and positively express stem cell markers on a flow cytometer, thus meeting the necessary criteria to be defined as human mesenchymal stem cells. In biocompatibility tests, MTT and DET, newly synthesized SBA-16/HA material and control Bio-oss<sup>®</sup> showed a biocompatible and proliferating effect on SHED; while dentin particles showed a mild cytotoxic effect. After a three-week incubation period in osteogenic medium, SHED differentiated into osteoblasts. We proved this by the presence of stained complexes in cell culture after alizarin staining with red and positive immunofluorescent staining with osteogenic markers; cells showed high expression of anti-Coll 1 and Osteopontin, while expression of Ki-67 and anti-SOX 2 antibodies was slightly lower. Of all the materials tested, only dentin particles showed statistically significant osteoinductive properties, expressing the *ALPL* and *RUNX2* genes. Bio-oss<sup>®</sup> showed expression of both genes lower than the control group in all three groups, while SBA-16/HA had slightly increased expression of the *ALPL* gene, an early osteoblastic differentiation gene, only in the 1-day-old extract group.

**Conclusion:** Cells with high proliferative potential and potential for differentiation into osteoblasts after an incubation period of three weeks in osteogenic medium are isolated from the dental pulp of children's deciduous teeth. Based on this study, SBA-16/HA and Bio-oss<sup>®</sup> showed a satisfactory

	level of biocompatibility. With a slight advantage, SBA-16/HA was better than the applied Bio-oss <sup>®</sup> gold standard. Dentin particules already used in clinical practice have shown lower levels of biocompatibility but high osteoinductive potential.
Accepted on Scientific Board on:	15.06.2021.
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	President:  Member:  Member:  Member:
Note:	

## Zahvalnica

*Ovu stranicu koristim da se zahvalim svima koji su mi svojim nesebičnim trudom i zalaganjem pomogli prilikom izrade doktorske disertacije kao i mog naučnog usavršavanja. Neizmernu zahvalnost na ukazanom poverenju, dragocenim savetima, posvećenom vremenu i razumevanju dugujem svom dragom mentoru prof. dr Branislavu Bajkinu koji je strpljivo od prvog dana svojim znanjem i idejama usmeravao moj rad na disertaciji, kao i celokupan istraživački rad, pružajući iskrenu, prijateljsku podršku.*

*Srdačno se zahvaljujem prof. dr Ivanu Čapo na bezrezervnoj pomoći u svakoj prilici, zalaganju, nesebičnom pružanju ogromnog znanja i izuzetnim smernicama kojima je unapređena disertacija.*

*Želim da se zahvalim i doc. dr Slobodanu Sekuliću kao rukovodiocu projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom „Neurološki razvoj kod prenatalne izloženosti ploda antiepileptičkoj terapiji“, OI 175006, u okviru kog je urađena sama disertacija, što mi je omogućio da postanem deo tima i načinim svoje prve korake u svetu nauke.*

*Takođe, zahvaljujem se dr Slavici Savić, naučnom savetniku Instituta Biosens i njenom timu na divnoj saradnji tokom sinteze materijala i korisnim savetima tokom izrade doktorske disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Bojanu Petroviću, prof. dr Sanji Vujkov i asistentu dr Jeleni Komišić na prijateljskoj i uspešnoj saradnji tokom skupljanja mlečnih zuba za ovu disertaciju.*

*Mojoj Jovani dugujem jedno veliko hvala za preneseno znanje, svu pomoć pri optimizaciji metoda korišćenih u ovoj disertaciji i tumačenju rezultata, jer samo ona zna koliko je nevidljivog posla tu bilo. Hvala za sve sate koje smo provele pričajući o problemima koje samo jedan doktorand može da ima, i da razume.*

*Od srca se zahvaljujem svim članovima Zavoda za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, na divnoj saradnji, prijateljskoj atmosferi i podršci tokom svih ovih godina. Želim da se zahvalim svojim kolegama Bojani, Dejanu, Milanu, Aleksandri, Mileni, Natali, Nikoli, Milani na ohrabrenjima, smehu i divnim godinama provedenim sa njima!*

*Na kraju hvala mojim prijateljima, kumovima i kolegama koji su uvek bili tu za mene da me pitaju kada će kraj, njihova nestrpljivost mi je bila podstrek da budem što vrednija. A moja najveća podrška i najjači vetar u leđa su bili i biće moja porodica, moj stric Minja, moja braća Milan i Vuk, moja snajka Rajka, moji pilići Milica, Vladimir i Minja i moji roditelji Gordana i Vlado. Ovu disertaciju posvećujem mojim dragim roditeljima, jer njihova bezgranična ljubav i podrška su me ceo život vodile ka svakom uspehu, i za sve što sam ja zaslužni su upravo oni!*

Dragica Bulajić



## Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1 Tkivni inženjering.....	1
1.2 Koštano tkivno inženjerstvo .....	1
1.3 Fiziologija i zarastanje koštanog tkiva.....	3
1.4 Koštani zamenici-skafoldi .....	5
1.4.1 Dentinski opiljci.....	7
1.4.2 Aloplastični biomaterijali u koštanom tkivnom inženjerstvu .....	8
1.4.2.1 Porozni materijali.....	11
1.5 Faktori rasta .....	13
1.6 Matične ćelije.....	14
1.6.1 Pojam matičnih ćelija.....	14
1.6.2 Klasifikacija matičnih ćelija zuba.....	16
1.6.2.1 Matične ćelije parodontalnog ligamenta.....	17
1.6.2.2 Matične ćelije apikalne papile .....	18
1.6.2.3 Matične ćelije iz zubnog folikula i upaljenih periapikalnih cista .....	19
1.6.2.4 Matične ćelije zubne pulpe .....	19
2. CILJEVI I HIPOTEZE .....	24
3. MATERIJAL I METODE .....	25
3.1 Prikupljanje i ekstrakcija mlečnih zuba .....	25
3.2 Izolovanje mezenhimalnih ćelija zubne pulpe iz eksfoliranih mlečnih zuba metodom tkivnog eksplanta .....	25
3.3 Pasažiranje i krioprezervacija mezenhimalnih ćelija zubne pulpe mlečnih zuba..	26
3.3.1 Subkultivacija primarne ćelijske kulture u jednom sloju.....	26
3.3.2 Brojanje ćelija metodom Tripan-plavim .....	27
3.3.3 Zamrzavanje ćelija .....	27
3.3.4 Odmrzavanje ćelija .....	27
3.4 Test formiranja kolonija ( <i>engl. colony forming unit assay, CFU</i> ).....	28
3.5 Određivanje fenotipa dobijenih ćelija.....	28
3.6 Priprema dentinskih opiljaka .....	29
3.7 Sinteza i priprema SBA-16/HA .....	30
3.7.1 Sinteza mezoporozne silike SBA-16 .....	30
3.7.2 Sinteza SBA-16/HA kompozita.....	31
3.8 Karakterizacija ispitivanog materijala .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.8.1 Difrakcija X zraka , XRD (X-ray diffraction) ..	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.8.2 Difrakcija X zraka pri malim i pri većim uglovima, SWAXS (Small angle/Wide angle XRay Spectroscopy) .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.8.3 Skenirajuća elektronska mikroskopija, SEM (Scanning Electron Microscopy) sa energetski disperzivnom rendgenskom spektroskopijom, EDS (Energy Dispersive Spectroscopy).....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.8.4 Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom, Fourier transform infrared Spectroscopy (FTIR).....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.9 Određivanje citotoksičnosti ispitivanih materijala.....	33
3.9.1 Ispitivanje citotoksičnosti materijala-MTT test (thiazolyl blue tetrazolium bromide test) .....	33
3.9.2 Test odbacivanja boje - DET test.....	34

3.10 Diferencijacija ćelija u osteoblaste .....	35
3.10.1 Osteogena diferencijacija ćelija .....	35
3.10.2 Alizarin red test.....	36
3.10.3 Imunofluorescentno bojenje primarnih ćelijskih linija .....	36
3.11 Određivanje ekspresije osteogenih markera .....	37
3.11.2 Reakcija reverzne transkripcije.....	39
3.11.3 Kvantifikacija iRNK u Real time PCR analizi .....	39
3.12 Statistička analiza.....	40
4. REZULTATI.....	41
4.1 Izolacija ćelijske populacije mezenhimalnih ćelija metodom eksplanta .....	41
4.2 Test formiranja kolonija.....	42
4.3 Karakterizacija fenotipa dobijenih ćelija metodom protočne citometrije.....	42
4.4 Karakterizacija novosintetisanog materijala na bazi mezoporozne silike i hidroksiapatita.....	44
4.4.1 SWAXS i XRD.....	44
4.4.2 SEM (Skenirajuća elektronska mikroskopija) sa EDS analizom.....	46
4.4.3 Infracrvena spektroskopija sa Furijevom transformacijom .....	48
4.5 Ispitivanje indirektno citotoksičnosti ispitivanih materijala- MTT test.....	49
4.6 Test odbacivanja boje- dye exclusion test (DET) .....	52
4.7 Diferencijacija ćelija u osteoblaste .....	53
4.8 Imunofluorescentno bojenje primarne ćelijske kulture.....	54
4.9 Analiza ekspresije osteogenih markera.....	56
4.9.1 Ekspresija <i>ALPL</i> gena u SHED.....	56
4.9.2 Ekspresija <i>RUNX2</i> gena u SHED.....	59
5. DISKUSIJA .....	63
5.1 Diskusija primenjene metodologije .....	64
5.1.1 Diskusija metode izolacije SHED.....	64
5.1.2 Diskusija izbora materijala uključenih u ispitivanje .....	65
5.1.3 Diskusija metodologije ispitivanja biokompatibilnosti .....	70
5.2 Diskusija dobijenih rezultata.....	72
5.2.1 Diskusija morfologije izolovanih ćelija .....	72
5.2.2 Diskusija rezultata testa formiranja kolonija- CFU-F test .....	72
5.2.3 Diskusija rezultata protočne citometrije .....	73
5.2.4 Diskusija sinteze i rezultata karakterizacije materijala SBA-16/HA.....	74
5.2.5 Diskusija rezultata biokompatibilnosti- MTT test .....	75
5.2.6 Diskusija rezultata biokompatibilnosti- DET test.....	76
5.2.6 Diskusija rezultata diferencijacije SHED u osteoblaste (Alizarin red bojanje).....	77
5.2.7 Diskusija imunoflorescentnog bojanja.....	79
5.2.8 Diskusija rezultata ekspresije osteogenih markera .....	82
6. ZAKLJUČCI.....	85
7. REFERENCE.....	86

**Lista skraćenica:**

ALP - alkalna fosfataza (eng. *alkaline phosphatase*)

ATR – oslabljena ukupna refleksija (eng. *Attenuated Total Reflectance*)

BMP - koštani morfogogenetski protein (eng. *Bone Morphogenetic Protein*)

CFU-F - broj kolonija u kulturi (eng. *Colony-Forming Unit Formation*)

DDM - demineralizovani dentin (eng. *Demineralized Dentin Matrix*)

DET - test odbacivanja boje (eng. *Dye Exclusion Test*)

DFC - matične ćelije zubnog folikula (eng. *Dental Follicle Cells*)

DFDB – demineralizovani zamrznuti sušeni koštani alotransplantat (eng. *Demineralized Freeze-Dried Bone*)

DMEM Ham's F-12 - Dulbeko modifikovanog Iglovog medijuma sa L-glutaminom

DMSO - dimetil-sulfoksid (eng. *dimethylsulfoxide*)

DO – dentinski opiljci

DPSC - matične ćelije zubne pulpe (eng. *Dental Pulp Stem Cells*)

DSP - dentinski sialoprotein (eng. *Dentin Sialoprotein*)

FBS - fetalni goveđi serum (eng. *Fetal Bovine Serum*)

FDB – zamrznuti sušeni koštani alotransplantat (eng. *Freeze-Dried Done*)

FGF – faktor rasta fibroblasta (eng. *Fibroblast Growth Factor*)

FTIR infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (eng. *Fourier transform Infrared Spectroscopy*)

GBR - vođena regeneracija kosti (eng. *Guided Bone Regeneration*)

HACS - matične ćelije inflamiranih periapikalnih cista (eng. *Human Inflamed Periapical Cysts Stem Cells*)

HAP – hidroksiapatit

HCl – hlorovodinična kiselina (eng. *Hydrochloric acid*)

IDPSC - nezrele matične ćelije zubne pulpe (eng. *Immature Dental Pulp Stem Cells*)

ihPDLSC - inflamirane matične ćelije parodontalnog tkiva (eng. *Inflamed Periodontal Ligament Stem Cells*)

ISCT - Međunarodno društvo za ćelijsku terapiju (eng. *International Society for Cell Therapy*)

IUPAC – eng. *International Union of Pure and Applied Chemistry*

MEPE - vanćelijski fosfoglikoproteinski matriks (eng. *Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein*)

MSC - adultne mezenhimalne stem ćelije (eng. *Mesenchymal Stem Cells*)

MTA - eng. *Mineral Trioxide Aggregate*

MTT - thiazolyl blue tetrazolium bromide

NCP - nekolagenski protein (eng. *Non-Collagen Protein*)

OCN - osteokalcin

OPN - osteopontin

P<sub>1</sub> – prva pasaža

PBS - fosfatni pufer (eng. *Phosphate Buffered Saline*)

PCR – eng. *Polymerase Chain Reaction*

PDGF – faktor rasta izveden iz trombocita (eng. *Platelet-derived growth factor*)

PDL - parodontalni ligament (eng. *Periodontal Ligament*)

PDLSC - matične ćelije parodontalnog tkiva (eng. *Periodontal Ligament Stem Cells*)

PGA – poliglikolna kiselina (eng. *Polyglycolic Acid*)

PLA – polilaktička kiselina (eng. *Polylactic Acid*)

PRF - plazma bogata trombocitima (eng. *Platelet Rich Fibrin*)

RM – regenerativna medicina

RUNX2 - eng. *Runt-related transcription factor 2*

SBA - eng. *Santa Barbara Amorphous*

SCAP - matične ćelije iz apikalne papile (eng. *Stem Cells from the Apical Papilla*)

SEM –eng. *Scanning Electron Microscopy*

SHED - matične ćelije eksfolijatnih mlečnih zuba (eng. *Stem cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth*)

SWAXS - rendgenska spektroskopija sa malim/širokim uglom (eng. *Small Angle/Wide Angle XRay Spectroscopy*)

$\beta$ -TCP -  $\beta$ -trikalcijum fosfat (eng.  $\beta$  TriCalcium Phosphate)

TEOS – tetraetilortosilikat

TGF- $\beta$ /BMP - eng. *Transforming Growth Factor- $\beta$ /Bone Morphogenic Protein*

TI – tkivni inženjering

VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta (eng. *Vascular Endothelial Growth Factor*)

XRD - rendgenske difrakcija X zraka (eng. *X-Ray Diffraction*)

## 1. UVOD

### 1.1 Tkivni inženjering

Oblast tkivnog inženjeringa (TI) je značajno napredovala u poslednjih 20 godina, nudeći potencijal za regeneraciju skoro svakog tkiva i organa ljudskog tela. Inženjering tkiva kao srodna disciplina regenerativne medicine (RM) je i dalje oblast koja se konstantno razvija u pravcu traženja novih tretmanima za mnogobrojna oboljenja (1). Napredak u ovoj oblasti zahteva saradnju istraživača različitih disciplina, uključujući nauke o ćelijskoj biologiji i nauke o biomaterijalima. Inženjering tkiva ima za cilj da obnovi, održi ili poboljša funkcije tkiva koja su oštećena ili su izgubljena usled različitih patoloških stanja, bilo razvojem adekvatnih bioloških zamena ili rekonstrukcijom tkiva. Opšte strategije u TI mogu se klasifikovati u tri grupe (2):

1. implantacija izolovanih ćelija u organizam;
2. isporuka supstanci koje indukuju regeneraciju tkiva (kao što su faktori rasta);
3. postavljanje ćelija na ili unutar različitih skafolda-nosača.

Poslednja strategija u nizu je najčešće povezana sa konceptom TI, odnosno rekonstrukcijom delova tkiva korišćenjem živih ćelija zasejanih na prirodni ili sintetički ekstracelularni supstrat (3).

### 1.2 Koštano tkivno inženjerstvo

U poslednjoj deceniji, primena matičnih ćelija zubne pulpe za regeneraciju koštanog tkiva je detaljno istražena u sklopu TI i RM (4, 5). Kao što je gore spomenuto, strategije TI podrazumevaju stvaranje novih regenerisanih tkiva pomoću ćelija, nosača (skafolda) i faktora rasta, samih ili u kombinaciji (5, 6).

U stomatologiji, vođena regeneracija kosti (engl. *guided bone regeneration-GBR*) je postala je svakodnevna praksa koja se koristi u okviru denetalne implantologije ili u parodontalnoj regeneraciji. GBR se zasniva na primeni materijala za graftovanje i membrana (7). Što se tiče materijala za graftovanje, autogeni koštani transplantati se smatraju zlatnim standardom zbog svojih osteogenih, osteoinduktivnih i

osteokonduktivnih svojstava, biokompatibilnosti, odsustva imunološke reakcije i dostupnosti (7, 8). Međutim, upotreba autografta zahteva dodatnu hiruršku intervenciju koja sa sobom nosi problem mogućih komplikacija donorske lokacije i ograničene količine transplantata. Ostali koštani zamenici su: alografti, ksenografti i aloplastični materijali. Sve ove grupe materijala imaju prednosti i nedostatke, a mogu se koristiti u kombinaciji sa autotransplantatima ili samostalno, prema izabranoj GBR tehnici (7, 9, 10).

Zahvaljujući sposobnosti samoobnavljanja i potencijalu diferencijacije, adultne mezenhimalne stem ćelije (MSC) se smatraju važnim činiocem u RM. One imaju sposobnost diferencijacije u osteocite, neuronske ćelije, miocite kao i hondroците. Koštana srž i masno tkivo oduvek su smatrane tkivom prvog izbora za sakupljanje MSC, iako izolacija MSC iz ovih tkiva predstavlja invazivnu proceduru za pacijente ili donore. Kako bi se smanjili troškovi, a posebno neophodnost složene hirurške intervencije, istraživači su proučili dostupne alternativne izvore za izolaciju MSC (8, 11). *Grontos* i sar. su prvi opisali mogućnost izolacije ćelija iz zubnog tkiva pulpe ljudi i definisali ih kao matične ćelije zubne pulpe (DPSC). Upoređivanje imuno-fenotipa i osobina matičnih ćelija zubne pulpe sa mezenhimalnim ćelijama koštane srži, primećene su slične karakteristike (12).

Koštani TI predstavlja interdisciplinarno polje koje integriše principe i metodologiju nauka o biologiji i inženjeringu, u cilju obnavljanja oštećenih tkiva. Jedan od najvažnijih faktora koji treba uzeti u obzir za TI je primena skafolda. Na sposobnost matičnih ćelija da rastu i diferenciraju se prema željenoj ćelijskoj liniji u velikoj meri utiče sastav, komponente i svojstva korišćenog skafolda. Oni mogu biti sintetički proizvedeni ili prirodnog porekla (13). Prednosti upotrebe sintetičkih skafolda su u tome što se mogu modifikovati (veličina pora, stepen međusobne povezanosti elemenata) onoliko koliko je potrebno; međutim, njihova biokompatibilnost je niža u odnosu na prirodne. S druge strane, iako su prirodni polimeri slabiji i mekši, kao naprimer keramika, oni imaju sposobnost da prilagode svoju strukturu željenom obliku. Štaviše, prirodni polimeri obično imaju specifičnu strukturu koja služi kao potpora ćelijama, usmerava njihov razvoj i interakciju između skafolda i tkiva (14). Dva važna svojstva skafolda su biorazgrađivost, svojstvo da se postepeno razgrađuje i podržava formiranje tkiva u isto

vreme, i biokompatibilnost, koja zavisi od specifične interakcije između biomaterijala i tkiva (15). Biomaterijali mogu biti čvrsti ili tečni, prirodni ili sintetički. Na osnovu svega gore navedenog, može se zaključiti da svaka vrsta skafolda koja se koristi, može imati prednosti i nedostatke, a izbor konkretno zavisi od potrebe i krajnjeg cilja istraživanja i regeneracije (13).

### 1.3 Fiziologija i zarastanje koštanog tkiva

Kost je tkivo u kome se dešavaju dinamični biološki procesi. Sastavljeno je od metabolički aktivnih ćelija koje su integrisane u mineralizovani organski matriks (16). Uloga koju ima koštano tkivo u organizmu je mehanička potpora i zaštita tela, a pored toga učestvuje u metabolizmu kalcijuma, fosfora, magnezijuma, natrijuma i u održavanju acidobazne ravnoteže. Ovo tkivo ima aktivnu metaboličku ulogu jer sadrži 99% celokupnog telesnog kalcijuma koje po potrebi otpušta.

Osteoblasti su ćelije koje stvaraju kost. Ove ćelije se nalaze između prethodno stvorene kosti i nemineralizovanog organskog matriksa – osteoida, i stimulišu mineralizaciju nezrelog tkiva, čime se završava izgradnja kosti. U osteoblastima se odvija sinteza kolagen tipa 1 i drugih proteina poput osteokalcina, proteoglikana, sijaloproteina, osteonektina i drugih, koji učestvuju u mineralizaciji. Osteociti su najbrojnije koštane ćelije koje nastaju od osteoblasta, nakon procesa koštanog formiranja, kada se ove u potpunosti okruže nemineralizovanim matriksom. Međusobno su povezani citoplazmatskim nastavcima i smešteni su u lakunama. Svaka lakuna sadrži po jedan osteocit. Uloga ovih ćelija je u kontroli ekstracelularne koncentracije kalcijuma i fosfora kao i u adaptivnom remodelovanju putem interakcije ćelija (16). Smatra se da oko 20% osteocita aktivno učestvuje u stvaranju kosti (17). Osteoklasti su polijedarne ćelije odgovorne za resorpciju kosti koju kontrolišu ćelijski i hormonski mehanizmi (16). Ove ćelije ponakad sadrže i više desetina jedara. Telo ćelije je naborano što im povećava resorpcionu i dodirnu površinu. U njima se dešava sinteza proteolitičkih enzima koji razgrađuju koštani matriks. U fiziološkim uslovima postoji dinamična ravnoteža između aktivnosti osteoblastičnih i osteoklastičnih ćelija, čime se održava homeostaza kosti. Nedostatak ravnoteže između procesa razgradnje i izgradnje kosti dovodi do osteoporoze,



odnosno do osteoskleroze. Organski deo čini kolagen tipa 1 i amorfnu organsku supstancu od glikozaminoglikana i drugih proteina. Neorganski deo je najvećim delom sačinjen od hidroksiapatita a pored njega je prisutan i amorfnu kalcijum fosfat.

Zarastanje koštanog tkiva je složen regenerativni proces koji nastaje kao reakcija na povredu. Koštano zarastanje može biti primarno i sekundarno. Primarno zarastanje koštanog tkiva je zastupljeno kod idealno reponiranih fragmenata kosti. Ono može biti kontaktno ili pukotinasto, u zavisnosti od defekta. Osnovna razlika u odnosu na sekundarno koštano zarastanje je izostanak formiranja kalusa i resorpcije tkiva u predelu defekta (18). Kod primarnog koštanog zarastanja osteoblasti i osteoklasti se diferenciraju iz mezenhimalnih ćelija Haversovog kanala. Novostvoreni osteoni postaju deo nove lamelarne kosti koja premošćava frakturnu liniju (19). Sekundarno zarastanje koštanog tkiva je češći tip zarastanja. Ono podrazumeva kompleksan proces koji se sastoji od tri faze: inflamatorne, mekokalusne i tvrdokalusne reparativne faze i faze remodelovanja, koje se međusobno preklapaju (20). Pri povredi koštanog tkiva započinje inflamatorna faza. U frakturnoj pukotini se razvija se hematoma, a ćelije zapaljenja (makrofagi, monociti, limfociti i polimorfonuklearne ćelije) i fibroblasti infiltrišu kost. Ove ćelije će dovesti do formiranja granulacionog tkiva, pojačane vaskularizacije i migracije nezrelih mezenhimskih ćelija prisutnih u kosti (16). U sledećoj fazi, fazi reparacije, fibroblasti deponuju stromu sa pojačanim vaskularnim urastanjem. Počinje sekrecija osteoida, koji se zatim mineralizuje i formira mekotkivni kalus. Kada mekotkivni kalus osifikuje i stvori most od mlade kosti, između frakturnih fragmenata, on postaje tvrdi kalus. Ukoliko nastane problem u procesu osifikacije, tvrdi kalus se ne stvara već dolazi do fibroznog zarastanja (16). Faza remodelacije je finalna faza procesa zarastanja. Remodelovanje je proces zamene mlade, morfološki nezrele kosti lamelarnom kosti. Kalus se lagano resorbuje dok originalni oblik kosti ne bude postignut (21).

Po istom principu zarastaju trepanacijski defekti i prekidi kontinuiteta koštanog tkiva druge etiologije. Zarastanje koštanog tkiva može potrajati duže u odnosu na prosečno potrebno vreme zarastanja. Različiti faktori mogu dovesti do produženog zarastanja: mehanički (pokretanje fragmenata tokom zarastanja), nekroza kosti, loša lokalna vaskularizacija i lokalne infekcije. Problem koji se isto može javiti tokom ovog procesa je neadekvatan tip zarastanja – zarastanje vezivnim i hrskavičavim tkivom (22).

#### 1.4 Koštani zamenici-skafoldi

Prema poretku koštani zamenici se dele na:

1. Autologne: dobijaju se od iste biološke vrste, iste genetske konstitucije;
2. Alogene: dobijaju se od iste biološke vrste ali različite genetske konstitucije;
3. Ksenogene: dobijaju se od druge biološke vrste;
4. Aloplastične materijale: materijali sintetskog porekla.

Autologni koštani zamenici su jedini zamenici koji poseduju osteogene, osteoinduktivne i osteokonduktivne karakteristike (23), što ih čini zlatnim standardom u koštanoj rekonstruktivnoj hirurgiji. Osteogeneza podrazumeva sposobnost stvaranja kosti u odsustvu lokalnih osteoprogenitornih ćelija. Osteoindukcija je termin koji označava da su primitivne, nediferencirane i pluripotentne ćelije stimulisane da se razvijaju u osteoblaste koji formiraju kost. Osteokondukcija označava svojstvo materijala, skafolda, da omogući rast kosti na njegovoj površini. Osteokonduktivna površina je ona koja dozvoljava produkciju osteoida i njegovu mineralizaciju na svojoj površini ili porama (24). Osteokonduktivno svojstvo autolognim koštanim zamenicima daju hidroksiapatit i kolagen. Osteogeni potencijal imaju ćelije koje okružuju mikroprostore, a faktori rasta unutar koštanog matriksa indukuju produkciju nove kosti. Zbog svog porekla eliminisana je svaka mogućnost imunološke reakcije. U zavisnosti od porekla koštanog autotransplantata razlikujemo dve forme: kortikalni i spongiozni transplantat. Suštinska razlika između ove dve vrste autotransplantata se ogleda u procesu revaskularizacije (25). Krvni sudovi urastaju kroz spongiozni transplantat nakon dva dana od transplantacije (26, 27), dok u slučaju kompaktne kosti revaskularizacija započinje oko šest dana nakon transplantacije (28). Kombinovani, kortikospongiozni graftovi čine spoj pozitivnih karakteristika oba tipa grafta ističući s jedne strane dobru mehaničku stabilnost kortikalne kosti, a s druge strane brzu revaskularizaciju spongiozne kosti. Nedostaci autolognih koštanih graftova su postojanje sekundarnog hirurškog polja, opasnost od povrede neurovaskularnih elemenata i poremećaja zarastanja sekundarnog polja, nepredvidiva stopa resorpcije, ograničena količina dostupnog grafta i produženo trajanje hirurške intervencije.

Alogeni koštani zamenici humanog porekla se najčešće dobijaju od kadavera i tada su dostupni preko banaka tkiva. U koštanoj regeneraciji se najčešće koriste sledeće dve forme: zamrznuti sušeni koštani alotransplantat (engl. *freeze-dried bone* – FDB) i demineralizovani zamrznuti sušeni koštani alotransplantat (engl. *demineralized freeze dried bone* – DFDB). Alogeni transplantat može da se dobije od spongiozne ili kortikalne kosti, i može imati formu bloka ili granula. Prilikom pripreme FDB čuvaju se i neorganske i organske komponente koštanog matriksa. Organsku komponentu čini između ostalog i koštani morfogenetski protein (BMP), ali se nalazi u hidroksiapatitnoj strukturi što iziskuje aktivnost osteoklasta kako bi došlo do oslobađanja faktora rasta. S obzirom na prisustvo jako male količine faktora rasta u graftu, FDB ima prevashodno osteokonduktivna svojstva dok su osteoinduktivna neznatna (29). Demineralizacijom FDB dobija se DFDB. Uklanjanjem mineralne komponente BMP se eksponira i ispoljava trenutni osteoinduktivni potencijal (30, 31). Međutim, procesom demineralizacije DFDB gubi na mehaničkim karakteristikama i na osteokonduktivnosti.

Ksenogeni koštani zamenici sastoje se od koštanih minerala životinjskog porekla ili od minerala koji vode poreklo od kalcifikovanih korala ili algi. Koštani zamenici mogu voditi poreklo od različitih životinjskih vrsta kao što su goveda, svinje, konji, rakovi. Materijal koji se komercijalno najčešće koristi u istraživanjima i praksi jeste neorganska kost govedeg porekla pod nazivom Bio-oss<sup>®</sup> (*Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland*). Komercijalni anorganski deproteinizirani goveđi substituent Bio-oss<sup>®</sup> predstavlja zlatni standard kada su u pitanju ksenografti za regenerativnu stomatologiju širom sveta (32, 33), zbog svojih osteokonduktivnih svojstava i biofunktionalnosti koja vodi ka efikasnoj i pouzdanoj regeneraciji kosti. Hemijski sastav Bio-oss<sup>®</sup> je skoro identičan sastavu humanog koštanog mineralizovanog matriksa, sa ukupnom poroznošću od oko 75% koju čini bimodalna distribucija pora. Sistem povezanih makropora služi kao potka za migraciju i fiksiranje osteoblasta za površinu biomaterijala (34). U kliničkoj praksi značajna je dugoročna stabilnost ovih materijala unutar humanog tkiva. Resorpcija augmentacionog materijala nije neophodna da bi došlo do formiranja nove kosti (35), ali je poželjna nakon nekog perioda.

Aloplastični materijali se dobijaju sintetskim putem i poseduju u suštini samo dve karakteristike idealnog koštanog transplantata: oseointegrativnost i osteokonduktivnost.

Idealni aloplastični materijal trebalo da bude i biokompatibilan, da podleže procesu remodelovanja i da podržava stvaranje nove kosti dajući potporu okolnom tkivu. Ovi materijali bi trebalo da poseduju sličnu čvrstoću kao i kompaktna/spongiozna kost koju zamenjuju (36). U odnosu na hemijski sastav svrstani su u tri grupe: kalcijum-fosfate, bioaktivno staklo i polimere. Prema strukturi aloplastični materijali mogu biti porozni i neporozni (37).

#### 1.4.1 Dentinski opiljci

Uprkos širokoj upotrebi komercijalnih koštanih zamenika nedavno je veliko interesovanje usredsređeno na autologne materijale osobina sličnih kosti kao pogodnim substratima za regeneraciju kosti alveolarnih defekata. Međutim, iako se autogeni koštani transplantati koriste u stomatologiji, glavni nedostaci ovog postupaka su ograničena dostupnost koštanog tkiva i potreba za uzimanjem grafta na udaljenom mestu (38). Zajedno sa ostalim nedostacima proizašlim iz alogenske transplantacije, poput mogućih infekcija i nedostatka osteointegracije sa tkivima domaćina, istraživači su bili podstakuti da traže nova rešenja. Upotreba materijala dobijenih od zuba nedavno je privukla veliko interesovanje zbog široke dostupnosti ekstrahovanih zuba (32). Ovaj tip koštanih zamenika se može svrstati u autologne koštane zamenike, jer je donor materijala sam pacijent.

Kost i dentin su mineralizovana tkiva sličnog hemijskog sastava. Sastoje se od 18% kolagena, 2% nekolagenskih proteina (NCP), 70% hidroksiapatita (HAP) i 10% vode. Demineralizovani dentin nakon obrade, u obliku praha ili bloka sadrži 5%-10%, odnosno 10%-30% minerala. Rendgenskom difrakcionom analizom otkrivene su četiri vrste kalcijum fosfata u dentinu, uključujući HA, beta-trikalcijum fosfat (TCP), amorfni kalcijum fosfat i oktakalcijum fosfat, koji se sastoje od niskokristalnog HA sa relativno niskim odnosom Ca/P. Količina inkorporiranog kalcijuma i fosfora u demineralizovanom dentinu vrlo je slična onoj u autogenoj kortikalnoj kosti (39, 40, 41). Matriks dentinskih opiljaka je prepun faktorima rasta, kao što su: koštani morfogenetski proteini (BMP), transformišući faktor rasta- $\beta$ , faktor rasta sličan insulinu i osnovni faktor rasta fibroblasta. Nekoliko NCP, kao što su osteokalcin (OCN) i osteopontin (OPN), uobičajeni su u

kostima i dentinu, dok je dentinski fosfoprotein nekolagenski protein koji se nalazi isključivo u dentinu (42, 43).

Istraživanja na temu osteoinduktivnih svojstava dentina započela su izveštajem iz 1967. Nakon što je Urist izneo teoriju da je BMP u dentinu i kosti glavni stimulans za osteoinduktivna svojstva, *Jeomans* i *Urist* (44) su prvi pokazali regenerativna svojstva autogenog demineralizovanog dentina (DDM). Humani DDM je skafold koji pored mineralne faze sadrži kolageni matriks i osteoinduktivne faktore rasta, i to ga čini mogućom zamenom za kost. U kliničkoj praksi, skafoldi na bazi DDM su prerađeni, te im je struktura acelularna i nanoporozna. Trenutno je DDM dostupan u dva oblika, u prahu i u bloku. Važnost DDM geometrije su već naglasili drugi istraživači (45). DDM prah se priprema drobljenjem dentina u čestice veličine 300–800  $\mu\text{m}$  i pri toj veličini poseduje mikropore porekla dentinskih tubula (prečnik: 1.0–3.0  $\mu\text{m}$ , približno 50.000 tubula/ $\text{mm}^2$ ) (39). Ove pore su premale za infiltraciju ćelija i njihovo urastanje. Umesto toga, uvećani dentinski tubuli i razlabavljeni matriks kolagena nakon prethodne demineralizacije mogu poslužiti kao kanali za oslobađanje proteina koji su neophodni za rast i diferencijaciju osteoblasta, a takođe poboljšavaju površinsku mikroteksturu kako bi se povećala apsorpcija dentina za krv ili druge telesne tečnosti (46, 47).

Demineralizovani dentinski matriks je u oba svoja oblika pokazao odlične rezultate kada su u pitanju pretklinička in vivo istraživanja. *Gomez* i sar. (48) su implantirali slajsove autogenog DDM u parijetalnu kost zečeva, i time stimulisali stvaranje nove kosti. DDM se potpuno ugradio u novoformirano koštano tkivo, a nakon remodelovanja kosti potpuno se resorbovao. *Togari* i sar. (49) su dokazali novoformiranu kost u defektima lobanje pacova nakon implantacije pojedinačnih govedih DDM granula unutar defekta. Zaključili su da DDM služi kao skafold okolnom tkivu za regeneraciju kosti indukujući visok stepen stvaranja nove kosti ubrzo nakon ugradnje.

#### 1.4.2 Aloplastični biomaterijali u koštanom tkivnom inženjerstvu

Inženjering koštanog tkiva je složen i dinamičan proces koji podrazumeva migraciju i regrutovanje osteoprogenitornih ćelija, nakon čega sledi njihova proliferacija, diferencijacija i formiranje koštanog matriksa zajedno sa remodelovanjem. Veliki

napredak u koštanom inženjeringu postignut je primenom skafolda od aloplastičnih materijala (Tabela 1.). Koštani zamenici su obično izrađene od poroznih razgradivih materijala koji pružaju mehaničku potporu tokom regeneracije oštećene ili bolesne kosti (50).

Biomehanički sistem kosti je složen tako da idealan skafold treba da ispunjava sledeće uslove: biokompatibilnost, osteokonduktivnost, osteoinduktivnost, sposobnost angiogeneze. Biokompatibilnost je jedan od primarnih zahteva za koštane skafolde. Biokompatibilnost podrazumeva sposobnost skafolda da podrži normalnu ćelijsku aktivnost bez lokalnih i sistematskih toksičnih efekata na tkivo domaćina (51). Idealan skafold mora posedovati mogućnost osteokonduktivnosti, i tako omogućiti koštanim ćelijama da se lepe, razmnožavaju i formiraju matriks na svojoj površini i u porama. Skafold bi takođe trebao da bude u stanju da izazove stvaranje nove kosti putem biomolekularne signalizacije i regrutovanjem okolnih progenitornih ćelija. Ovo svojstvo materijala poznato je kao osteoindukcija. Štaviše, idealan skafold mora da omogući formiranje krvnih sudova u implantatu ili oko njega u roku od nekoliko nedelja nakon implantacije kako bi se podržao aktivan transport hranljivih materija i kiseonika (52).

Mehanička svojstva idealnog skafolda moraju odgovarati svojstvima kosti domaćina, a veoma je važan i pravilan prenos opterećenja. Mehanička svojstva variraju od spongiozne do kortikalne kosti. Jungov modul kortikalne kosti je između 15 i 20 GPa, a spongiozne kosti između 0,1 i 2 GPa. Čvrstoća na pritisak varira između 100 i 200 MPa za kortikalnu kost, i između 2 i 20 MPa za spogioznu kosti. Velike razlike u mehaničkim svojstvima i geometriji otežavaju projektovanje „idealnog koštanog skafolda“ (52).

Bioresorpcija je još jedan ključni faktor u regeneraciji koštanog tkiva (51). Idealan skafold bi trebalo vremenom da se degradira *in vivo*, pri kontrolisanoj brzini resorpcije, i pritom da stvara prostor za rast novog koštanog tkiva. Poželjno vreme resorpcije varira u zavisnosti od mesta primene. Naravno, zbog svega gore navedenog dizajn i proizvodnja poroznih skafolda idealnog sastava ključan je izazov u TI (52, 53).

S obzirom da je kost prirodno napravljen kompozit od kolagenskih vlakana u koju su ugrađeni i dobro raspoređeni nanokristalni neorganski materijali (54, 55). Postoji sve veća potražnja za materijalima za regeneraciju kosti zbog različitih stanja posle kojih

dolazi do gubitka koštanog tkiva, kao što su infekcije kosti, tumori i gubitak kosti usled traume (56). Osteoinduktivni, odnosno „pametni“ biomaterijali imaju sposobnost da indukuju ektopično formiranje koštanog tkiva, dajući signal okolnom tkivu koje okružuje defekt da formira kost (57, 58, 59). Iako fiziološki mehanizam ove pojave nije u potpunosti razjašnjen, dobro je poznato da ovi materijali imaju veliki potencijal za regeneraciju koštanog tkiva.

Tabela 1. Podela aloplastičnih materijala po sastavu.

	<b>Najpoznatiji predstavnici</b>
<b>Kalcijum-fosfati</b>	HAP, trikalcijum fosfat
<b>Bioaktivno staklo</b>	Bioglass <sup>®</sup> 45S5 i S53P4
<b>Polimeri</b>	<b>Prirodni:</b> kolagen, hijaluronska kiselina <b>Sintetski:</b> polifumarati, polilaktička kiselina (PLA), poliglikolna kiselina (PGA)

Kalcijum fosfatni aloplastični biomaterijali su naročito zanimljivi u kliničkoj primeni. Kalcijum fosfat je prisutan u kostima u oblik kristala hidroksiapatita (HAP), koji obezbeđuje čvrstoću kosti. Komponente sintetskog HAP su slične onima u kosti. Prisustvo HAP u skafoldu poboljšava osteoinduktivna svojstva koštanog zamenika, ali i poboljšava osteokonduktivna svojstva između skafolda i koštanih ćelija (60). HAP se često koristi za inženjering koštanog tkiva, augmentaciju kosti, i oblaganje implantata (61, 62, 63).

Skafoldi zasnovani na HAP se široko koriste u kliničkoj praksi i pokazuju zadovoljavajuću reparatornu funkciju što potvrđuju brojne studije (64, 65). *Zu* i saradnici (66) su procenjivali osteokonduktivna svojstva nano-HAP materijala i njegovu potencijalnu primenu u saniranju koštanih defekata. Autori su dokazali su da nano-HAP potencijalno može da se koristi za lečenje koštanih defekata. Ponašanje nanočestica HAP u defektu više liče na karakteristike prirodnog HAP tokom biomineralizacije u odnosu na karakteristike većih čestica HAP koje su uobičajeno koriste u istraživanjima (67). Nano-HAP promoviše adheziju osteoblasta, proliferaciju i sintezu alkalne fosfataze, i tome

dovodi do brze nadohnade koštanog tkiva (68). HAP keramika se rasprostranjeno koristi kao zamena za prirodnu kost zbog njene biokompatibilnosti, osteoprovodljivosti i afiniteta ka adheziji u koštanom tkivu.

Treba spomenuti i poroznost kao neophodno svojstvo skafolda. Međusobna povezanost i veličina pora treba da bude najmanje 100  $\mu\text{m}$  u prečniku, kako bi se omogućila difuzija esencijalnih hranljivih materija i kiseonika neophodnog za preživljavanje ćelija (69). Međutim, utvrđeno je da je optimalna veličine pora za rast koštanog tkiva u rasponu od 200–350  $\mu\text{m}$  (70). Nedavne studije su ipak pokazale da skafoldi sa porama različitih dimenzija, koje uključuju mikro, mezo i makro poroznost mogu imati bolje performanse nego samo makro porozni skafoldi (71). Nažalost, poroznost smanjuje mehanička svojstva i povećava složenost proizvodnje materijala. Istraživači koji su istraživali porozne skafolde poredili su polimere, keramiku, kompozite i metale (52, 72). Čvrstoća biokeramičkih materijala odgovara kortikalnoj kosti, različiti polimeri spongioznoj kosti, a keramičko-polimerni kompozitni skafoldi su obično slabiji od kosti. Porozni metalni zamenici ispunjavaju mehaničke zahteve kosti, ali ne obezbeđuju neophodnu integraciju implantata i tkiva (72).

#### 1.4.2.1 Porozni materijali

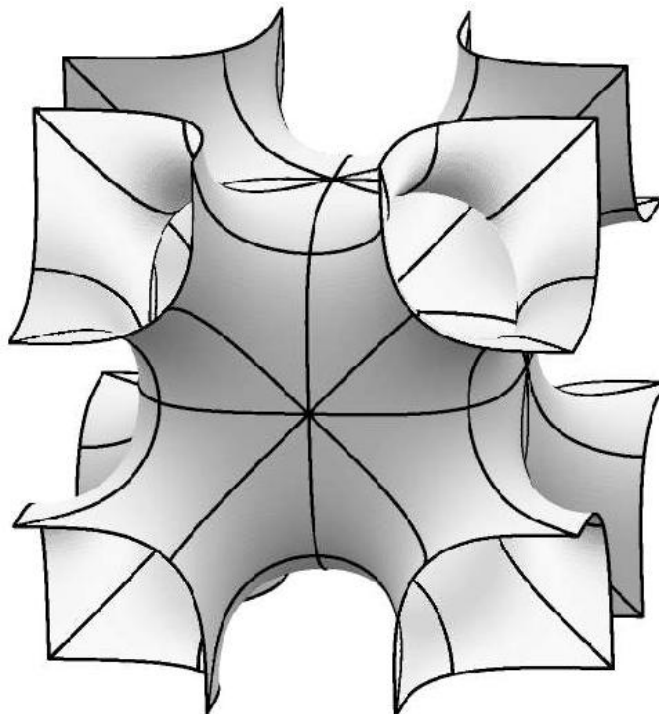
Porozni materijali izazvali su veliko interesovanje naučnika i industrije zbog različitih mogućnosti primene. Sa medicinskog stanovišta ovi materijali su zanimljivi zbog mogućnosti primene u TI. Uopšteno gledano, površina poroznog materijala je veća od površine analognog neporoznog materijala. Ovakvi materijali imaju veliku specifičnu površinu, koja predstavlja odnos ukupne površine materijala i mase, i definisana je u  $\text{m}^2/\text{g}$ . Zbog činjenice da se katalizovane hemijske reakcije u osnovi dešavaju na površini ili na granicama faza, veća površina bi, teoretski, direktno podlegla poboljšanoj reaktivnosti. U praksi to ipak ne mora uvek biti tako, te se mogu pojaviti različite vrste ograničenja koje se moraju uzeti u obzir. Osim površine, druge važne karakteristike poroznih čvrstih materija su kristaliničnost ako postoji, raspodela veličina pora i hemijska struktura čestica. Idealnom poroznom materijalu bi ove osobine trebalo prilagoditi prema potrebama njegove buduće aplikacije. Da bi bio komercijalno zanimljiv, takav materijal



mora biti jeftin i visoko stabilan za regeneraciju. Materijali na bazi silikata pokazuju takve osobine i stoga su našli široko polje industrijske primene (73).

Prema IUPAC (engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*) definiciji (74) mikropore su pore prečnika ispod 2 nm, mezopore su prečnika između 2 i 50 nm i makropore imaju prečnike veće od 50 nm. Oslanjajući se na ovu definiciju, ovi porozni materijali se mogu označiti kao čmaterijali u čvrstom stanju sa određenim stepenom poroznosti.

Mezoporozni materijali su dobili značajnu pažnju zbog njihovih strukturnih karakteristika, koje su pokazale prednosti u poređenju sa drugim proučavanim materijalima (75). Mezoporozni materijali silicijum dioksida su uređeni sistemi sa velikom specifičnom površinom i definisanim prečnikom pora. *Zao i sar.* (76, 77) istraživali su sintezu različitih mezoporoznih silikatnih materijala tipa SBA (engl. *Santa Barbara Amorphous*), korišćenjem nejonskih kopolimera kao šablona. SBA mezoporozni silicijum dioksid ima pore dimenzija 20–300 Å, debele zidove pora i visoku stabilnost. Među SBA-tipom silikatnih materijala, SBA-16 smatra se najinteresantnijim mezoporoznim materijalom, jer sadrži veličinu pora 5–15 nm, sa 3D kubnim rasporedom istih, koja odgovara *Im3m* grupi simetrije objekata u prostoru (Slika 1.). To znači, da svaka mezopora ima osam najbližih suseda međusobno povezanih, što olakšava difuziju molekula. Oni deluju kao pogodan nosač za razne supstance zbog velikih pora, visoke hidrotermalne stabilnosti, relativno jednostavne sinteze i obećavajući su materijal za velik raspon primena, između ostalih i za koštanu regeneraciju (78).



Slika 1. 3D prikaz mezoporozne strukture SBA-16. Preuzeto od *Gobin*, 2006 (73).

### 1.5 Faktori rasta

Faktori rasta su signalni molekuli koji diferenciraju ćelije tokom razvojnih i regenerativnih procesa. Po strukturi su proteini koji regulišu ćelijski odgovor i ponašanje. Faktora rasta koji su uključeni u regeneraciju kosti su faktor rasta fibroblasta (FGF), koštani morfogenetski protein (BMP), vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF), faktor rasta izveden iz trombocita (PDGF) i plazma bogata trombocitima (PRF) (79).

Isporuka egzogenih faktora rasta, u svrhu poboljšanja koštane regeneracije, do specifičnih anatomskih mesta je otežana lošom penetracijom u tkivo i nekontrolisanom migracijom u okolno tkivo (80, 81). Štaviše, faktori rasta se isporučuju na mesta povrede tokom destruktivne faze zarastanja, te su izloženi inflamatornoj sredini koja je hipoksična i naseljena neutrofilima i makrofagima; kao rezultat toga nezaštićeni faktori rasta imaju *in vivo* poluživot trajanja jedne minute (82). Savremene metode isporuke faktora rasta na

skafoldima, pokušavaju da prevaziđu ove nedostatke i omogućće kontrolisano oslobađanje faktora.

## 1.6 Matične ćelije

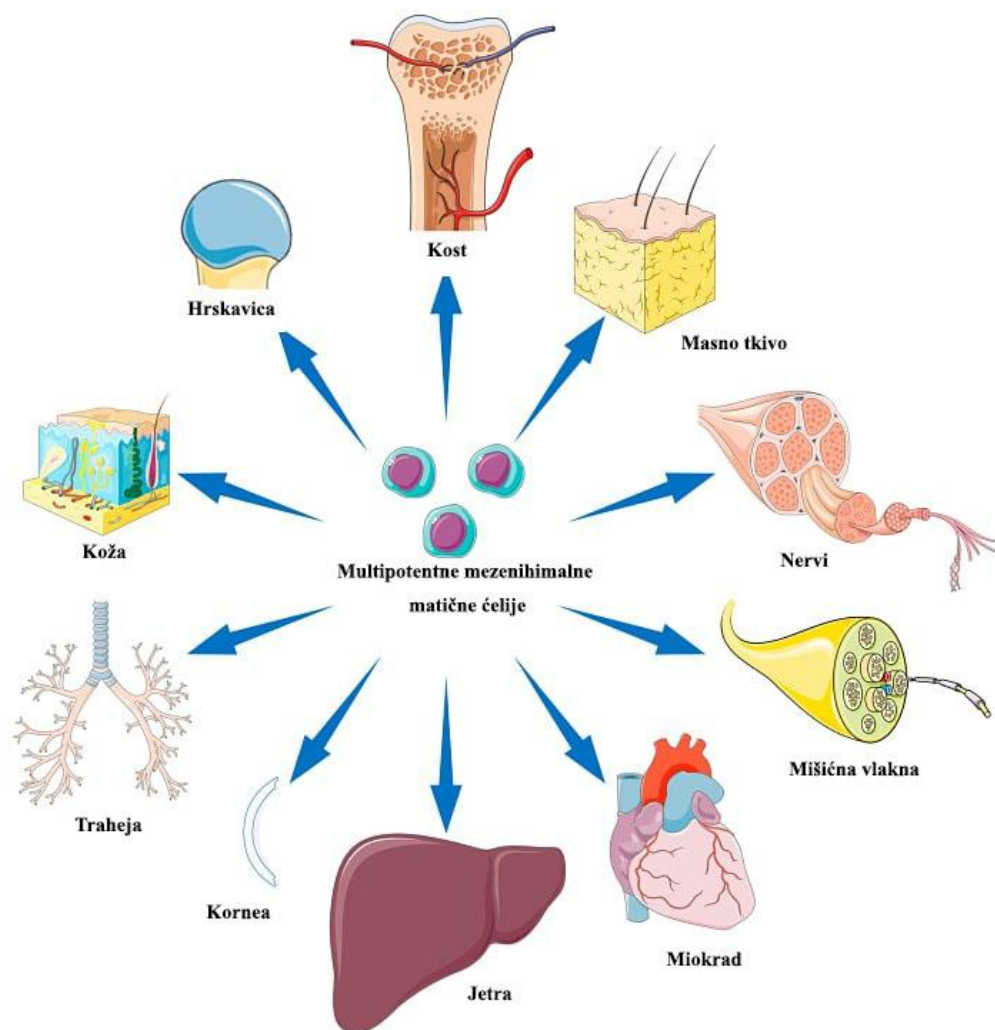
### 1.6.1 Pojam matičnih ćelija

Jedan od pionira na polju matičnih ćelija mezenhimalnih tkiva kod adultnih organizama je *Friendštejn*. On je među prvima dao teoriju o tome da je koštana srž rezervoar matičnih ćelija. Njegovo istraživanje rađeno šezdesetih godina prošlog veka ukazalo je na postojanje druge populacije matičnih ćelija u koštanoj srži, pored hematopetskih ćelija, koja je stvarala prekursore kostiju. Naime, ektopičnom transplantacijom koštane srži u kapsulu bubrega ćelije su proliferisale i stvarale kost (83).

Izraz „mezenhimalne matične ćelije“ predložio je *Kaplan* 1991. godine zbog njihove sposobnosti da se diferenciraju u više vrsta ćelija koje čine vezivno tkivo u mnogim organima (84). Danas u literaturi ima mnogo sinonima za MSC, uključujući multipotentne stromalne ćelije, stromalne ćelije srži, mezodermalne matične ćelije, mezenhimalne stromalne ćelije i mnoge druge. *Kaplan* je preporučio preimenovanje ovih ćelija u „signalne medicinske ćelije“ zbog mehanizma njihovog terapijskog dejstva nakon transplantacije, za koji se veruje da se zasniva uglavnom na faktorima koji olakšavaju regenerativne procese (85).

Zbog pristune kontroverze oko nomenklature, stepena matičnosti i karakteristika ćelija koje je otkrio *Friendštejn*, Međunarodno društvo za ćelijsku terapiju (ISCT, engl. *International Society for Cell Therapy*) 2006. godine objavilo je kriterijume koji definišu MSC, i oni su prihvaćeni na nivou globalne naučne zajednice. Ove smernice preporučuju upotrebu naziva multipotentne mezenhimalne stromalne ćelije; međutim, naziv „mezenhimalne matične ćelije“ je i dalje ostao najčešće korišćen. Prva smernica podrazumeva da ćelije rastu *in vitro* u standarnim uslovima gajenja ćelija i da su sposobne za adhezu na plastičnu posudu. Ćelije humanog porekla bi trebalo da pozitivno ekspimiraju površinske molekule CD105, CD73 i CD90, odnosno negativno ekspimiraju CD45, CD34, CD14 ili CD11b, CD79a ili CD19 i HLA-DR. Takođe, ove

ćelije moraju da imaju sposobnost diferencijacije ka osteoblastima, adipocitima i hondroblastima (Slika 2.) (86, 87).



Slika 2. Potencijal mezenhimalnih matičnih ćelija ka diferencijaciji u različita tkiva. Preuzeto i prilagođeno iz *Han i sar.*, 2019 (88).

Ćelije koje ispunjavaju kriterijume za MSC mogu biti izolovane iz različitih tkiva u svim razvojnim fazama (fetus, mlade, odrasle i starije osobe), ali je primećeno da postoje velike razlike između dobijenih MSC iz različitih izvora (89, 90). Koštana srž je istorijski bila prvi izvor iz kojeg su dobijene MSC; međutim, vremenom su zabeleženi slučajevi o mogućnosti izolacije i iz drugih tkiva sa sličnim svojstvima. Mezenhimalne ćelije se dobijaju i iz tkiva i sekreta, kao što su masno tkivo, periferna krv, zubna pulpa,

menstrualna krv, endometrijum, mleko majki, kao i iz fetalnih tkiva kao što su plodova voda, membrane, horionske resice, posteljica, pupčana vrpca (91).

MSC fetalnog porekla u poređenju sa ćelijama izolovanim iz tkiva odraslih osoba odlikuju se bržom stopom proliferacije, kao i većim brojem pasaža do *in vitro* znakova starenja. MSC dobijene iz koštane srži, masnog tkiva i pulpe zuba sposobne su da stvore veći broj kolonija u kulturi CFU-F (CFU-F, engl. *colony-forming unit formation*), što indirektno ukazuje na veći stepen njihove matičnosti. Takođe su opisane razlike u sposobnosti diferencijacije MSC dobijenih iz različitih izvora. Primećen je nedostatak diferencijacije MSC izolovanih iz krvi pupčane vrpce prema adipocitima, kao i veća tendencija MSC iz koštane srži, masnog tkiva i pulpe zuba da se diferenciraju prema osteoblastima (92).

### 1.6.2 Klasifikacija matičnih ćelija zuba

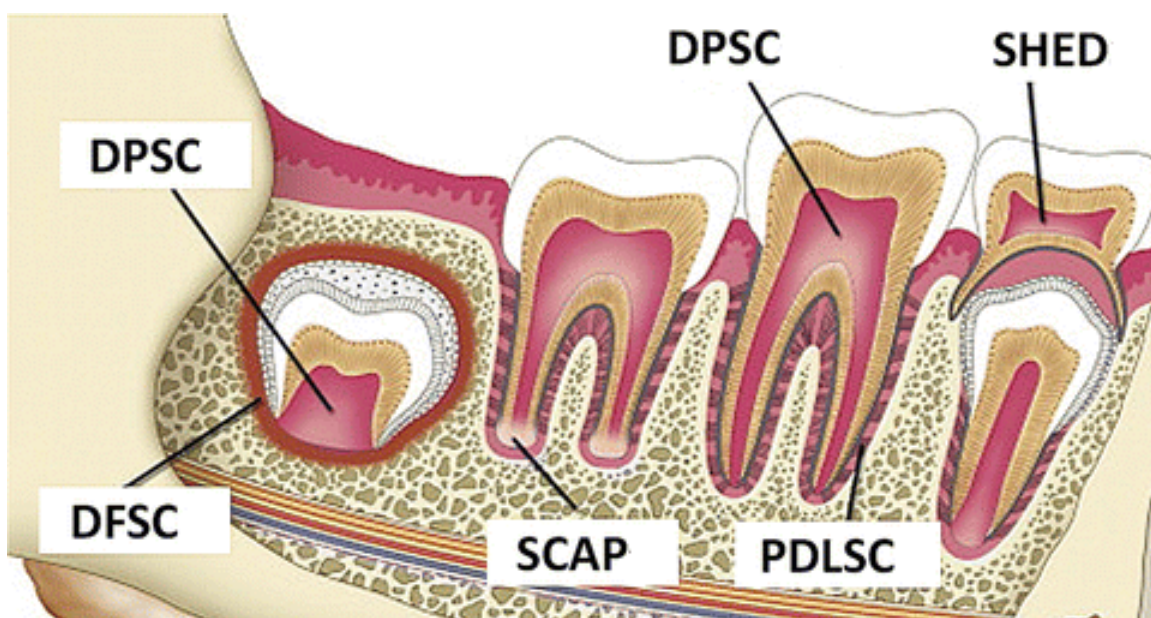
Matične ćelije porekla zubnog tkiva se uzimaju u obzir u terapijske svrhe zbog njihove raspodele u tkivu klice zuba tokom razvoja. Uloga ovih ćelija u klici zuba usko je povezana sa njegovim razvojem koji započinje u gornjoj i donjoj vilici embriona (93, 94, 95, 96). Klica zuba sastoji se od dva različita tkiva: mezoderma i epitela. Oba tkiva sadrže nediferencirane ćelije sa informacijama za razvoj funkcionalnog zuba (12). Obe vrste tkiva sa nediferenciranim ćelijama potrebne su za stvaranje zuba (97, 98, 99). Tokom daljeg razvoja zuba, nastaju tri različita tkiva; iz zubnog mezoderma (zubni folikul, zubna papila) i iz zubnog epitela (gledni organ).

U razvoju zuba svako od ovih tkiva ima specifičnu funkciju (93, 96). Na primer, gledni organ sadrži epitelne matične ćelije (100). Ove epitelne matične ćelije su prekursorne ćelije za razvoj ameloblasta koji proizvode gleđ krunice zuba. Nažalost, nicanjem i erupcijom zuba gubi se potencijal epitelnih matičnih ćelija. Dakle, nediferencirane matične ćelije ameloblasta nisu dostupne za regeneraciju zubne gleđi i inženjering celog zuba (101).

Somatske zubne matične ćelije se nalaze u drugim zubnim tkivima, i sve su poreklom mezoderma (102). Iz postnatalnih zuba mogu se dobiti dva zubna mezodermalna tkiva: zubna pulpa i parodontalni ligament. Iako se gledni organ izgubi

nakon nicanja zuba, dva mezodermalna tkiva klice zuba, apikalna zubna papila i zubni folikul, mogu se dobiti iz neizniklih trećih molara (8, 103). Zanimljivo je da su ova tkiva klice zuba jedina dostupna embrionalna tkiva kod zdravih odraslih ljudi. Oni su takođe izvor za razvoj zubne pulpe (apikalna zubna papila) i parodontalnog ligamenta (zubni folikul).

Stoga, iz zubnih tkiva možemo dobiti sledeće matične ćelije: matične ćelije parodontalnog ligamenta (PDLSC), matične ćelije iz apikalne papile (SCAP), matične ćelije zubnog folikula (DFCS), matične ćelije zubne pulpe (DPSC) i matične ćelije zubne pulpe mlečnih zuba (SHED) (Slika 3.).



Slika 3. Matične ćelije porekla zubnih tkiva mogu biti različitog porekla. Preuzeto i prilagođeno iz *Kodžaste i sar.*, 2016 (104).

### 1.6.2.1 Matične ćelije parodontalnog ligamenta

Parodontalni ligament (PDL) povezuje zub preko cementa sa alveolarnom kosti. Ovaj ligament za pričvršćivanje zuba sadrži matične ćelije parodontalnog tkiva (PDLSC) zadužene za regeneraciju i homeostazu parodonticijuma (105). Izolovane PDLSC eksprimiraju tipične markere mezenhimskih matičnih ćelija kao što su STRO-1 i CD105

(106). Iako su matične ćelije zubne pulpe DPSC i PDLSC slične mezenhimalne ćelije, PDLSC su jedinstvene jer eksprimiraju transkripcioni faktor specifičan za tetivne ćelije. Štaviše, izolovane PDLSC se diferenciraju u parodontalno tkivo nakon transplantacije u imunokompromitovane miševе. PDLSC pri transplantaciji formiraju strukture slične Šarpejevим vlaknima, koje povezuju alveolarnu kost sa cementom zuba. Seo i sar. su pokazali da humani PDLSC regenerišu parodontalne defekte kod imunokompromitovanih miševa (106). PDLSC zato predstavljaju jedinstven izvor za autologno lečenje parodontalnih oboljenja u budućnosti. Parodontopatija je bolest infektivnog porekla, međutim funkcionalni PDLSC se mogu izolovati i iz upaljenih PDL tkiva (ihPDLSC) (107). Park i sar. pokazali su da ihPDLSC i PDLSC zdravih dobrovoljaca eksprimiraju markere mezenhimskih matičnih ćelija i samim tim da imaju sličan multipotentni potencijal za diferencijaciju ćelija.

### 1.6.2.2 Matične ćelije apikalne papile

Za razliku od glednog organa, mezodermalna tkiva klice zuba ostaju dostupna nakon nicanja zuba, i mogu se dobiti iz neizniklih trećih molara (103). Zubna apikalna papila je takođe poznata i kao apikalno jastuče (108). Ovo tkivo prianja na vrh nerazvijenog korena impaktiranog trećeg molara, koji se rutinski vadi kod adolescentnih pacijenata zbog nedostatka prostora za njegovo nicanje. Zbog visokog sadržaja proteoglikana, apikalna papila se može histološki odvojiti od zubne pulpe (108, 109). Matične ćelije iz ovog tkiva izolovane su u poslednjoj deceniji (SCAP; matične ćelije iz apikalne papile) (110), uprskos oskudnom broju u tom tkivu (111). SCAP se smatra delom razvojnog pulpo-dentinskog kompleksa, ali je takođe neophodan za razvoj alveolarne kosti i celog korena zuba (110, 111). Ove matične ćelije eksprimiraju nizak nivo odontoblastnih markera kao što su dentinski sialoprotein (DSP) i vanćelijski fosfoglikoproteinski matriks (MEPE) ali imaju odličan potencijal za diferencijaciju. Nakon transplantacije SCAP na nosaču HA/TCP u imunokompromitovane miševе, ćelije se diferenciraju ka tipičnim ćelijama pulpo-dentinskog kompleksa (110). Ovo ukazuje da su SCAP slične progenitornim ćelijama za sva tkiva pulpo-dentinskog kompleksa, ali su nediferentovanije od, naprimer, izolovanih DPSC iz izniklog zuba (109).

### 1.6.2.3 Matične ćelije iz zubnog folikula i upaljenih periapikalnih cista

Na početku razvoja korena zuba, Hertvigova košuljica formira se kao produžetak glednog organa. Ova tanka ovojnica ćelija odvaja mezenhimsko tkivo zubne klice od mezenhimalnog pulpo-dentinskog kompleksa. Ovo tkivo poznato je kao zubna vreća ili folikul koji okružuje klicu zuba. Zubni folikul je neophodan kako za nicanje zuba, tako i za razvoj korena zuba (112, 113). Sastoji se od mezenhimalnih progenitornih ćelija parodontijuma, čiji su deo alveolarna kost, PDL i cement. Zubni folikul sadrži i epitelne ćelije, koje vode poreklo od ćelija Hertvigove košuljice, koja nestaje tokom razvoja korena zuba (112). Zubni folikul je sličan jastučićima apikalne papile jer se može izolovati iz impaktiranih umnjaka. Sadrži multipotentne ektomezenhimalne matične ćelije koje su poznate kao prekursorske ćelije zubnog folikula, matične ćelije zubnog folikula ili ćelije zubnog folikula (engl. *dental follicle cells*, DFC). Ove ćelije imaju sličnu morfologiju kao DPSC i takođe eksprimiraju tipične markere progenitornih matičnih ćelija kao što su NESTIN, NOTCH-1, CD44, CD105 i STRO-1 (114, 115). Ukoliko se DFC održavaju u kulturi bez prisustva seruma u medijumu tokom dužeg vremenskog perioda, one se ponašaju poput neuronskih progenitornih ćelija (116). DFC su multipotentne matične ćelije, ali pre svega ćelije prekursora parodontalnog tkiva (114, 115, 116, 117, 118). U *in vitro* uslovima, nakon izlaganja kulture medijumu za osteogenu diferencijaciju, DFC formiraju robusnu strukturu nalik na vezivno tkivo sa mnogim mineralizovanim čvorovima. Ovo tkivo nalik periodoncijumu povremeno je imalo strukture nalik krvnim sudovima (114).

Periapikalne ciste su posledica hroničnih apikalnih infekcija. *Tatullo* i sar. su otkrili matične ćelije inflamiranih periapikalnih cista (engl. *human inflamed periapical cysts stem cells*, HACS) (119). Poznato je da HACS imaju odličan potencijal za neurogenu diferencijaciju (120), međutim potrebne su dodatne studije kako bi se identifikovao sav potencijal HACS za buduće ćelijske terapije.

### 1.6.2.4 Matične ćelije zubne pulpe

Zubna pulpa je vezivno tkivo koje je povezano sa mineralizovanim dentinom. Dentin je porozno tkivo slično kosti koje okružuje zubnu pulpu. Zajedno ova tkiva čine



pulpo-dentinski kompleks. Dentinogenezu pokreću odontoblasti, mineralizujuće ćelije zubne pulpe. Odontoblasti su sposobni da regenerišu manja oštećenja dentinskog tkiva uzrokovana oštećenjem zuba naprimer karijesom. Nediferencirane ćelije zubne pulpe porekla odontoblasta su kao takve već izolovane iz stalnih zuba (DPSC) (12), kao i mlečnih zuba (121). DPSC su ćelije slične fibroblastima. Izolovane ćelije u plastičnim flaskovima za kulturu formiraju kolonije koje demonstriraju njihovu sposobnost samoobnavljanja. Sposobnost samoobnavljanja humanih DPSC dokazana je izolacijom i kultivacijom ljudskih matičnih ćelija prethodno transplantiranih u imunokompromitovane miševce (122). DPSC su uglavnom lokalizovane perivaskularno i na svojoj površini eksprimiraju brojne markere mezenhimskih matičnih ćelija kao što su CD105, CD146, CD44 i Stro-1 (8).

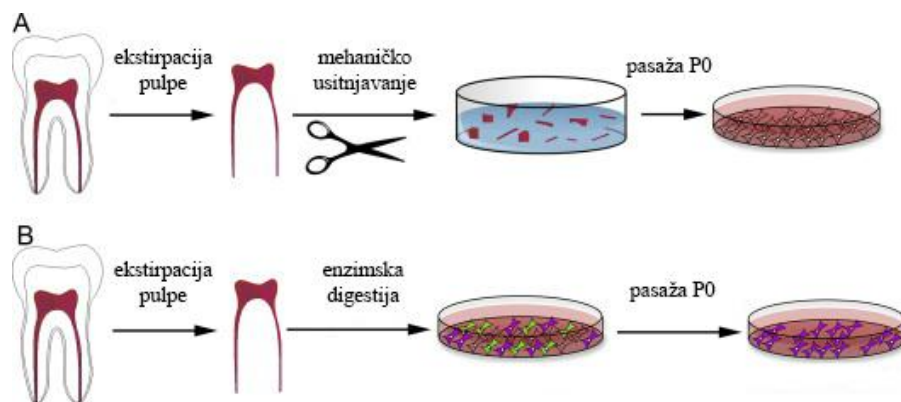
*Tirino* i sar. otkrili su jednu vrstu neobične DPSC. Izolovali su c-kit + / CD34 + / CD45- DPSC ćelijsku populaciju (123, 124). Za razliku od običnih DPSC, prvobitno izolovanih, ove matične ćelije eksprimiraju glikoprotein CD34, koji je tipični marker prekursornih hematopoetskih ćelija. Ove CD34 pozitivne ćelije u kliničkoj primeni su uspele da proizvedu koštano tkivo, mada se obnovljena kost na mestima transplantata u potpunosti razlikovala od normalne alveolarne kosti (125, 126). *Paino* i sar. su uspele da proizvedu vaskularizovano koštano tkivo sa CD34+ DPSC bez upotrebe nosača (127). Iako je sofisticirani metod za izolaciju CD34+ DPSC opisan (128), još uvek nije postignuta masovna klinička upotreba matičnih ćelija (129).

Mezenhimalne matične ćelije su takođe izolovane iz mlečnih zuba čoveka. Ove ćelije su poznate kao SHED (humane matične ćelije eksfolijatnih mlečnih zuba) (130). SHED mogu biti kultivisane kao adherentne ćelije u jednom sloju ili kao neurosfere u formi ćelijskih klastera. Ljudski mlečni zubi značajno se razlikuju od stalnih zuba kada posmatramo njihove razvojne procese, strukturu i funkciju. Dolazi do vremenskog preklapanja između procesa resorpcije korena mlečnih zuba i nicanja stalnih zuba. Proces zamene mlečnih zuba stalnima u proseku traje 7 godina. Zapravo, obe populacije izolovanih ćelija imaju slične karakteristike: morfologiju sličnu fibroblastima, formiranje adhezivnih kolonija i visok proliferativni potencijal *in vitro* (131).

Mlečni zubi se odbacuju fiziološkom smenom zuba (prirodan proces primarne resorpcije korena zuba), zbog čega se prikupljanjem ćelija pulpe mlečnih zuba izbegava svaka vrsta etičkih problema. SHED se lako izoluju iz dobijenog tkiva, a manipulacija i *in vitro* ekspanzija dobijenih ćelija je jednostavna. Istraživanjima su se otkrile različite populacije matičnih ćelija mlečnih zuba, tako da postoje matične ćelije ekfolijantnih humanih mlečnih zuba (SHED), i nezrele matične ćelije zubne pulpe (IDPSC) (132).

Poznato je da se ove ćelije mogu koristiti u terapijske svrhe. Jedna studija pokazala je da SHED imaju osteoinduktivni potencijal dovoljan da popuni kalvarijalni defekt kritične veličine kod miševa (133). SHED su takođe ćelije sa potencijalom za regeneraciju nervnih tkiva, jer su sposobne da prežive i migriraju nakon transplantacije u mozak miša (130).

Nedoumice o tome koji metod izolacije je potrebno koristiti pri dobijanju matičnih ćelija zubne pulpe su dugo postojale (Slika 4.). Dve najčešće primenjivane metode izolacije matičnih ćelija su enzimska digestija tkiva i metoda eksplantacije. Dok se metoda eksplantacije zasniva na plastičnom prijanjanju tkiva i naknadnom izrastanju ćelija iz tog fragmenata tkiva, enzimska digestija uključuje primenu kolagenaze I i *DNAze* u cilju digestije tkiva pulpe da bi se dobila suspenzija pojedinačnih ćelija (134). Obe tehnike su dosad uspešno korišćene u izolaciji matičnih ćelija zubne pulpe, pupčane vrpce i masnog tkiva (12, 134, 135, 136, 137). Istraživanja u cilju određivanja bolje metode izolacije fokusirala su se uglavnom na njihov kasniji potencijal da se diferenciraju u specifičan tip ćelija (134, 138). Navedene studije bavile su se poređenjem njihovog potencijala osteogene, adipogene i hondogene diferencijacije i ne fokusiraju se na druga svojstva matičnih ćelija dobijenih pomoću ove dve metode izolacije.



Slika 4. Izolacija matičnih ćelija zubne pulpe. A) Metoda eksplanta kojom se pulpno tkivo fragmentira i tako kultiviše u medijumu; B) Metoda enzimske digestije kojom se dobija suspenzija pojedinačnih ćelija.

Što se tiče ćelijske morfologije, izdužene ćelije slične fibroblastima primećene su u ćelijskim kulturama prilikom obe metode izolacije. Međutim, čini se da metoda enzimske digestije dovodi do heterogenije kulture, zbog prisustva kockastih i poligonalnih ćelija u njoj (139). Ova zapažanja su primećena i ranije (138) prilikom enzimske izolacije SHED. Objašnjenje za heterogenu ćelijsku kulturu se nalazi u tome da enzimska razgradnja omogućava izolaciju matičnih ćelija sličnih fibroblastima, kao i oslobađanje endotelних ćelija i pericita, dok metoda eksplanta daje jednoličniju populaciju ćelija. Ćelije slične fibroblastima migriraju iz različitih fragmenata tkiva, ostavljajući ćelije koje ne migriraju da se raspadnu unutar njega (12, 122, 134, 140). Zaključno, nisu dokazane nikakve razlike u ćelijskoj morfologiji, stopi proliferacije, ekspresiji markera matičnih ćelija i potencijalu mezenhimalne diferencijacije između ćelija zubne pulpe izolovanih enzimskom digestijom ili metodom eksplanta, kada se te ćelije gaje pod istim uslovima i potiču od istih donora. Obe metode izolacije daju populaciju matičnih ćelija koje su posebno sposobne za diferencijaciju u osteoblaste i hondroblaste, što dovodi do zaključka da ove matične ćelije pružaju obećavajuću strategiju za lečenje povreda i oboljenja kostiju i hrskavice (Tabela 2.) (139).

Tabela 2. Karakteristike različitih tipova matičnih ćelija zuba

Tip ćelija	Poreklo	Težina izolacije	PD	In vitro diferencijalni potencijal	In vivo diferencijalni potencijal
<b>DPSC</b>	Zubna pulpa stalnog zuba	++++	>120	Adipociti, hondrociti, miociti, odontoblasti, osteoblasti, neroni, kardiomiociti, melanociti	Masno, mišićno, koštano, pulpno i dentinsko tkivo
<b>SHED</b>	Zubna pulpa mlečnog zuba	+++	>140	Adipociti, hondrociti, miociti, odontoblasti, osteoblasti, neroni, endotelne ćelije	Koštano, pulpno i dentinsko tkivo
<b>PDLSC</b>	Periodontalni ligament	++++	NP	Adipociti, hondrociti, cementoblasti, osteoblasti, neroni	Periodontalni ligament, cement
<b>SCAP</b>	Apikalna papila	+++	>70	Adipociti, odontoblasti, osteoblasti, neroni	Pulpno i dentinsko tkivo
<b>DFC</b>	Dentalni folikul	++	NP	Adipociti, hondrociti, cementoblasti, odontoblasti, osteoblasti, neroni	Alveolarna kost, periodontalni ligament, cement

+: stepen jednostavnosti izolacije ćelija; PD- brzina umožavanja ćelija (engl. *population doubling*); NP- ne postoji podatak

## 2. CILJEVI I HIPOTEZE

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Izolacija i karakterizacija mezenhimalnih matičnih ćelija zubne pulpe poreklom iz humanih mlečnih zuba koji se nalaze u svojoj fiziološkoj smeni;
2. Određivanje biokompatibilnosti ispitivanih biomaterijala (Bio-oss<sup>®</sup> (Geistlich, Switzerland)-Bio-oss<sup>®</sup>, dentinski opiljci-DO, i SBA/16-HA) i evaluacija ćelijske vijabilnosti nakon kontakta sa njima;
3. Diferencijacija i imunohistološka potvrda osteoblastične transformacije mezenhimalnih matičnih ćelija zubne pulpe gajenih u osteogenom medijumu;
4. Ispitivanje osteinduktivnog potencijala različitih koštanih zamenika na matičnim ćelijama zubne pulpe mlečnih zuba metodom genske ekspresije.

Hipoteze ovog istraživanja su:

1. Ćelije pulpe mlečnih zuba izolovane metodom tkivnog eksplanta ispunjavaju sve neophodne kriterijume da bi bile definisane kao humane mezenhimalne stem ćelije;
2. Ispitivani materijali na bazi hidroksiapatita i dentinski opiljci pokazuju biokompatibilnost na matičnim ćelijama zubne pulpe mlečnih zuba;
3. Matične ćelije gajene u osteogenom medijumu u periodu od tri nedelje se boje pozitivno na osteogene markere imunocitohemije;
4. Izloženost matičnih ćelija zubne pulpe mlečnih zuba ekstraktima ispitivanih materijala dovodi do povećanja stepena ekspresije gena odgovornih za osteogenu diferencijaciju.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1 Prikupljanje i ekstrakcija mlečnih zuba

U istraživanje je bilo uključeno 25 dece oba pola, uzrasta 6 do 10 godina koja su se javila radi ekstrakcije zdravih mlečnih zuba u fiziološkoj smeni na Odeljenje dečije i preventivne stomatologije Klinike za stomatologiju Vojvodine. Roditelji svakog deteta su bili obavešteni usmeno i pismeno o postupku, svrsi i cilju ispitivanja te su potpisali informisani pristanak pre intervencije. Za obavljanje istraživanja i prikupljanja humanog materijala dobijena je saglasnost Etičkog odbora Klinike za stomatologiju Vojvodine broj 01-33/10-2019, kao i saglasnost Komisije za etičnost kliničkih ispitivanja Medicinskog fakulteta Novi Sad, broj 01-39/129/1.

Ekstrakcija zdravih mlečnih zuba u fiziološkoj smeni vršena je u lokalnoj anesteziji uobičajenom stomatološkom metodom. Zubi koji su ulazili u eksperiment su zubi u III i IV fazi resorpcije korena. Ekstrahovani zubi su odmah nakon ekstrakcije smeštani u sterilnu bočicu sa sterilnim fosfatnim puferom (PBS, engl. *phosphate buffered saline*, *Capricorn, Germany*) kome su dodati antibiotici (100 U/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina, *Capricorn, Germany*) i antimikotik (0.25 µg/ml amfotericina B, *Capricorn, Germany*). Obradi zuba i vađenju pulpe se pristupalo najduže 3h nakon ekstrakcije.

#### 3.2 Izolovanje mezenhimalnih ćelija zubne pulpe iz eksfoliranih mlečnih zuba metodom tkivnog eksplanta

Zub je najpre ispran kroz dva rastovra sterilnog PBS (*Capricorn, Germany*) kome su dodati antibiotici (100 U/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina, *Capricorn, Germany*) i antimikotik (0.25 µg/ml amfotericina B, *Capricorn, Germany*). Nakon toga je zubna pulpa pažljivo izvađena pomoću dentalnog ekskavatora i/ili nerv igle, zatim je isprana dva puta u sterilnom PBS (*Capricorn, Germany*) kome su dodati antibiotici (100 U/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina, *Capricorn, Germany*) i antimikotik (0.25 µg/ml amfotericina B, *Capricorn, Germany*). Eksplant zubne pulpe je usitnjen sterilnim hirurškim skalpelom na komadiće veličine 1x1mm, i potom su komadići preneti u T-25 flask u kojem se nalazio kompletan medijum sačinjen od Dulbeko modifikovanog

Iglovog medijuma (DMEM Ham's F-12 sa L-glutaminom, *Capricorn, Germany*) sa dodatkom 15% fetalnog goveđeg seruma (engl. *fetal bovine serum*, FBS, *Capricorn, Germany*), 100 U/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina (*Capricorn, Germany*) i antimikotika (0.25 µg/ml amfotericina B, *Capricorn, Germany*). Ovako pripremljeni tkivni eksplanti zubne pulpe su upotrebljeni za izolovanje mezenhimalnih ćelija zubne pulpe. Prve mezenhimalne ćelije uočene su nakon 5 dana, dok je za prvu tripsinizaciju bio potreban period od tri nedelje inkubacije na 37°C u prisustvu 5% CO<sub>2</sub> (*NU-5500, NuAire, SAD*).

### 3.3 Pasažiranje i krioprezervacija mezenihimalnih ćelija zubne pulpe mlečnih zuba

#### 3.3.1 Subkultivacija primarne ćelijske kulture u jednom sloju

Tripsinizacija ćelija podrazumeva proces odvajanja adherentnih ćelija od dna posude u kojoj su zasejane u cilju presejavanja određenog, manjeg broja ćelija u novu posudu/flask. Iz inkubiranog flaska sa ćelijama koje su dostigle konfluenciju 70-80% je odliven medijum, ćelije su potom isprane u PBS-u (*Capricorn, Germany*), a zatim disocirane sa 1.5ml tripsina/EDTA (*Capricorn, Germany*) koncentracije 0.05%, nakon čega je usledila inkubacija 3-4 minuta u inkubatoru na 37°C tokom koje su se ćelije „odlepile“ od dna flaska i zaokruglile. Dejstvo trispina je inaktivirano dodavanjem kompletnog medijuma u zapremini od 3ml i dobijena suspenzija je presuta u tubu zapremine 15 ml. Ćelijska suspenzija je centrifugirana 7 minuta na 500G (*Eppendorf centrifuge 5702, Germany*). Po zavšetku centrifugiranja supernatant je odliven, a talog je resuspendovan sa 2ml kompletnog medijuma. Ćelije su nakon toga prebrojane u hemocitometru u 0.4% tripan plavom (*Sigma-Aldrich, USA*) i u zavisnosti od potrebe eksperimenta zamrzavane ili zasejavanje u novi flask u svrhu narednog pasažiranja. Medijum u flaskovima je menjan svakih 48 sati narednih 6 dana dok ćelije nisi dostigle konfluenciju od 70-80% za narednu pasažu. Za potrebe istraživanja korišćene su pasaže 4, 5, 6, 7.

### 3.3.2 Brojanje ćelija metodom Tripan-plavim

Za potrebe održavanja ćelijskih linija, broj ćelija i njihova vijabilnost su određeni pomoću testa odbacivanja boje sa 0.4% rastvorom boje tripan plavo (engl. DET- *trypan blue Dye Exclusion Test*). Metoda se zasniva na principu da žive ćelije ne apsorbuju boju, dok se mrtve oboje plavo, jer boja prodire kroz oštećenu ćelijsku membranu. Suspenzija ćelija zapremine 50  $\mu\text{l}$  je razblažena sa 50  $\mu\text{l}$  rastvora boje 0.4% tripan plavo (*Sigma, Aldrich, Darmstadt, Germany*), i potom je 20 $\mu\text{l}$  rastvora ćelija sa bojom apolikovano u hemocitometar (*Neubauerova komora*). Vijabilne ćelije bile su brojane na invertnom mikroskopu (*Leica, Germany*) primenom odgovarajuće formule gde se broj ćelija izražava na mililitar suspenzije:

$$N = N_0 \times 10^4 \times 2$$

gde je N = ukupan broj živih ćelija u 1ml suspenzije;  $N_0$  = broj živih ćelija izbrojan po kvadrantu komore hemocitometra; 2 = faktor razblaženja;  $10^4$  = korekcionni faktor (dubina komore i zapremina u ml).

### 3.3.3 Zamrzavanje ćelija

Tripsinizirane i prebrojane ćelije predviđene za zamrzavanje su centrifugirane 7 minuta na 500G (*Eppendorf centrifuge 5702, Germany*). Nakon odlivanja supernatanta, ćelije su resuspendovane u FBS (*Capricorn, Germany*) i 10% dimetil-sulfoksidom (engl. *dimethylsulfoxide, DMSO, Sigma, St. Louis, Mo., SAD*) i tako zamrznute u prethodno obeleženim kriovijalama na  $-80^\circ\text{C}$  (*M80, Ara, Korea*). Nakon 48 sati kriovijale su transportovane u kanister sa tečnim azotom. Broj ćelija u 1ml medijuma za zamrzavanje je bio oko  $1.5 \times 10^6$ .

### 3.3.4 Odmrzavanje ćelija

Kriovijale sa ćelijama su odmrzavane na  $37^\circ\text{C}$  u vodenom kupatilu u trajanju od 1 minut, a potom su isprane u kompletnom medijumu i centrifugirane kako bi se odstranio toksični DMSO (7 minuta, 500G). Nakon odlivanja supernatanta ćelije su



resuspendovane u 6ml kompletnog medijuma i zasejane u T25 flask. Nakon 24 časa ćelije koje se nisu zalepile za flask su odbačene i medijum je zamenjen.

### 3.4 Test formiranja kolonija (*engl. colony forming unit assay, CFU*)

Brzina kojom SHED formiraju kolonije je važan test za kvalitet ćelijske izolacije. Ćelije niske pasaže su zasejane u maloj gustini od 400 ćelija/cm<sup>2</sup>, u ploču sa 6 bunarića, u odgovarajućem medijumu. Ispitivana primarna ćelijska linija je kultivisana 7-10 dana. Nakon isteka tog vremena, ćelije su isprane PBS, fiksirane metanolom i potom bojene 5-10 minuta 0.5% kristal-violet bojom. Boja je posle isteka vremena temeljno isprana tekućom vodom. Obojene kolonije prečnika većeg od 1mm su prebrojane na inverznom faznom mikroskopu (*Leica, Germany*) na uveličanju od 5x i 10x.

### 3.5 Određivanje fenotipa dobijenih ćelija

Protočna citometrija je metoda kojom se pomoću registrovanja optičkih signala na detektorima kada ćelije prelaze preko laserskog zraka odeđuju fenotipske, biohemijske i molekularne karakteristike istih. Konvencionalni površinski markeri za karakterizaciju humanih mezenhimalnih matičnih ćelija su CD73, CD90, CD105 kao pozitivni i CD45, CD34, CD14 ili CD11b, CD79a ili CD19 i HLA-DR kao negativni, odnosno markeri kojima se potvrđuje odsustvo drugih tipova ćelija (87).

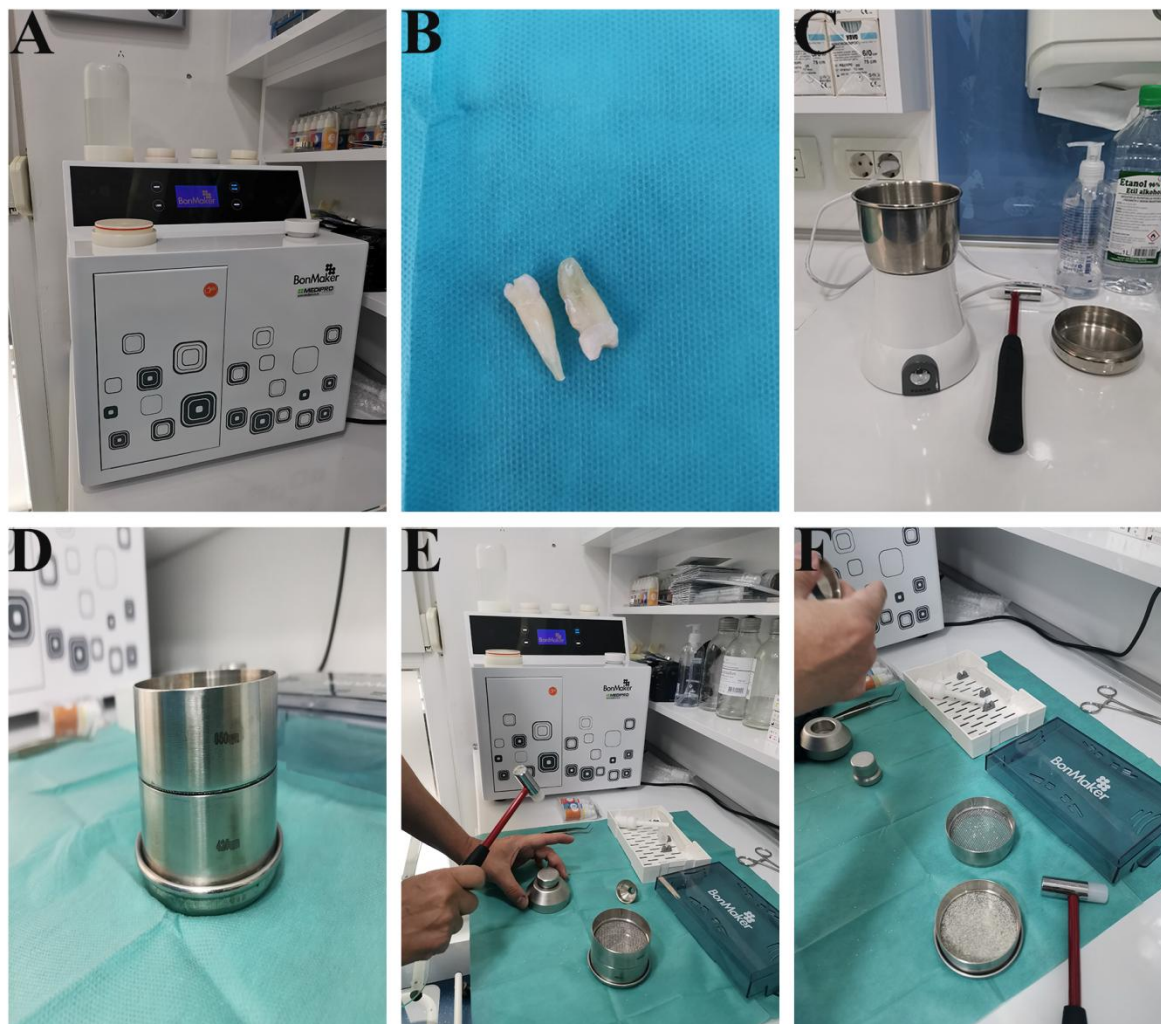
Svi navedeni marker su proizvedeni od strane *BD Biosciences Pharmingen, SAD*. Kao izotopska kontrola, za određivanje nespecifičnog vezivanja, kod svih markera je korišćen mišiji imunoglobulin-1 (IgG1) istog proizvođača. U epruvetu sa 1x10<sup>6</sup> ćelija (pasaže 4) sipano je 2 ml PBS i centrifugirano (7 minuta, 500G). Nakon odlivanja supernatanta postupak je ponovljen da bi se ćelije isprale od medijuma. Zatim su ćelije resuspendovane u 100 µl PBS i podeljene u dve epruvete po 50 µl, u koje je potom dodato po 5 µl konjugovanih primarnih antitela pozitivnih i negativnih markera (pozitivni markeri koji su korišćeni: CD29, CD44, CD105, CD90; negativni markeri koji su korišćeni: CD34, CD45, CD235a, CD73). Sadržaj u epruveti je inkubiran 30 minuta na sobnoj temperaturi, u mraku, kako bi se antitela vezala za receptore na površini ćelija. Ćelije su zatim isprane u 300 µl komercijalne tečnosti za ispiranje ćelija “*cell-wash*”

(*Wash buffer BD Biosciences, San Diego, SAD*), da bi se odstranio višak antitela koja se nisu vezala za ćelije. Suspenzija je resuspendovana u 0.5 ml PBS i analizirana na protočnom citometru (*FACS caliber cytometer/ FACS caliber BD Biosciences, San Diego, SAD*). Monoklonska antitela koja su se vezala za površinu ćelija, su obeležena fluorescentnom bojom, tako da protočni citometar detektuje emitovanu fluorescencu. Na taj način su detektovane i izbrojane ćelije koje ekspimiraju molekule za koje su se vezala obeležena antitela. Podaci su analizirani na *Cell Quest* softveru.

### 3.6 Priprema dentinskih opiljaka

Zubi su pažljivo izvađeni a potom su uklonjen strani materijali, pre stavljanja u uređaj i pripreme opiljaka prema uputstvu proizvođača (*Bone Maker, Korea*) (Slika 5B). Konkretno zub je prvo obrađen piezoelektirčnim instrumentima kako bi se otklonili zaostali kalkulusi na kruničnom i korenskom delu zuba, potom je dijamantskim svrdlima očišćena površina korena zuba. Nakon toga su bili uklonjeni svi materijali za punjenje iz zuba (glutaperka, kompozitni materijal itd.). Na kraju je zub isečen na manje delove kako bi se olakšao proces mlevenja u aparatu.

Komadići zuba su postavljeni unutar mlina (Slika 5C). Usitnjene partikule su nakon toga prosejane kroz sita veličine 850  $\mu\text{m}$  i 425  $\mu\text{m}$ , međutim za obradu su uzete partikule koje su ostale na situ veličine 425  $\mu\text{m}$  (Slika 5D). Dentinske partikule su postavljene u aparat sa ostalim potrebnim komponentama i materijal je pripremljen prema uputstvu proizvođača. Potrebno vreme za pripremu dentinskog grafta je iznosilo 25 minuta. Tako sveže pripremljen graft je korišćen za dalje istraživanje. Ispitivani ekstrakt grafta je dobijen suspendovanjem jedinjenja u podlozi za gajenje ćelija (DMEM/F12) u koncentraciji od 2mg/ml i inkubiranjem na 37°C u trajanju od 24h, 7 i 14 dana, uz konstantnu agitaciju.



Slika 5. Priprema dentinskih opiljaka

### 3.7 Sinteza i priprema SBA-16/HA

#### 3.7.1 Sinteza mezoporozne silike SBA-16

Sinteza mezoporoznog SBA-16 izvršena je poštujući proceduru objavljenu u [ref Gobin 2006] uzimajući u obzir molske odnose reaktanata:  $\text{TEOS} : \text{F}_{127} : \text{BuOH} : \text{HCl} : \text{H}_2\text{O} = 1 : 0.0036 : 1.8 : 2.44 : 119.6$ . Za pripremu 100 ml rastvora, 1.7 g Pluronic-a F127 je rastvoreno u 80.8 g 1.1 M rastvora dejonizovane vode i 3.3 g 38 % rastvora hlorovodonične kiseline, uz konstantno mešanje 30 minuta na 25°C. Rastvor je potom zagrejan u uljanom kupatilu do 45°C. Potom je dodato je 6.58 ml kosurfaktanta butanola. Nakon 1 sat mešanja, u rastvor je dodato 8.48 ml tetraetilortosilikata (TEOS, *Sigma-*

*Aldrich*), kap po kap, uz stalno mešanje na temperaturi od 45°C tokom sat vremena, kada i počinje da se formira silikatna mezofaza (73). Nakon što je rastvor, uz konstantno mešanje, odstojao 24 sata na 45°C, prebačen je u autoklav (*Carl Roth Model II, Germany*), na temperaturu od 100°C narednih 24 sata. Produkt je filtriran, ispran etanolom i dejonizovanom vodom, osušen na 100°C i homogenizovan. Surfaktant je uklonjen kalcinacijom, tako što je materijal termički tretiran 6 sati na 550°C.

### 3.7.2 Sinteza SBA-16/HA kompozita

Sinteza SBA-16/HA kompozita je izvedena dvostepenim postupkom koji se sastojao od dve faze: faza 1 - sinteza kalcijum-dopiranog matriksa silike i faze 2 – kristalizacije HAP u Ca-dopiranom matriksu silike.

#### *Faza 1: Sinteza kalcijum-dopiranog matriksa silike*

Ca-dopirani matriks silike je sintetisan u tzv. koraku niskog pH [Gobin, 2006; Andrade, Gomide, da Silva Júnior, Goes & de Sousa, 2014]. Prvo je 0.75g Pluronic F127 ratvoreno u 50 ml  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  i 25ml 2 M rastvora HCl uz konstantno mešanje na sobnoj temperaturi. Nakon 30 minuta, 2.78 ml kosurfaktanta butanola je dodato da se dostigne maseni odnos 1:3 (F127: BuOH). Potom, 3.825 ml TEOS-a je dodato kap po kap u rastvor uz konstantno mešanje na 45°C, tokom jednog sata. Rastvor je potom prebačen u autoklav, hermetički zavoren i ostavljen narednih 24 sata na temperaturi od 100°C. Proizvod je osušen u sušnici na 100°C.

#### *Faza 2: Proces kristalizacije HA unutar Ca-dopiranog matriksa silike*

U fazi 2, ili koraku visokog pH, Ca-dopiran matriks silike je ubačen u rastvor diamonijum hidrogen fosfata  $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ , i pH vrednost je podešena na 9. Nakon toga, rastvor je izložen drugom hidrotermalnom tretmanu na 100°C tokom 24 sata. Prah je posle tretmana ispran i termički tretiran na 600°C u trajanju od 6 sati i dobijen je finalni (SBA-16/HA) kompozitni materijal.

### 3.8 Karakterizacija ispitivanog materijala

#### 3.8.1 Difrakcija X zraka, XRD (X-ray diffraction)

Metod rendgenske difrakcije (engl. *X-ray diffraction*, XRD, *Ital Structure APD 2000 X-ray powder diffractometer*) je korišćen za strukturnu analizu faza sintetisanog materijala. Da bi se dobio dublji uvid u kristaliničnost i fazni sastav kompozita SBA-16/HA, XRD merenje je izvedeno na *Rigaku SmartLab* difraktometru (sa Cu,  $K_{\alpha}$  i  $K_{\beta}$  zračenjem) u opsegu  $2\theta$  od 0 do  $60^{\circ}$  sa režimom stepenastog skeniranja od  $0,05^{\circ}$  i vremenom ekspozicije od  $1.4^{\circ}/s$  po koraku.

#### 3.8.2 Difrakcija X zraka pri malim i pri većim uglovima, SWAXS (Small angle/Wide angle XRay Spectroscopy)

Kompozit SBA-16/HA je okarakterisan rendgenskom spektroskopijom sa malim/širokim uglom (SWAXS), gde su istovremene SAXS i WAXS analize rađene SAXS kamerom visokog fluksa (*Anton Paar*, Grac, Austrija), sa generatorom rendgenskih zraka Debieflek 3003 (*GE-Electric*, Nemačka), koji radi na 40 kV i 50 mA, koji ima Cu anodu sa zapečaćenom cevčicom.

#### 3.8.3 Skenirajuća elektronska mikroskopija, SEM (Scanning Electron Microscopy) sa energetski disperzivnom rendgenskom spektroskopijom (Energy Dispersive Spectroscopy)

Skenirajuća elektronska mikroskopija je korišćena da bi se ispitala morfologija i mikrostruktura uzorka. Snimanja su vršena na skenirajućem elektronskom mikroskopu (*TESCAN Vega TS 5130 MM*, *Czech Republic*) koji je opremljen detektorom za elementarnu analizu (*EDS detector*, *OKSFORD*).

Elementarna analiza komercijalnog praha je urađena skenirajućim elektronskim mikroskopom opremljenim EDS detektorom. Pri interakciji visokoenergetskog snopa elektrona (20 keV) i ispitivanog materijala dolazi do emisije karakterističnog X-zračenja, čija se energija meri pomoću EDS detektora. Kako je energija X-zračenja karakteristična

za prelaz elektrona sa spoljašnje na unutrašnju elektronsku ljusku, odnosno atomsku strukturu elementa koji emituje X-zračenje, EDS detektor omogućava precizno utvrđivanje elementarnog sastava ispitivanog uzorka.

### **3.8.4 Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom, Fourier transform infrared Spectroscopy (FTIR)**

Ova analiza se koristi za dobijanje infracrvenog spektra apsorpcije ili emisije koju imaju čvrste supstance, tečnosti ili gasa. FTIR spektrometar istovremeno prikuplja spektralne podatke visoke rezolucije u širokom spektralnom opsegu.

Infracrveni spektri Fourijeove transformacije (FTIR) snimljeni su sa dva spektrometra Perkin Elmer Spectrum (*Perkin Elmer, SAD*) u režimu oslabljene ukupne refleksije, ATR. Rezolucija je podešena na  $4\text{ cm}^{-1}$  u spektralnom opsegu koji pokriva  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ .

## **3.9 Određivanje citotoksičnosti ispitivanih materijala**

### **3.9.1 Ispitivanje citotoksičnosti materijala-MTT test (thiazolyl blue tetrazolium bromide test)**

Ćelijska proliferacija je indirektno merena prema metodi *Mosmana* (141) putem određivanja sposobnosti ćelija da metabolički redukuju tetrazolijum boju (MTT-3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid), supstancu žute boje, rastvorljivu u vodi, kidanjem tetrazoliumovog prstena uz pomoć sukcinat dehidrogenaze, koja se nalazi u mitohondrijama, u ljubičasti formazan koji je nerastvorljiv u vodi. Sposobnost da redukuju boju imaju samo metabolički aktivne ćelije, te količina stvorenog formazana pozitivno korelira sa brojem živih i metabolički aktivnih ćelija.

Ispitivanje indirektno toksičnosti u ovom istraživanju podrazumeva ispitivanje toksičnosti ekstrakata ispitivanih jedinjenja, odnosno njihovih degradacionih proizvoda na ćelije *in vitro*. Ispitivani ekstrakti su dobijeni suspendovanjem jedinjenja u podlozi za gajenje ćelija u koncentraciji od  $1.67\text{ mg/ml}$  i inkubacijom na  $37^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 24 časa, 7 dana ili 14 dana, uz konstantnu agitaciju na rotacionom mikseru (*Unimax 2010, Heidolph, Germany*). Nakon inkubacije, dobijene suspenzije su centrifugirane 7 minuta

na 500G (*Eppendorf centrifuge 5702, Germany*), dekantovane, izmerena im je pH vrednost rastvora i rastvori su filtrirani kroz filter veličine pora 0.22 µm da bi se sterilisali. Ovako dobijeni ekstrakti su dalje korišćeni za tretiranje ćelija u cilju ispitivanja indirektno citotoksičnosti. Pored ispitvanih ekstrakata dentinskih opiljaka (DO) i SBA-16/HA, kao komercijalni materijal korišćen je Bio-oss<sup>®</sup> (Bio-oss<sup>®</sup> *cancellous granule* 0.25-1.0 mm veličine, *Geistlich AG, Wolhusen, Switzerland*).

Za ispitivanje delovanja ekstrakata biomaterijala, ćelije su nakon tripsinizacije resuspendovane u hranljivoj podlozi i u odgovarajućem broju ( $2 \times 10^4 / 100 \mu\text{l}$ ) zasejane u mikroploču sa 96 bazena. Vijabilne ćelije su posejane u kvadriplikatu u mikrotitar ploče sa 96 otvora. Ploče sa zasejanim ćelijama su ostavljene u termostatu na 37 °C, sa 5% CO<sub>2</sub> naredna 24 časa. Rastvor MTT (*Sigma-Aldrich, USA*) je pripremljen neposredno pre dodavanja, i dodat je u sve otvore na ploči u zapremini od 10 µl/otvoru i inkubacija je nastavljena naredna 3 časa (u termostatu na 37 °C, sa 5% CO<sub>2</sub>). Po isteku 3 časa u svaki otvor je dodato po 100 µl 0.04 mol/l hlorovodonične kiseline u izopropanolu. Apsorbancija je očitana odmah po isteku inkubacije na čitaču za mikrotitar ploče (*Multiscan FC, Thermo Scientific*) na talasnoj dužini od 540 nm i referentnoj od 690 nm. Otvori na ploči koji sadrže samo medijum i MTT, ali ne i ćelije, su slepa proba ("blank"). Citotoksičnost je izražena procentom prema formuli:

$$CI = (1 - A_s / A_k) \times 100,$$

pri čemu je  $A_k$  apsorbancija kontrolnih uzoraka, a  $A_s$  apsorbancija uzoraka sa ispitivanim diskom. Frakcija preživelih ćelija izražava se kao procenat od kontrolne vrednosti prema formuli:

$$\%K = (N_s / N_k) \times 100,$$

pri čemu je  $N_k$  broj ćelija kontrolnih uzoraka, a  $N_s$  broj ćelija uzoraka sa ispitivanom supstancom.

### 3.9.2 Test odbacivanja boje - DET test

Ćelije su bile sakupljene u logaritamskoj fazi rasta, tripsinizirane, resuspendovane i izbrojane u 0.1% tripan plavom. Vijabilne ćelije su posejane u Petrijeve šolje sa dodatim

ekstraktom ispitivanih supstanci u koncentraciji  $2 \times 10^5/1$  ml. U kontrolnim uzorcima nije bilo supstanci. Petrijeve šolje sa zasejanim ćelijama su ostavljene u termostatu na  $37^\circ\text{C}$ , sa 5%  $\text{CO}_2$  narednih 24 časa. Po isteku inkubacije, nakon 24 časa ćelije su izbrojane uz pomoć invertnog mikroskopa u komoricama za brojanje. Korišćena je Neubaurova komorica gde su ćelije brojane u četiri kvadrata. Svaki kvadrat je podeljen na 16 manjih kvadrata tako da ih ima ukupno 64. Potom je uzeto 100  $\mu\text{l}$  ćelija i tome dodato 100  $\mu\text{l}$  boje 0.1% tripan-plavo. Nakon intenzivnog mućkanja nekoliko kapi je naneto na oba polja komorice za brojanje. Tripan-plavo boji mrtve ćelije, dok žive ćelije ostaju neobojene.

Broj ćelija u 1 ml suspenzije je izračunat iz formule:

$$X = x \cdot 10 \cdot 2 \cdot 1000$$

10-dubina komore

2 -faktor dilucije

1000 -zapreminski koeficijent

x-broj ćelija u 16 kvadrata (prosečan broj ćelija u  $4 \times 16$  kvadrata). Citotoksičnost je izražena procentom, prema formuli:

$\text{CI} = (1 - N_s/N_k) \times 100$ , pri čemu je  $N_k$  broj ćelija kontrolnih uzoraka, a  $N_s$  broj ćelija uzoraka sa ispitivanom supstancom.

Frakcija preživelih ćelija su izražene kao procenat od kontrolne vrednosti, prema formuli:

$\%K = (N_s/N_k) \times 100$ , pri čemu je  $N_k$  broj ćelija kontrolnih uzoraka, a  $N_s$  broj ćelija uzoraka sa ispitivanom supstancom.

### **3.10 Diferencijacija ćelija u osteoblaste**

#### **3.10.1 Osteogena diferencijacija ćelija**

Ćelije su bile kultivisane u pločama sa šest bunarića i inkubirane u kompletnom medijumu, pri standardnim uslovima kultivacije, do postizanja subkonfluentnosti. Kako bi se usmerile ka osteogenoj diferencijaciji, ćelije su zatim bile inkubirane u medijumu za



osteogenu diferencijaciju. Standardnom medijumu su dodate sledeće supstance kako bismo dobili medijum za osteogenu diferencijaciju: askorbinska kiselina (*Galenika a.d.*, Srbija) u koncentraciji od 0.05  $\mu\text{mol/l}$ , deksametazon (*Galenika a.d.*, Srbija) u koncentraciji od 0.1  $\mu\text{mol/l}$  i beta glicerofosfat (*Sigma-Aldrich, USA*) 10  $\mu\text{mol/l}$ . Inkubacija ćelija je trajala 21 dan uz zamenu medijuma na svaka 2-3 dana. Nakon toga, u cilju potvrde osteogene diferencijacije, ćelije su bojene alizarin red bojom i imunoflorescentno. Kontrolnu grupu su činile ćelije gajene u osnovnom kompletnom medijumu za kulturu ćelija.

### 3.10.2 Alizarin red test

U svrhu određivanja prisustva kalcijumovih depozita u ćelijama, napravljen je radni rastvor alizarin crvenog: 2 g alizarin crvenog je rastvoreno u 100 ml dejonizovane vode, i pH rastvora je iznosio 4.18.

Nakon tri nedelje inkubacije, medijum je odliven iz bunarića, i ćelije su isprane dva puta u PBS. Zatim je u svaki bunarić dodato po 500  $\mu\text{l}$  paraformaldehida i inkubirano 30 minuta. Fiksativ je nakon isteka tog vremena odliven, ćelije su isprane destilovanom vodom i u svaki bunarić je dodato 500  $\mu\text{l}$  radnog rastvora alizarin crvenog. Mikrotitar ploče sa bunarućima su bile inkubirane 30 minuta na sobnoj temperaturi. Boja je nakon toga odlivena a uzorci su isprani pet puta destilovanom vodom. Kalcijumovi depoziti su slikani invertnim mikroskopom (*Leica MC 190 HD, Germany*).

### 3.10.3 Imunofluorescentno bojenje primarnih ćelijskih linija

Za potrebe standardnog imunofluorescentnog bojenja, ćelije su zasejane u ploču sa 24 otvora, sa pokrovnicom prečnika 12 mm (*Marienfeld, Germany*), u koncentraciji od  $3 \times 10^4$  ćelija/otvoru u 0.5 ml odgovarajućeg medijuma. Ispitivana primarna ćelijska linija je kultivisana u skladu sa prethodno opisanim uslovima u medijumu za osteogenu diferencijaciju matičnih ćelija. Nakon isteka perioda inkubacije od 24 sata pristupano je bojenju kontrolne i eksperimentalne grupe, odnosno zalepljenih ćelija na pokrovnicama iz ploča sa 24 otvora. Eksperimentalnu grupu čine SHED diferencirane u osteoblaste.

Iz ploča sa otvorima je prvo aspiriran sav medijum za rast ćelija. U sledećem koraku ćelije zalepljene za pokrovnice su ispirane tri puta u PBS. Potom su ćelije fiksirane u 4% paraformaldehidu (rastvorenom u PBS) u trajanju od 10 minuta. Nakon fiksiranja ponovno su ispirane tri puta PBS. Primenom 0.3% Triton X-100 (*Alfa Aesar, A 16046, Germany*) u trajanju od 5 minuta postignuta je permeabilizacija ćelija. Dalji postupak izvođen je u vlažnoj komori. Pokrovnice su tretirane se 10% normalnim kozjim serumom radi blokiranja nespecifičnog bojenja, u trajanju od 30 minuta na 25°C.

Imunofluorescentno bojenje je rađeno na sledeći način: Na pokrovnice su aplikovana primarna antitela anti-SOX 2 (*Flarebio, PA16539A0RB, USA*) u razblaženju 1:200, Ki-67 (*Thermo Fisher, PA5-19462, USA*) u razblaženju 1:200, Osteopontin (*Thermo Scientific, RB-9097-P0, USA*) u razblaženju 1:100, kao i anti-Collagen 1 (*Abcam, ab138492, USA*) u razblaženju od 1:1500. Tako aplikovana primarna antitela su inkubirana na sobnoj temperaturi sat vremena. Sekundarna antitela Alexa Fluor 555 (*Abcam, ab150078, United Kingdom*) i Alexa Fluor 488 (*Abcam, ab 150077, United Kingdom*), aplikovana su nakon isteka tog vremena u trajanju od 30 minuta, na temperaturi 25°C. Pokrovnice su nakon toga montirane na predmetno staklo pomoću DAPI medijuma (*Abcam, ab 104139, United Kingdom*).

Obojene ćelije analizirane su na mikroskopu marke *Leica DMLB 100T, Germany* i fotografisane kamerom marke *Leica MC 190 HD, Germany*. Za potrebe analize imunofluorescentno bojenih preparata izvršena je semikvantitativna evaluacija intenziteta imunopozitivnosti pojedinih markera, koja je izražena uz pomoć četvorostepene skale brojevima od 0 do 3. Ocena intenziteta imunopozitivnosti kvalifikovana je kao: jako izražen intenzitet imunopozitivnosti (3), umeren intenzitet (2) i slab (1), kao i bez imunopozitivnosti (0).

### 3.11 Određivanje ekspresije osteogenih markera

U cilju određivanja ekspresije osteogenih markera kod ispitivanih materijala, SHED su tretirane ekstraktima SBA/16-HA, dentinskih opiljaka i Bio-oss<sup>®</sup> materijala, starim 1., 7., 14. dana. Kao negativna kontrolna grupa korišćene su netretirane SHED (u

daljem tekstu kontrolna grupa), dok su osteoblasti, prethodno diferencirani iz SHED, korišćeni kao pozitivna kontrolna grupa (u daljem tekstu osteoblasti).

Kako bismo odredili ekspresiju određenih gena, ćelije su zasejane u T75 flasku i nakon postizanja konfluentnosti od 80% tretirane ispitivanim ekstraktima materijala u trajanju od 24 časa. Kontrolne grupe su bile tretirane fosfatnim puferom. Za određivanje genske ekspresije to jest za kvantifikaciju informacione RNK korišćeni su triplikati svakog uzorka. Metoda izbora kod određivanja genske ekspresije jeste lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (Real time PCR (*polymerase chain reaction*)). Priprema uzorka iziskuje nekoliko koraka: izolaciju iRNK, reakciju reverzne transkripcije i kvantifikaciju iRNK u Real time PCR analizi.

### 3.11.1 Izolacija iRNK

Nakon tretmana, ćelije su sakupljene i centrifugirane na 300 RCF tokom 10 minuta, potom je talog ćelija ispran u fosfatnom puferu i ponovo centrifugiran na isti način. Nakon toga uzorci ćelija su bili lizirani trizolom (*TRIzol Reagent, Invitrogen Ambion*) da bi se izolovala RNK, i to tako što je na  $5 \times 10^6$  ćelija dodat 1 ml trizola uz inkubaciju od 5 minuta. Tamo gde je bilo potrebno ćelije su homogenizovane u tubicama klipom/homogenizerom radi boljeg liziranja ćelija. Proteini su istaloženi dodavanjem 0.2 ml hloroforma u homogenat. Nakon dodavanja hloroforma tubice su promućkane invertovanjem (okretanjem) 15 sekundi, a potom inkubirane 2-3 minuta na temperaturi od 25°C. Zatim su uzorci centrifugirani 5 minuta na 12000 RCF, na +4°C, a izdvojeni supernatant (koja sadrži RNK) je prenet u nove nukleaza-oslobođene tubice. Na supernatant je dodato 0.5 ml izopropil alkohola kako bi se istaložila RNK. Potom su uzorci inkubirani još 10 minuta na temperaturi od 25°C, pa centrifugirani na 12000 RCF, 10 minuta na +4°C. Pipetom je nakon toga uklonjeno što više supernatanta, kako bi RNK ostala kao talog u vidu zareza na dnu tubice. Talog je ispran sa 1 ml 75% etanola (dobija se rastvaranjem apsolutnog etanola u vodi oslobođenoj od nukleaza). Uzorci su vorteksovani 5-10 sekundi, pa centrifugirani na 7500 RCF, 10 minuta na +4°C. Pipetom je uklonjeno što više supernatanta i tubice su postavljene u suvo kupatilo na 30°C tokom 25 minuta. Talog je resuspendovan u 20 µl vode oslobođene od nukleaza. U cilju

eliminacije zaostale genomske DNK, urađen je tretman sa DNA-zom koristeći *Turbo DNA free™ kit* (Ambion®, Thermo Fisher Scientific) prema uputstvima proizvođača. Nakon toga izmerena je koncentracija izolovane RNK uz pomoć *Qubit 3* fluorimetra (Invitrogen) i adekvatnog kita za RNK (*Qubit™ RNA Broad Range Assay*, Thermo Fisher Scientific) izračunata je koncentracija RNK. Uzorci RNK su čuvani na -80°C do trenutka prevođenja u komplementarnu DNK.

### 3.11.2 Reakcija reverzne transkripcije

Pošto ovako izolovani molekuli RNK ne mogu da služe kao matrica za PCR (jer *Taq* polimeraza koristi isključivo jednolančani molekul DNK kao matricu), procesom reverzne transkripcije izolovana iRNK je pretvorena u komplementarni DNK lanac (cDNK). Za reakciju reverzne transkripcije korišćen je kit za reverznu transkripciju (*High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit*, Applied Biosystems). Količina RNK koja je korišćen za ovaj kit je između 100 ng i 2 µg po reakciji i ujednačena je za sve uzorke. Koncentracija RNK se svodi prema uzorku na kojem je očitana najmanja vrednost. Ukupan volumen jedne reakcije iznosio je 20 µl tako da je u njemu bilo 10 µl uzorka i 10 µl master miksa (sastav master miksa je pripremljen prema uputstvu proizvođača).

Kako bi se izvela reakcija, na PCR mašini (*2720 Thermal Cycler*, Applied Biosystems) podešeni su optimalni uslovi prema uputstvima proizvođača kita.

### 3.11.3 Kvantifikacija iRNK u Real time PCR analizi

Real time PCR je modifikovana PCR reakcija u kojoj je moguće u „realnom vremenu“ (tj. nakon svakog ciklusa) pratiti amplifikaciju. Reakcija je izvedena na aparatu Real-Time PCR 7500 Fast (*Applied Biosystems*). U standardnim uslovima (50°C/2 minuta, 95°C/10 minuta; i 40 ciklusa, od kojih je svaki bio pri 95 °C /15 sekundi, a potom 60 °C /1 minut). Specifični prajmeri koji su korišćeni ranije su dizajnirani a njihove sekvence su prikazane u Tabeli 3. Na 2.5 µl cDNA uzorka (prethodno razblaženog i ujednačenog među uzorcima) dodato je 10 µl master miksa koji sadrži 1.3

μl smeše uzvodnog (engl. forward) i nizvodnog prajmera (engl. reverse), 4 μl vode oslobođene od nukleaza i 5.25 μl Power SYBR™ Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems*). Normalizacija eksperimentalnih podataka vršena je u odnosu na endogenu kontrolu (referentni gen - *GAPDH*). Analiza i vizuelizacija dobijenih rezultata urađena je u SDS softveru verzija 1.4 (*Real-Time PCR 7500 FAST, Applied Biosystems*).

Tabela 3. Prajmeri koji su korišćeni u analizi

	Gen	Šifra	Sekvenca prajmera
<b>Alkalna fosfataza</b>	<i>ALPL</i>	<a href="#">NM 001127501.4</a>	F:5'-ATGGGATGGGTGTCTCCACA-3'
			R:5'-CCACGAAGGGGAAGTTGTC-3'
<b>Run related transcription factor 2</b>	<i>RUNX2</i>	<a href="#">NM 001015051.4</a>	F:5'-CACTGGCGCTGCAACAAGA-3'
			R:5'-CATTCCGGAGCTCAGCAGAATAA-3'
<b>House keeping gene</b>	<i>GAPDH</i>	<a href="#">NM 001357943.2</a>	F: 5'-ATGAGAAGTATGACAACAGCC-3'
			R: 5'-AGTCCTTCCACGATACCAA-3'

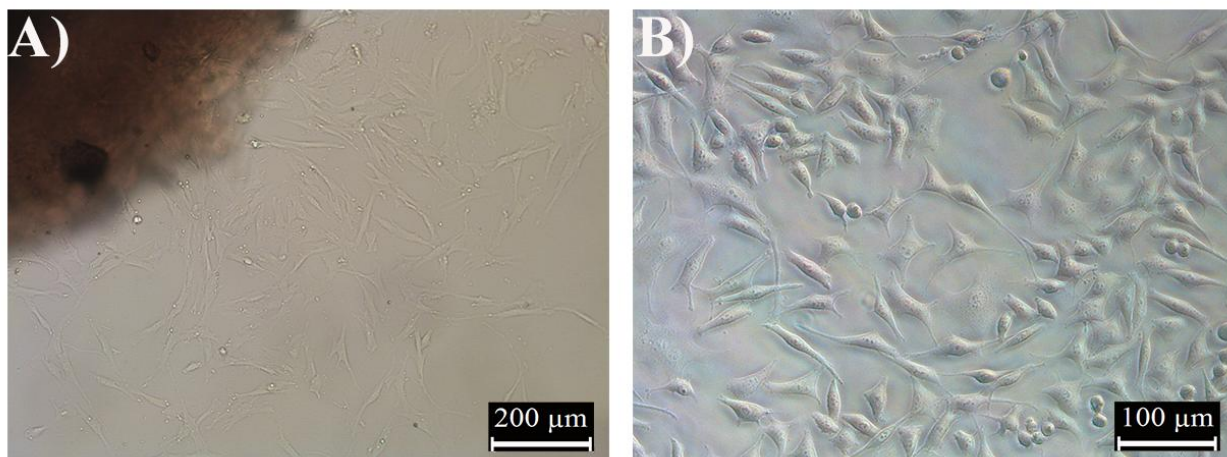
### 3.12 Statistička analiza

Za obradu dobijenih rezultata korišćen je statistički paket SPSS Statistics 23.0 (*Chicago, IL, SAD*). Pre testiranja numeričkih varijabli ispitivan je tip distribucije Shapiro-Wilk-ovim testom. Sve numeričke varijable pokazale su normalnu distribuciju, pa su za poređenje rezultata između grupa korišćena jednofaktorska ANOVA. U slučajevima kada je ANOVA pokazala statističku značajnost, razlike među grupama su praćene Tukey post hoc testom. Za najniži stepen značajnosti prihvatane su vrednosti verovatnoće  $p \leq 0.05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1 Izolacija ćelijske populacije mezenhimalnih ćelija metodom eksplanta

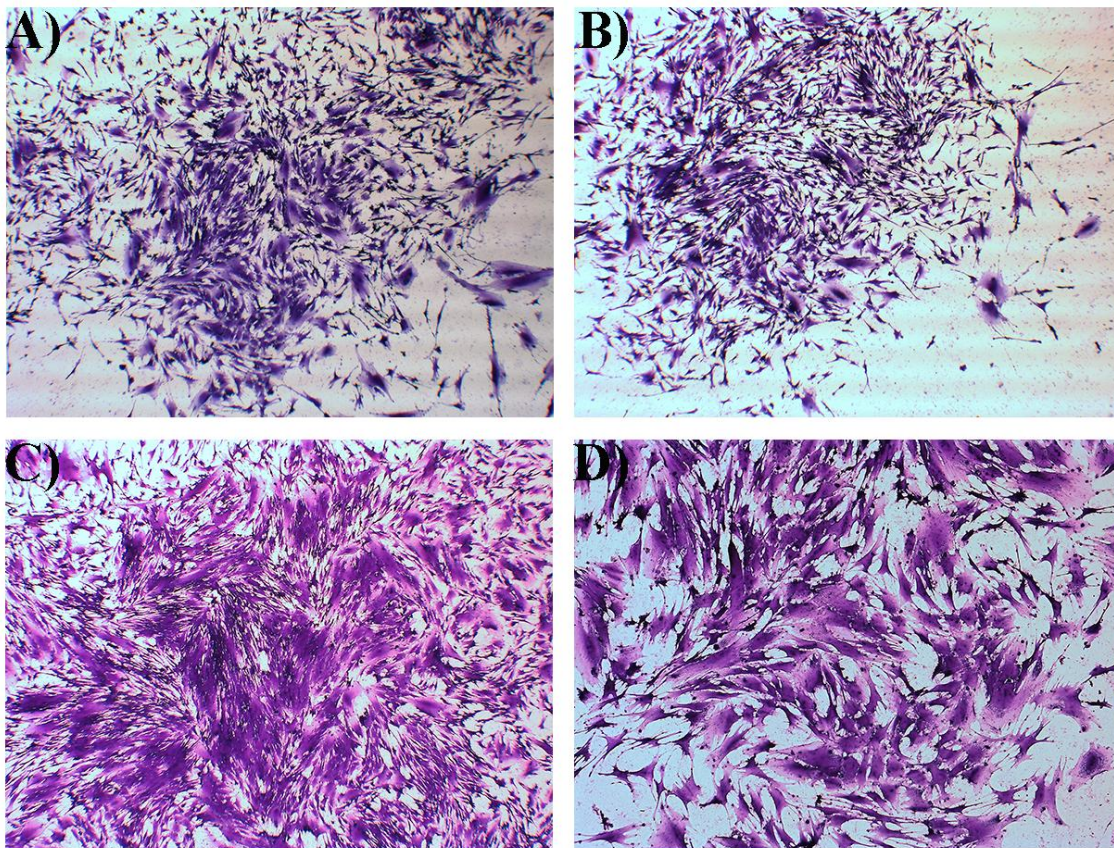
U ovom radu su metodom tkivnog eksplanta izolovane su SHED dece stare od 6 do 10 godina. Nakon 2 do 4 dana iz eksplanta su počinjale da migriraju ćelije koje su istovremeno i proliferisale stvarajući ostrvca bogata ćelijama (Slika 6A). U prvim danima nakon zasađivanja eksplanta adherentne ćelije su pod fazno kontrastnim mikroskopom morfološki izgledale izduženo, vretenasto sa svetlom citoplazmom. Do prve tripsinizacije bio je potreban period od 3 nedelje inkubacije na 37°C, u prisustvu 5% CO<sub>2</sub>. Vreme kultivacije posle prve tripsinizacije je označeno kao prva pasaža (P<sub>1</sub>). Broj presejanih ćelija se kretao od 200000 do 300000 ćelija. Daljom kultivacijom ćelije su se umnožavale brže te su supkonfluentnost dostizale 10 dana nakon zasađivanja (Slika 6B). Ćelije su uzgajane do sedme pasaže nakon čega je kultivacija prekidana.



Slika 6. A) SHED izolovane metodom eksplanta, 5 dana nakon uranjanja tkivnog eksplanta u hranljivi medijum. U uglu gore levo se vidi tkivo zubne pulpe, a celo polje je prekriveno ćelijama koje migriraju i proliferišu (invertni mikroskop, uveličanje objektiva  $\times 10$ ), B) Ćelije treće pasaže (P<sub>3</sub>) koje migriraju i proliferišu (invertni mikroskop sa faznim kontrastom, uveličanje objektiva  $\times 20$ ).

## 4.2 Test formiranja kolonija

Radi određivanja klonogenog potencijala SHED, korišćen je standardni test formiranja kolonija ćelija sličnih fibroblastima (CFU-F). Broj CFU-F kolonija je bio linearno zavisao od broja zasejanih ćelija (Slika 7.). U prvoj pasaži ( $P_1$ ) broj CFU-F je iznosio  $420 \pm 45$  na 10000 zasejanih ćelija. Ovaj broj ćelija nam ukazuje na visok kvalitet i potencijal umnožavanja izolovanih ćelija.

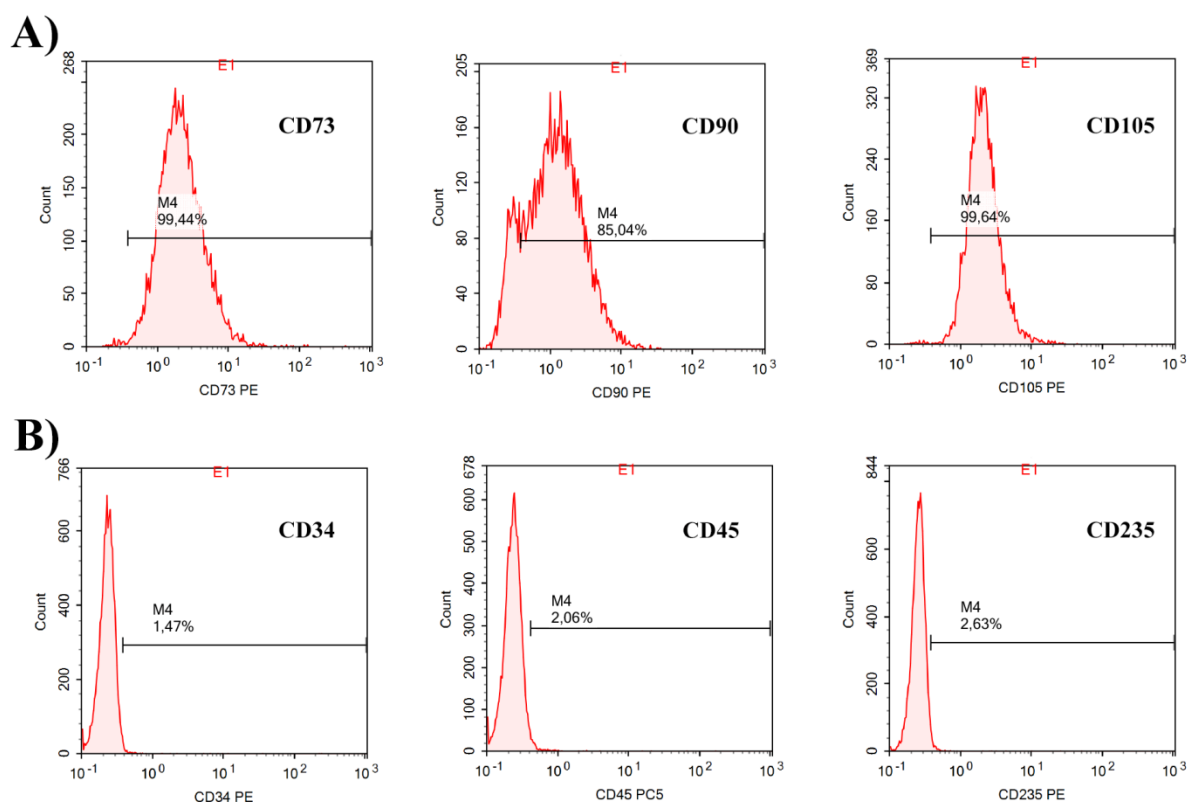


Slika 7. Test formiranja kolonija sličnim fibroblastima (CFU-F). Izgled kolonija obojenih kristal violet bojom (uveličanje objektiva x10 A, B; x20 C, D).

## 4.3 Karakterizacija fenotipa dobijenih ćelija metodom protočne citometrije

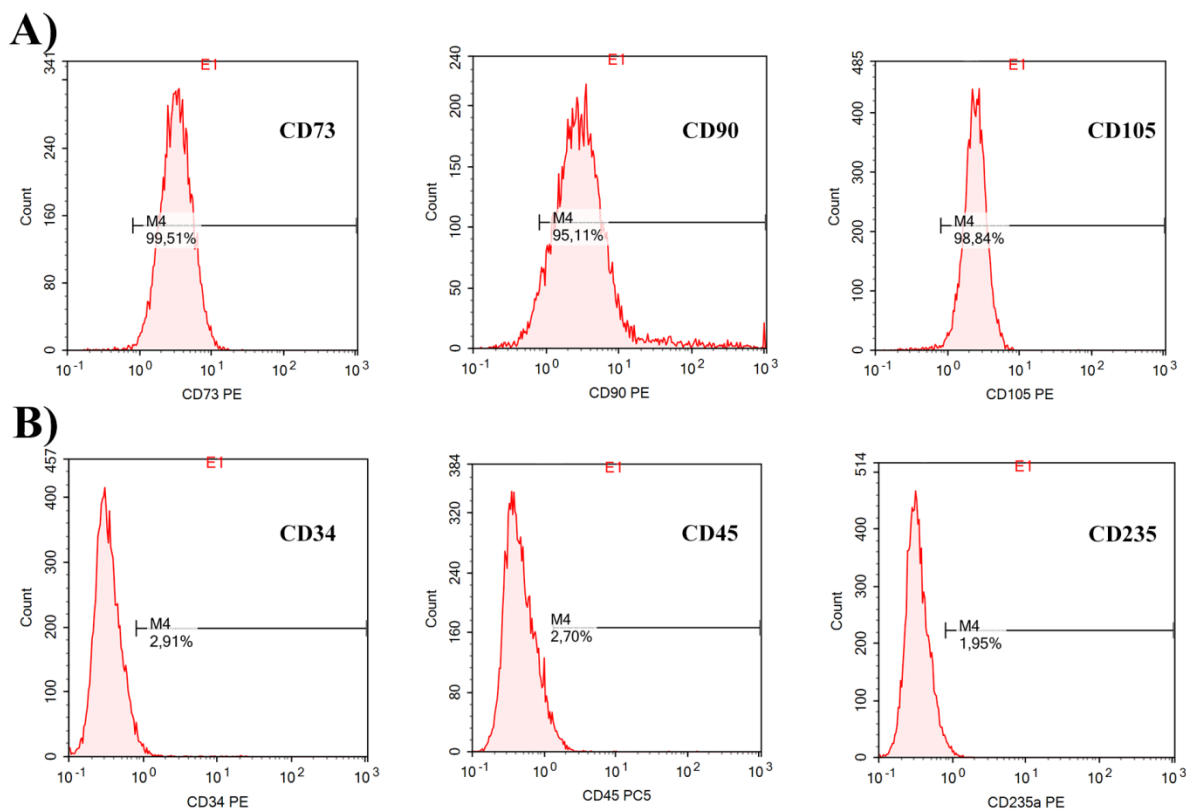
Protočna citometrija je pokazala jasnu ekspresiju sledećih markera: CD73, CD90, CD105. Navedeni pozitivni markeri su pokazatelj prisustva mezenhimalnih ćelija, s obzirom da pokazuju ekspresiju u više od 95% ispitivanih ćelija (Slika 8A, Slika 9A). CD34 marker hematopoietičnih matičnih ćelija bio je negativan u svim uzorcima,

odnosno njegova pozitivnost je bila manja od 1% čime je potvrđeno odsustvo drugih tipova ćelija u izolovanoj kulturi. Takođe, u svim uzorcima su bili negativni CD45 i CD235a (Slika 8B, Slika 9B) čime je dokazano odsustvo drugih tipova ćelija u kulturi. Kao izotopska kontrola kod svih markera korišćen je mišiji imunoglobulin-1 (IgG1).



Slika 8. Karakterizacija SHED na markere mezenihimalnih matičnih ćelija; A) Mezenihimalni površinski marker na SHED (CD73, CD90, CD105), B) Hematopoietični ćelijski površinski marker na SHED (CD34, CD45, CD235a).





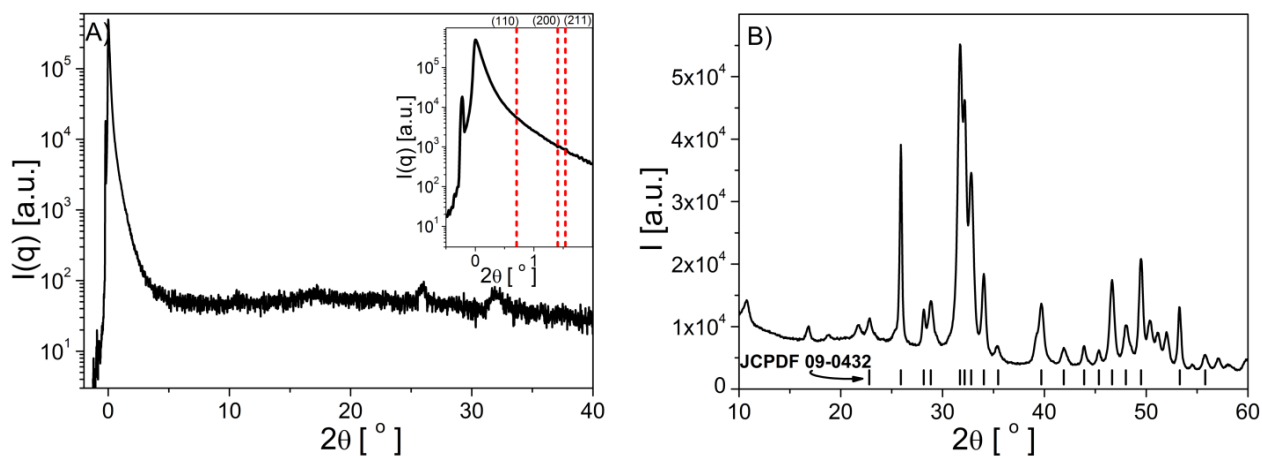
Slika 9. Karakterizacija SHED na markere mezenihimalnih matičnih ćelija; A) Mezenihimalni površinski marker na SHED (CD73, CD90, CD105), B) Hematopoetični ćelijski površinski marker na SHED (CD34, CD45, CD235a).

#### 4.4 Karakterizacija kompozitnog materijala na bazi mezoporožne silike i hidroksiapatita

##### 4.4.1 SWAXS i XRD

Analiza SAXS i WAXS je urađena simultano u laboratoriji za SWAXS koristeći SAXS kameru visokog fluksa (*Anton Paar, Graz, Austria*) sa DebyeFlex 3003 generatorom X zraka (*GE-Electric, Germany*) sa radnim parametrima od 40kV i 50mA. Prema rezultatima dobijenim unutar SAXS regiona ( $2\Theta = 0-7^\circ$ ), spektar kompozita HA/SBA-16 pokazao je difuzno rasejani region bez naznaka visoko uređene 3D mezoporožne strukture karakteristične za SBA-16 (Slika 10A). To znači da HA ima

skoro pa destruktivni efekat na strukturu SBA-16, ali očigledno nije u stanju da je potpuno razori. Iako struktura SBA-16 nije sačuvana u kompozitnom uzorku, višestruki benefiti mogu proizaći iz njene mezoporožne strukture. Na osnovu rezultata WAXS analize moguće je pretpostaviti formiranje kristalne HA faze.

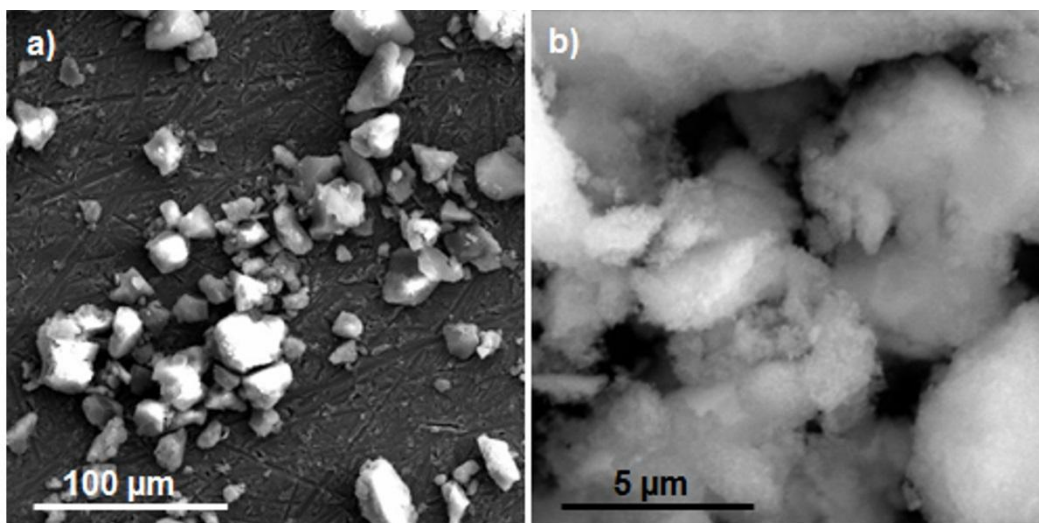


Slika 10. SBA-16/HA nanokompozit; A) SWAXS spektar snimljen do  $40^\circ$  ( $2\theta$ ) (na isečku je prikazan SAXS opseg do  $2^\circ$  ( $2\theta$ )), i B) XRD spektar snimljen u opsegu  $2\theta$  od  $10$  do  $60^\circ$ .

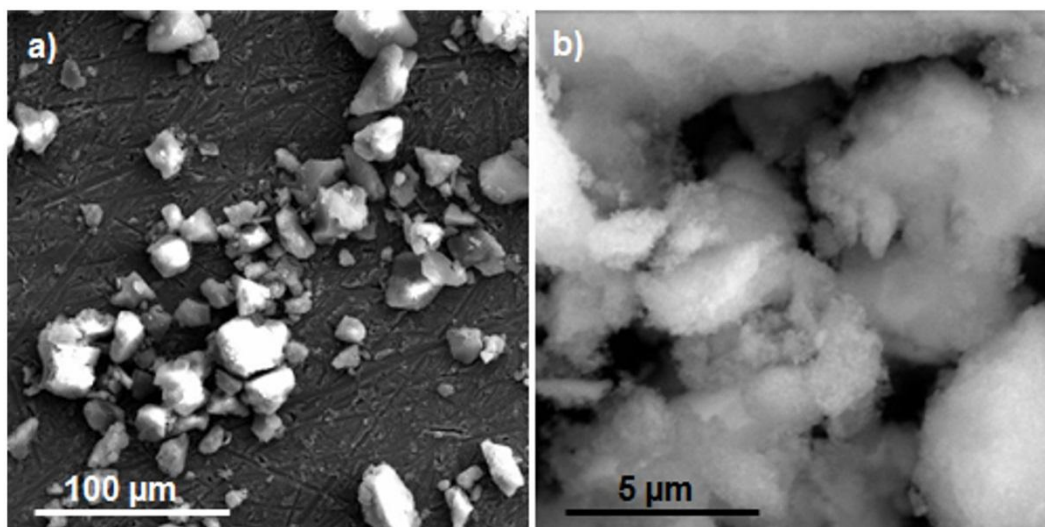
Pošto WAXS analiza ( $2\theta = 7-45^\circ$ ) nije obuhvatila ceo opseg  $2\theta$  regiona važnog za identifikaciju HA faze, XRD analiza je izvedena na Rigaku SmartLab difraktometru (sa  $\text{Cu K}\alpha$  i  $\text{K}\beta$  zračenjem) u opsegu  $2\theta$  od  $0$  do  $60^\circ$  (Slika 10B). Identifikacija faze izvedena je pomoću JCPDS kartice 09-0432. Rendgenski difraktogram nanokompozita ima glavni pik na oko  $2\theta = 32^\circ$  Milerovih indeksa (211), a drugi na  $26^\circ$  (002),  $33^\circ$  (300),  $34^\circ$  (202),  $40^\circ$  (310),  $47^\circ$  (222),  $49^\circ$  (213) i  $53^\circ$  (004). Ovi rezultati ukazuju na uspešno formiranje HA kristala kao monokristalne faze u materijalu.

#### 4.4.2 SEM (Skenirajuća elektronska mikroskopija) sa EDS analizom

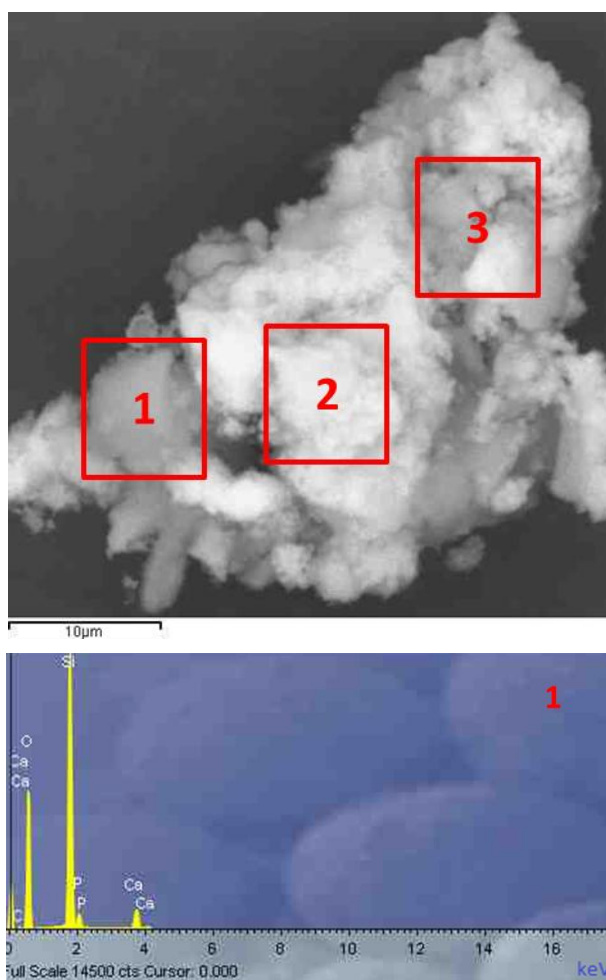
Snimanja na skenirajućem elektronskom mikroskopu TESCAN Vega TS 5130 MM, opremljenim detektorom za elementalnu analizu otkrila su čestice sfernog oblika SBA-16 materijala (Slika 11). Ove čestice, čija veličina varira od 2 do 5  $\mu\text{m}$ , koalesciraju jedna s drugom i teže da formiraju aglomerate veličine od 10 do 60  $\mu\text{m}$  unutar etanolne disperzije. Postupak sinteze, koji je rezultirao stvaranjem iskristalisanog HA sa Ca dopiranim matriksom SBA-16, uticao je na dalju aglomeraciju čestica, kao i na oblik i veličinu konačnog proizvoda. Međutim, uočeno je prisustvo malih pahuljastih HA kristala oko polu-sfernih čestica SBA-16 (Slika 12b).



Slika 11. Prikaz SBA-16 na a) malom i b) velikom uvećanju SEM.



Slika 12. SEMmikrografije SBA-16/HA nanokompozita pri a) malom i b) velikom uvećanju SEM.



Slika 13. SEM mikrografija praha nanokompozita SBA-16/HA i EDS spektri uzeti sa označenih površina 1-3.

Tabela 4. Rezultati EDS analize čestica SBA-16/HA nanokompozita.

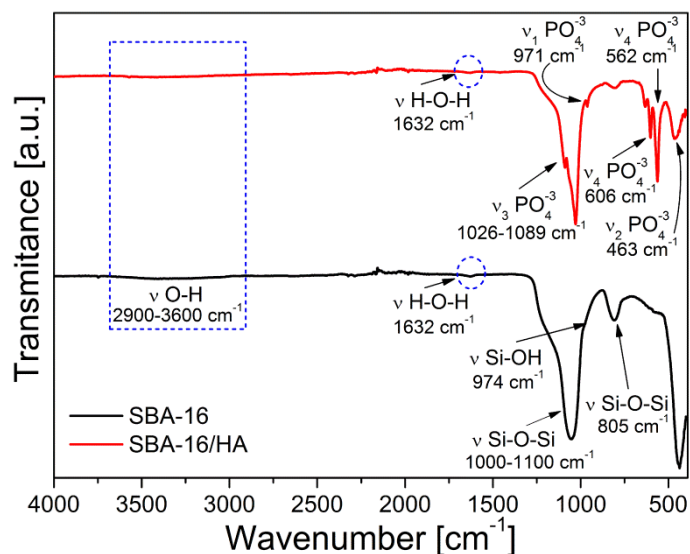
Spectrum	O	Si	P	Ca	Total	<i>Ca/P</i>
1	63.17	3.45	12.36	19.02	100.00	1.54~1.6
2	78.25	4.1	6.52	11.13	100	1.70
3	76.60	4.26	7.78	11.36	100	1.46

Površinska analiza koristeći EDS izvršena je na nekoliko odabranih područja praha SBA-16/HA, a spektar jednog od njih predstavljen je na Slici 13. Kvalitativna elementarna analiza uzorka pokazala je prisustvo jona silicijuma, kalcijuma i fosfora u količinama tipičnim za uspješno formiranje kalcijum fosfata unutar SBA-16 matriksa. Molarni odnos Ca/P je parametar koji procenjuje rastvorljivost jedinjenja kalcijum fosfata. Za stehiometrijski sastav hidroksiapatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , taj odnos je 1.67. Kao što se može videti iz Tabele 4., analizirana područja su pokazala vrednosti Ca/P od 1.54, 1.70 i 1.46. Iako su neka područja pokazala stehiometrijski sastav Ca/P, većina površina analiziranog uzorka ukazivala je na stvaranje kompozita SBA-16/HA sa nedostatkom kalcijuma.

#### 4.4.3 Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom

FTIR analiza je izvršena na uzorcima SBA-16 i SBA16/HA radi utvrđivanja hemijskog sastava i ispitivanja prisustva vibracionih traka tipičnih za ovu vrstu jedinjenja. Spektri uzoraka SBA16 i SBA16/HA prikazani su na Slici 14. Vibracione trake, sa slabim prevojem, tzv. “kolenom” na  $974 \text{ cm}^{-1}$  uočene u spektru SBA-16 i SBA16/HA, pripisane su prisustvu vibracionih traka silanolnih grupa (Si – OH), dok su apsorpcione trake na oko  $800 \text{ cm}^{-1}$  i  $1000\text{-}1100 \text{ cm}^{-1}$  odgovaraju vezama Si – O – Si. U oba spektra uočena je slaba traka na  $1630 \text{ cm}^{-1}$  koja može da se pripiše koordinisanoj vodi. Slično, široka slaba traka između  $2900\text{-}3600 \text{ cm}^{-1}$  pripisuje se O-H rastežućoj vibracionoj traci.

Pored traka tipičnih za mezoporozni silicijum dioksid SBA-16, spektar SBA-16/HA pokazuje oštre apsorpcione trake koje se pripisuju HA:  $\nu_3$   $\text{PO}_3^{-4}$  na  $1026 \text{ cm}^{-1}$  i  $1089 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_2$   $\text{PO}_3^{-4}$  na  $463 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_1$   $\text{PO}_3^{-4}$  simetrično istežanje na  $971 \text{ cm}^{-1}$ , i  $\nu_4$   $\text{PO}_3^{-4}$  savijanje na  $606$  i  $562 \text{ cm}^{-1}$ . Široke apsorpcione trake na oko  $2900\text{--}3600 \text{ cm}^{-1}$  i  $1632 \text{ cm}^{-1}$ , obe niskog intenziteta, pripadaju  $\text{--OH}$  rastegljivim i H-O-H savijajućim vibracijama. U spektru se nije mogla uočiti široka apsorpciona traka na približno  $630 \text{ cm}^{-1}$  koja potiče od  $\text{--OH}$  istežuće vibracije što ukazuje na formiranje slabo kristaliničnog, Ca deficijentnog HA.



Slika 14. FTIR spektar SBA-16 i SBA-16/HA materijala.

#### 4.5 Ispitivanje indirektno citotoksičnosti ispitivanih materijala- MTT test

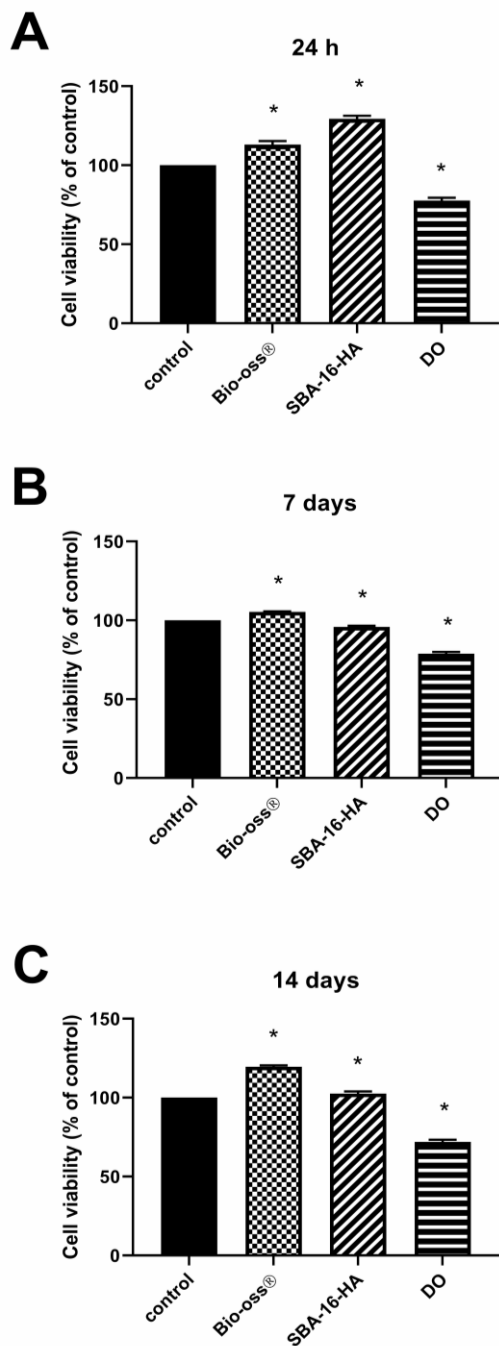
Ovim eksperimentom ispitan je potencijalni toksični efekat tri skafolda koji bi oni mogli da imaju na SHED. MTT test je otkrio da se vijabilnost ćelija 1. dana u kontrolnoj grupi značajno razlikovala od one u grupama Bio-oss<sup>®</sup>, SBA/16-HA i DO ( $p < 0.05$ ). Među svim eksperimentalnim grupama, nakon prvog dana, samo je grupa DO pokazala

blagu citotoksičnost na ćelijama (Slika 15A). U druge dve grupe ćelije su proliferisale, u poređenju sa kontrolnom grupom.

Vijabilnost ćelija u kontaktu sa ekstraktima materijala starih 7. dana pokazala se statistički značajno različitom u svim eksperimentalnim grupama, u poređenju sa kontrolnom grupom ( $p < 0.05$ ) (Slika 15B). U ovom vremenskom preseku, grupe Bio-oss<sup>®</sup> i DO pokazale su smanjenje vijabilnosti na 105% i 78%, dok je u grupi SBA/16-HA drastično smanjena vrednost na 95%.

Rezultati MTT testa ekstrakata materijala starih 14. dana pokazali su statistički značajno smanjenu vijabilnost DO grupe, na 71%. Za razliku od DO grupe, u grupama Bio-oss<sup>®</sup> i SBA/16-HA registrovano je značajno povećanje vijabilnosti ćelija (Slika 15C).

U grupi Bio-oss<sup>®</sup>, procenat vijabilnosti ćelija 7. dana je smanjen u poređenju sa rezultatima 1. i 14. dana. Ovo se može objasniti kasnim apoptotskim efektom. Sveukupno, u sva tri vremenska preseka, ovaj materijal je pokazao proliferišući efekat na ćelijama i odličnu biokompatibilnost. Budući da ovaj materijal predstavlja zlatni standard u koštanoj nadoknadi kada su u pitanju ksenografti, takav rezultat je očekivan. U grupi SBA/16-HA primećen je sličan obrazac rezultata. Kasni apoptotički efekat bio je prisutan 7. dana. Međutim u ekstraktu materijala starom 14. dana, rezultati MTT testa ispitani jednofaktorskom ANOVA analizom pokazali su statistički značajno povećanu vijabilnost ćelija. Kao što se može videti na Slici 18. nisu pronađeni dokazi o citotoksičnosti ovog materijala. SBA/16-HA je pokazao proliferativni efekat na SHED. Samo su ekstrakti DO u sva tri vremenska preseka ocenjeni kao blago citotoksični. Vijabilnost ćelija je vremenom značajno smanjena na 77%, 78%, odnosno 71%.



Slika 15. SHED u prisustvu ekstrakta Bio-oss<sup>®</sup>, HA/SBA-16 i dentinskih opiljaka u hranljivoj podlozi nakon 24 sata (A), 7 dana (B) i 14 dana (C). Vijabilnost ćelija određena je MTT testom (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide).



Absorbanca kontrolne grupe određena je kao 100% broj preživelih ćelija, te su ostale grupe izražene kao procenat vijabilnih ćelija u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije). \*  $p < 0.05$ .

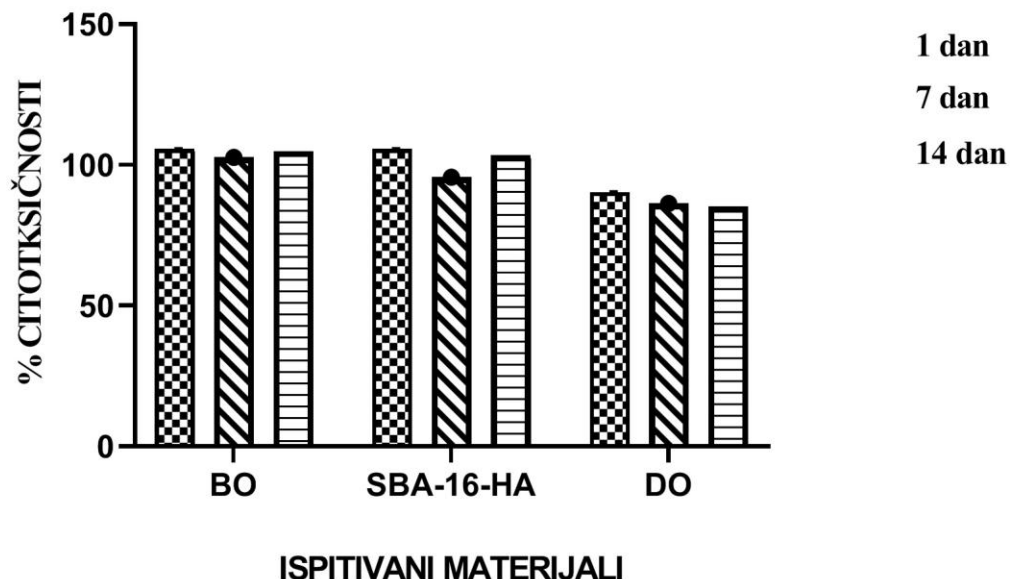
#### 4.6 Test odbacivanja boje- dye exclusion test (DET)

Srednja vrednost nivoa citotoksičnosti u svim grupama Bio-oss<sup>®</sup> materijala iznosila je -4,37%, što ukazuje na njegov generalni proliferativni efekat na SHED. Visok stepen biokompatibilnosti pokazao je i SBA-16/HA, gde je prosečna vrednost indeksa citotoksičnosti iznosila -1.43%. Efekat citotoksičnosti pokazao je samo ekstrakt dentinskih opiljaka u sve tri vremenske tačke, te je prosečan i ujedno najveći indeks citotoksičnosti iznosio 12.75% (Tabela 5, Slika 16).

Rezultati biokompatibilnosti ukazuju na visok nivo stepena ćelijske kompatibilnosti za Bio-oss<sup>®</sup> i SBA-16/HA materijale, dok je on nešto niži za dentinske opiljke. ANOVA je pokazala da postoji značajna razlika između svih materijala, posmatrano unutar vremenskih grupa ( $p \leq 0.05$ ).

Tabela 5. Indeks citotoksičnosti ispitivanih materijala

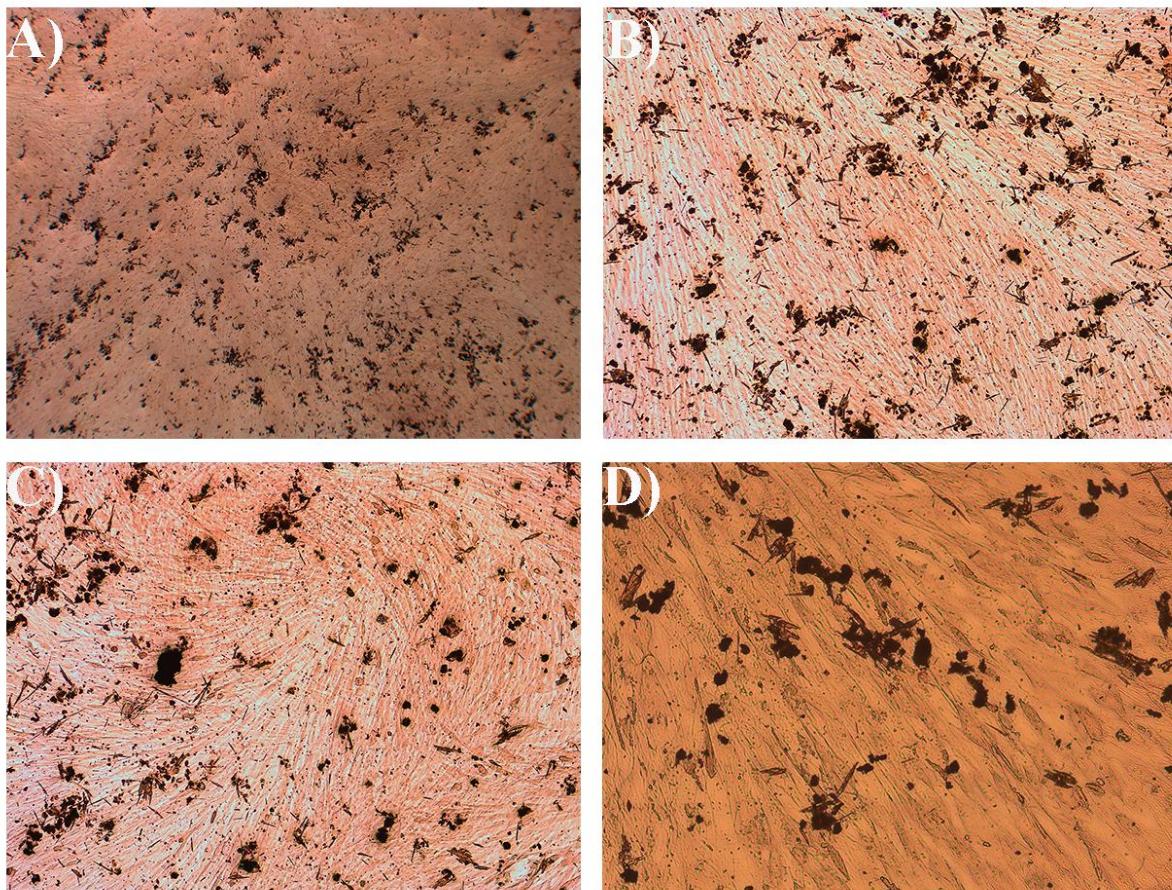
Vrsta materijala		Indeks citotoksičnosti (%Ci) na matičnim ćelijama zubne pulpe
Bio-oss <sup>®</sup>	1 dan	-5.62
	7 dana	-2.72
	14 dana	-4.78
SBA-16/HA	1 dan	-5.24
	7 dana	4.33
	14 dana	-3.39
DO	1 dan	9.70
	7 dana	13.74
	14 dana	14.81



Slika 16. Grafički prikaz indeksa citotoksičnosti ispitivanih materijala na matičnim ćelijama zubne pulpe

#### 4.7 Diferencijacija ćelija u osteoblaste

Izolovane SHED, iz pasaže 4, su diferencirane u osteoblaste nakon tri nedelje gajenja ćelija u osteogenom medijumu. Diferencijacija je dokazana bojanjem alizarin red bojom mineralizovanog matriksa koji je karakterističan produkt osteoblasta. Klasičnim histološkim bojenjem prikazani su kalcijum-fosfatni depoziti (Slika 17).



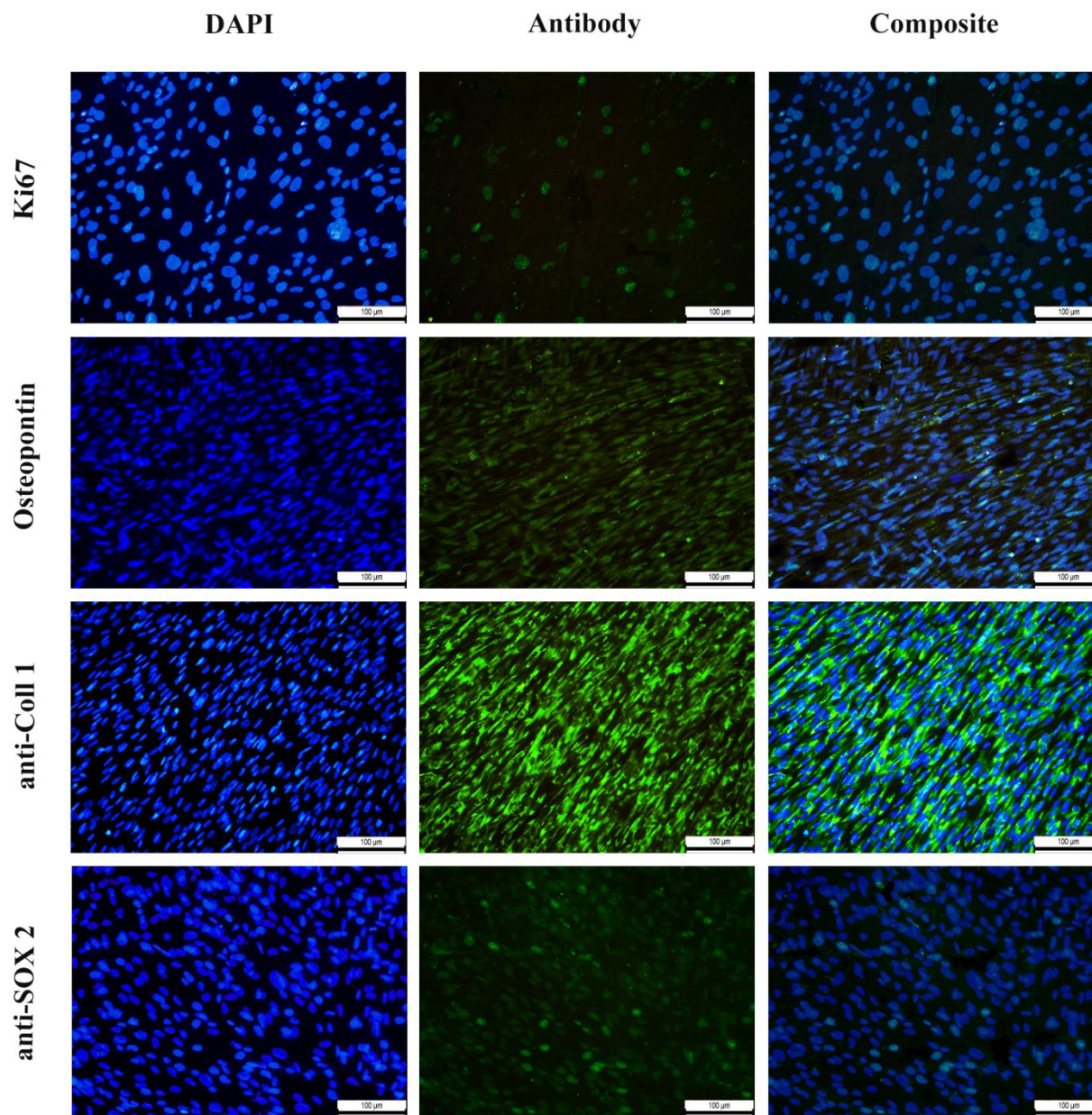
Slika 17. Diferencijacija mezenihmalnih ćelija zubne pulpe u osteoblaste: kalcijum fosfatni depoziti su vidljivi kao tamno obojeni noduli u ćelijskom matriksu (uveličanje objektivna 10x).

#### 4.8 Imunofluorescentno bojenje primarne ćelijske kulture

Za potrebe analize imunofluorescentnog bojenja izvršena je semikvantitativna evaluacija intenziteta imunopozitivnosti markera, koja je izražena uz pomoć četvorostepene skale brojevima od 0 do 3. Ocena intenziteta imunopozitivnosti kvalifikovana je kao: jako izražen intenzitet imunopozitivnosti (3), umeren intenzitet (2) i slab (1), kao i bez imunopozitivnosti (0).

SHED su pokazale jako izražen intezitet imunopozitvnosti na anti-Coll 1, umiren inteziyet pozitivnosti na osteopontin i slab na Ki67 i anti-SOX2 antitelo. Lokalizacija

obojenosti anti-SOX2 i Ki67 antitela je bila jedarna, dok su osteopontin i anti-Coll1 bili pozitivni u citoplazmi ćelija (Slika 18).



Slika 18. Imunofluorescentno bojenje mezenhimalnih ćelija zubne pulpe mlečnih zuba. DPSC pokazuju visoku ekspresiju anti-Coll 1 i Osteopontina (zeleno), dok je ekspresija Ki-67 i anti-SOX 2 antitela (zeleno) nešto slabija. Nukleusi ćelija su kontrastno obojeni sa DAPI (plavo). Uveličanje objektiva 20x.

#### 4.9 Analiza ekspresije osteogenih markera

U cilju određivanja ekspresije osteogenih markera kod ispitivanih materijala, SHED su tretirane ekstraktima SBA/16-HA, dentinskih opiljaka i Bio-oss<sup>®</sup> materijala, starim 1., 7., 14. dana. Kao negativna kontrolna grupa korišćene su netretirane SHED (u daljem tekstu kontrolna grupa), dok su osteoblasti, prethodno diferencirani iz SHED, korišćeni kao pozitivna kontrolna grupa (u daljem tekstu osteoblasti).

Za poređenje rezultata između grupa korišćena jednofaktorska ANOVA. U slučajevima kada je ANOVA pokazala statističku značajnost, razlike među grupama su praćene Tukey post hoc testom. Za najniži stepen značajnosti prihvatane su vrednosti verovatnoće  $p \leq 0.05$ .

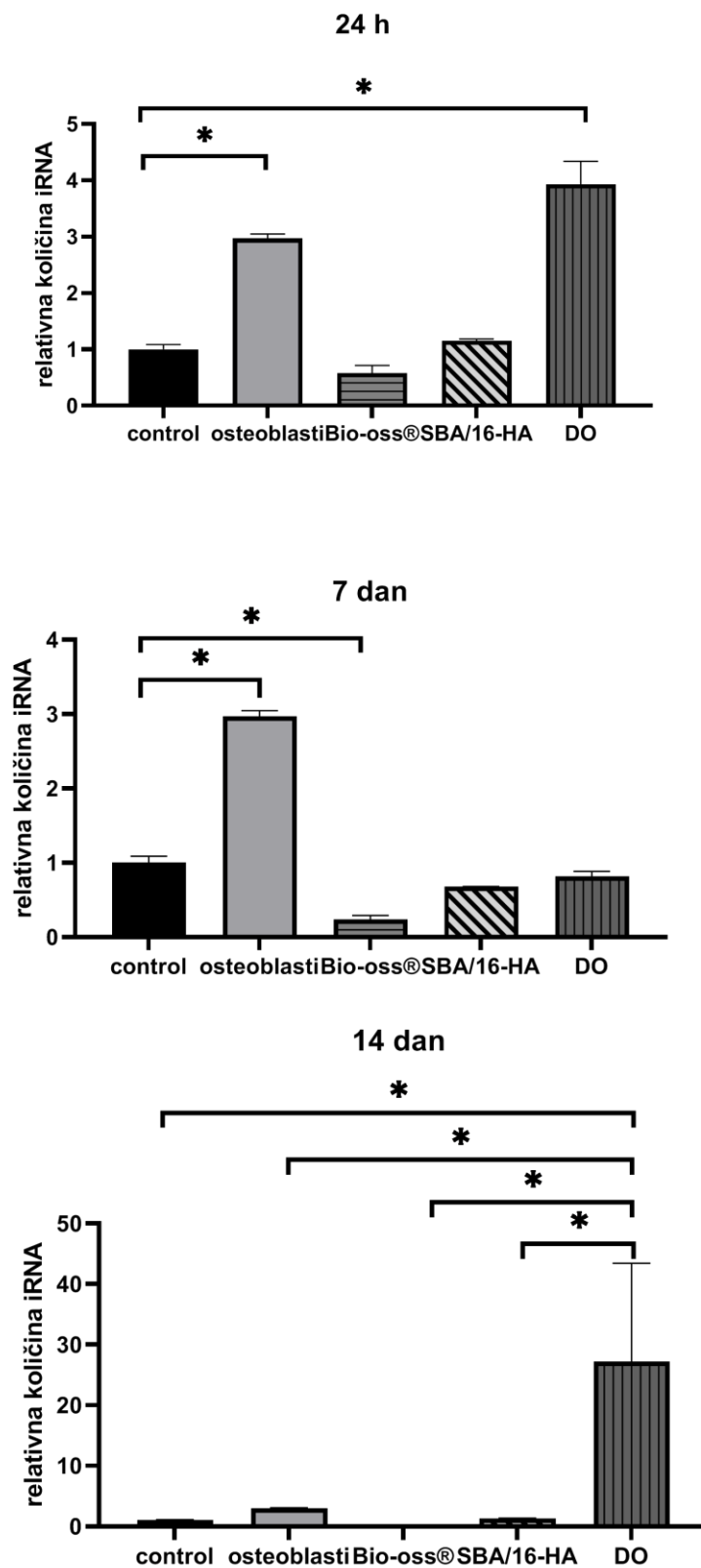
##### 4.9.1 Ekspimiranost *ALPL* gena u SHED

Analizom ekspimiranosti *ALPL* gena u SHED kod uzoraka tretiranih ekstraktima ispitivanih materijala starim 24 časa, uočeno je da je u DO grupi došlo do statistički znatnog povećanja ekspimiranosti u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 19A). Između kontrolne grupe i osteoblasta takođe je uočena statistički značajna povećana ekspresija kod grupe tretirane osteoblastičnim medijumom, što potvrđuje ranije pokazanu osteoblastičnu diferencijaciju matičnih ćelija. Ostale dve eksperimentalne grupe, SBA/16-HA i Bio-oss<sup>®</sup>, nisu pozitivno ekspimirale ovaj gen u poređenju sa grupom osteoblasta, što govori u prilog tome da ekstrakti ovih materijala nisu delovali osteoinduktivno na SHED.

Tretman ćelija ekstraktima materijala odstojalim 7 dana, pokazao je statistički značajnu razliku u stepenu ekspimiranosti gena *ALPL*. Došlo je do značajnog smanjenja ekspimiranosti ovog gena u Bio-oss<sup>®</sup> grupi (Slika 19B). Ćelije tretirane Bio-oss<sup>®</sup> materijalom, u sve tri vremenske grupe pokazuju nižu ekspimiranost *ALPL* gena u odnosu na kontrolnu grupu, međutim statistički značajna razlika se beleži samo u ovoj grupi tretiranoj ekstraktom starim 7. dana ( $p \leq 0.05$ ). Kada su u pitanju DO i SBA/16-HA grupa, one ne pokazuju statističku značajnost u ekspresiji ovog markera, međutim vrednosti ekspresije u obe grupe su niže od grupe osteoblasta, što znači da se ćelije nisu diferencirale u pravcu koštanih ćelija.

Uticaj tretmana na osteoinduktivnost ispitivanih ekstrakta materijala starih 14 dana na eksprimiranost *ALPL* gena na SHED nije dokazan u Bio-oss<sup>®</sup> i SBA/16-HA grupi (Slika 19C). Vrednosti koje su dobijene nisu bile više od onih u osteoblastičnoj grupi. Među poređenim grupama nije registrovana statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ). Međutim, DO grupa je pokazala statistički značajnu povećanu ekspresiju u odnosu na sve ispitivane grupe. Čelije tretirane ekstraktom dentinskih opiljaka u sve tri vremenske grupe (1., 7., i 14. dana) pokazuju najveću eksprimiranost ispitivanog gena, u poređenju sa druga dva materijala.

Posmatranjem Bio-oss<sup>®</sup> materijala primećuje se u svim eksperimentalnim grupama niža eksprimiranost *ALPL* gena u odnosu na kontrolnu i grupu osteoblasta. Ekstrakti ovog materijala nemaju osteoinduktivni efekat na SHED. Novosintetisani SBA/16-HA pokazuje relativnu vrednost ekspresije *ALPL* gena koja je niža, u odnosu na kontrolnu i grupu osteoblasta, 7. dana. Međutim, ekstrakti ovog materijala stari 1. i 14. dana, pokazuju povećanu eksprimiranost *ALPL* gena u odnosu na kontrolnu grupu, odnosno netretirane SHED. To znači da ovaj materijal dobija potencijal da diferentuje SHED ka koštanim ćelijama. Drugačiji trend eksprimiranosti *ALPL* gena pokazuje DO grupa ekstrakta starog 7. dana gde je relativna ekspresija bila niža u odnosu na kontrolnu i grupu osteoblasta. Ipak, do statistički značajnog povećanja eksprimiranosti *ALPL* gena u DO grupi došlo je u 1. i 14. danu.



Slika 19. Ekspimiranost *ALPL* gena u SHED. \* Statistički značajna razlika između grupa. Za statistički značajnu razliku uzeta je vrednost  $p < 0,05$ .

#### 4.9.2 Ekspimiranost *RUNX2* gena u SHED

Relativna ekspimiranost gena *RUNX2* u grupi ekstrakata ispitivanih materijala starih jedan dan je pokazala trend smanjenja u Bio-oss<sup>®</sup> i SBA/16-HA grupama, u odnosu na kontrolnu grupu. U te dve grupe je trend smanjenja ekspimiranosti bio statistički značajan (Slika 20A). Poređenjem kontrolne grupe i DO nije dokazana statistički značajna razlika ( $p \geq 0,05$ ). Međutim vrednost ekspresije *RUNX2* u DO grupi je bila viša od kontrolne grupe, što znači da tretman ima uticaja na pokretanje osteoindukcije ćelija. Između kontrolne grupe i osteoblasta takođe je uočena statistički značajna povećana ekspresija kod grupe tretirane osteoblastičnim medijumom, što potvrđuje ranije pokazanu osteoblastičnu diferencijaciju matičnih ćelija.

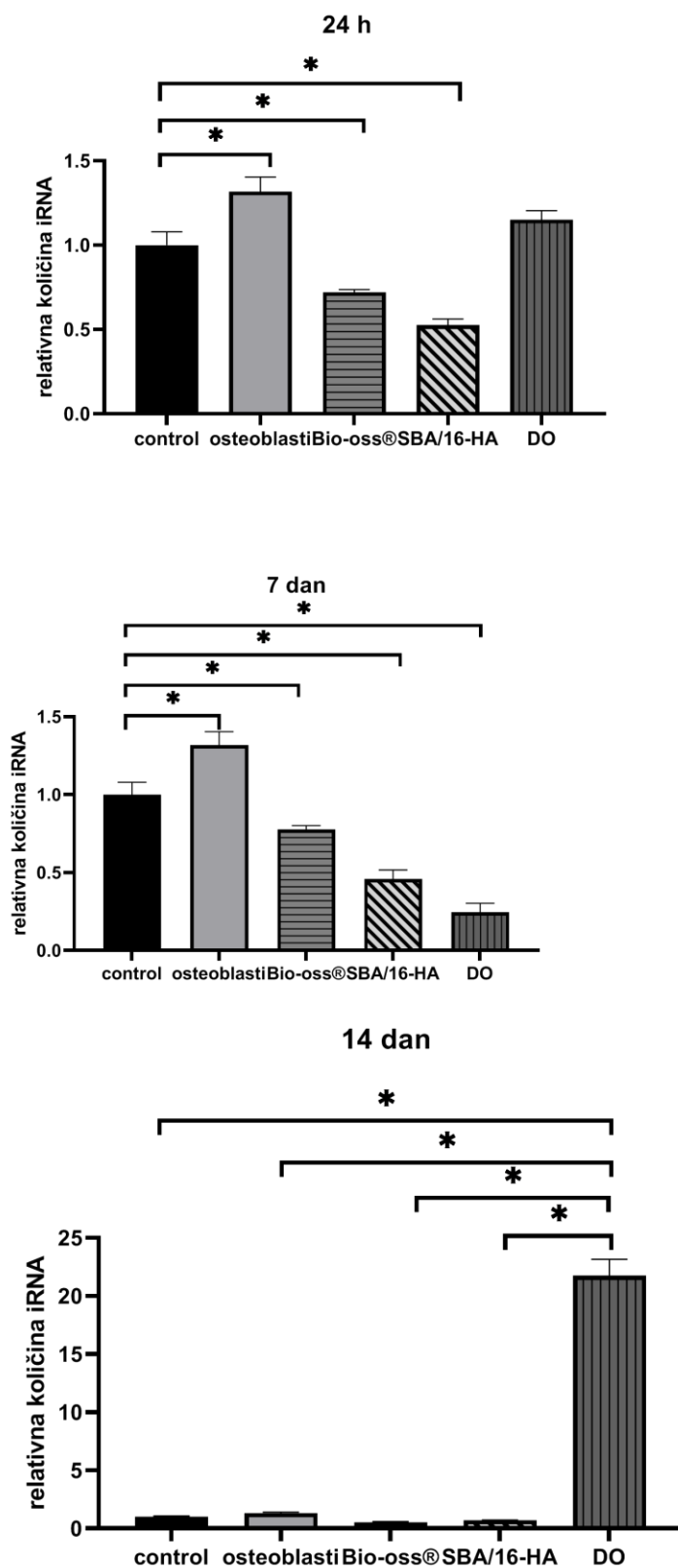
Uticaj tretmana ekstraktima starim 7 dana tri ispitivana materijala pokazao je statistički značajnu razliku među svim eksperimentalnim grupama u poređenju sa kontrolnom grupom ( $p < 0,05$ ). Izlaganje ćelija ekstraktima sva tri ispitivana materijala rezultovalo je smanjenim stepenom ekspimiranosti *RUNX2* gena (Slika 20B). Daljom obradom rezultata nije dokazano postojanje statistički značajne razlike unutar eksperimentalnih grupa ( $p > 0,05$ ).

U grupi gde su ćelije tretirane ekstraktima starim 14 dana došlo do statistički znatnog povećanja ekspimiranosti ispitivanog gena u DO grupi, u odnosu na kontrolnu i sve eksperimentalne grupe (Slika 20C). Razlika između ostalih analiziranih grupa nije bila statistički značajna. Nivo ekspimiranosti *RUNX2* gena u SBA/16-HA i Bio-oss<sup>®</sup> bio je niži od kontrolne grupe, što znači da ovi ekstrakti nisu imaju osteoinduktivnog efekta na SHED.

Izolovanim posmatranjem ispitivanih materijala pokazano je da Bio-oss<sup>®</sup> pokazuje u svim grupama nižu ekspimiranost *RUNX2* gena u odnosu na kontrolnu i grupu osteoblasta. Novosintetisani SBA/16-HA pokazuje trend kretanja ekspimiranosti koji ima Bio-oss<sup>®</sup> grupa. U svim ispitivanim grupama relativna vrednost ekspresije



*RUNX2* gena je niža u odnosu na kontrolnu i grupu osteoblasta. Drugačiji trend eksprimiranosti *RUNX2* gena pokazuju samo DO grupe, gde u 1. i 14. danu postoji povećana ekspresija gena u poređenju sa na kontrolnom i grupom osteoblasta, dok je 7. dana ona snižena.



Slika 20. Ekspimiranost *RUNX2* gena u SHED. \* Statistički značajna razlika između grupa. Za statistički značajnu razliku uzeta je vrednost  $p < 0,05$ .

## 5. DISKUSIJA

Istraživanja na temu tkivnog inženjeringa usredsređuju svoje napore na obezbeđivanje trodimenzionalnog okruženja, iliti skafolda, za vezivanje i rast ćelija, u nadi da će idealno oponašati okruženje *in vivo*, i da će se stvoriti željeni tip tkiva. Cilj tkivnog inženjeringa je sintetisanje trodimenzionalnog skafolda koji nosi ćelije, i kao takav se može implantirati u telo u terapijske svrhe ili u svrhu nadoknade tkiva u slučaju defekata. Standardni sistem kultivacije ćelija *in vitro* gde se ćelije uzgajaju u monosloju na naelektrisanjoj, ravnoj, plastičnoj površini – ne može da imitira složenost prirodnog okruženja ćelija u funkcionalnom tkivu. Međutim, obezbeđivanjem odgovarajućeg skafolda može doći do razvoja funkcionalnog tkiva (142).

Sfera istraživanja ove doktorske disertacije obuhvatila je ispitivanje uticaja različitih biomaterijala na diferencijaciju mezenhimalnih ćelija izolovanih iz SHED. Istraživanje je od značaja sa aspekta koštano tkivnog inženjeringa s obzirom da su ispitana biokompatibilna i osteoinduktivna svojstva tri biomaterijala koji se potencijalno mogu koristiti u regenerativnoj medicini. Rezultati ove doktorske disertacije daju doprinos u oblasti proučavanja osteoplastičnog diferencionog potencijala SHED kao jednog od značajnih činioca koštano-tkivnog inženjerstva. Ispitivanje diferencijalnog kapaciteta ćelija zubne pulpe u pravcu osteoblasta na skafoldima otvara nove mogućnosti u terapiji trauma, tumora, karijesa i parodontalnih oboljenja. SHED imaju potencijal za upotrebu u oralnoj i parodontalnoj hirurgiji zbog mogućnosti diferencijacije u osteoblaste. Ove ćelije imaju mogućnost diferencijacije i u druge ćelijske linije, kao što su hondrociti, adipociti, neuroni/glije, glatke i skeletne mišićne ćelije, melanocyte i endotelne ćelije, pa je njihova upotreba moguća u mnogim granama medicine. Važna činjenica je da su SHED lako dostupne i da je metod njihove izolacije neinvazivan i bezbolan za donora, te zubna pulpa u perspektivi može postati izvor ćelija koje se mogu krioprezervirati u bankama matičnih ćelija.

## 5.1 Diskusija primenjene metodologije

### 5.1.1 Diskusija metode izolacije SHED

Mezenhimalne matične ćelije zubne pulpe moguće je izolovati iz stalnih ili mlečnih zuba. Za potrebe ove doktorske disertacije ćelije su izolovane iz zubne pulpe mlečnih zuba u fiziološkoj smeni. Prednost koju one imaju jeste neinvazivna metoda dobijanja tkiva, i lak pristup ekstirpaciji pulpe zbog resorbovanog korena mlečnog zuba. Vađenje pulpe iz klice umanjaka zahteva upotrebu svrdala i posledično stvaranje toplote, koja može da ošteti kvalitet dobijenog tkiva. Pri takvoj obimnoj manipulaciji lako dolazi i do kontaminacije uzorka. Kada se izoluje pulpa mlečnih zuba, tkivo se ručno obrađuje u potpuno sterilnim uslovima nerv iglom ili ekskavatorom, i mogućnost kontaminacije se svodi na minimum.

*Hilkens* i sar. su upoređivali dve najčešće primenjivane metode izolacije matičnih ćelije zubne pulpe, odnosno metodu enzimske digestije, kojom se zubna pulpa podvrgava enzimima dispaze i kolagenaze da bi se dobila suspenzija pojedinačnih ćelija i takozvana „metoda eksplanta“, kojom se matičnim ćelijama dozvoljava da izrastu iz malih komada tkiva zubne pulpe (139). *Grontos* i sar. (12, 122), koji su prvi opisali matične ćelije zubne pulpe i njihov potencijal diferencijacije, primenili su metod enzimske digestije. Istraživačke grupe koje su uglavnom istraživale različite aspekte fiziologije ćelija pulpe i ćelija koje formiraju minerale *in vitro* koristile su metodu eksplanta (134, 137, 143, 144). Ove dve metode izolacije su upoređene već 2006., ali uslovi kultivacije između dve metode izolacije ćelija nisu bili isti: DPSC-enzimski dobijen je kultivisan u MEM sa 20% FBS, dok je DPSC-eksplant rastao u DMEM sa 10% FBS (134). Ne možemo isključiti činjenicu da su varijacije koje su uočene između različitih metoda izolacije uzrokovane upotrebom različitih medijuma za kultivaciju. *Bakopoulou* i sar. (138) su u poređenju dentalnih matičnih ćelija mlečnih zuba koristili takođe medijum za kulturu koji se razlikovao između enzimski i eksplantski dobijenih ćelija. U većini dostupnih studija uključujući i našu, tkivo pulpe se ne tretira nikakvim enzimima pre nego što se stavi u kulturu. Glavna prednost metode eksplanta je u jednostavnosti izvođenja i niskoj ceni izvođenja metode, jer nisu potrebni enzimi za rad.

Njen nedostatak je duži vremenski period (oko tri nedelje) koji je potreban da bi dovoljan broj ćelija migrirao iz tkiva, i dostigao subkonfluentnost za tripsinizaciju.

Prednost SHED u odnosu na matične ćelije dobijene iz adultnih tkiva je u njihovoj visokoj proliferativnoj i klonogenoj sposobnosti (145). S obzirom da proliferišu mnogo brže od adultnih matičnih ćelija poreklom iz drugih tkiva, pretpostavlja se da su ove ćelije manje zrele i da postoji mogućnost njihove diferencijacije u više različitih tipova tkiva (130). Sve navedene prednosti, kao i ona da predstavljaju lako dostupan izvor ćelija, proširuju mogućnosti upotrebe SHED u terapijske svrhe u tkivnom inženjeringu. Višestruke prednosti SHED bi naročito došle do izražaja osnivanjem banki matičnih ćelija. Za razliku od embrionalnih ćelija, one nisu predmet etičkih dilema, njihovo prikupljanje i izolovanje je jednostavno i bezbolno. Kada su ove ćelije u pitanju ne postoji mogućnost odbacivanja od strane organizma jer pripadaju grupi autolognih transplanata. Kod ljudi, zamena mlečne denticije stalnom, u proseku traje između šest i sedam godina što mlečne zube svrstava u dostupan izvor mezenhimalnih ćelija na duži period (146).

U pogledu ćelijske morfologije, u enzimski dobijenim ćelijama i kulturi eksplanta primećene su izdužene ćelije slične fibroblastima (139). Međutim, uočeno je da enzimska digestija dovodi do heterogenije ćelijske populacije, na osnovu prisustva kuboidnih i poligonalnih ćelija. Ova zapažanja su takođe ranije izneli *Bakopoulou* i sar. (138) u vezi sa matičnim ćelijama dobijenim iz humanih mlečnih zuba. Enzimskom digestijom se izoluju ćelije slične fibroblastima ali oslobađaju se endotelne ćelije i periciti, dok se metodom eksplanta dobija homogenija populacija ćelija sličnih fibroblastima.

### 5.1.2 Dikusija izbora materijala uključenih u ispitivanje

Termin „tkivni inženjering“ znači „primenu principa i metoda inženjeringa, i nauke o životu ka fundamentalnom razumevanju odnosa strukture i funkcije u fiziološkim i patološkim tkivima sisara, u razvoju substrata za obnavljanje, održavanje ili unapređivanje funkcije tkiva” (5). Oblast tkivnog inženjerstva je multidisciplinarna i oslanja se na stručnjake iz kliničke medicine, mašinstva, nauke o materijalima, genetike i prirodnih nauka. Ovo polje nauke se u velikoj meri oslanja na upotrebu poroznih 3D

skafolda (nosača) kako bi se obezbedilo odgovarajuće okruženje za regeneraciju tkiva i organa. Skafoldi zapravo čine šablon za formiranje tkiva i na njih su obično zasejane ćelije i/ili faktori rasta. Kombinacija skafolda i ćelija se kultiviše *in vitro* da bi se sintetisala tkiva koja se zatim mogu implantirati na povređeno mesto, ili se implantiraju direktno u povređeno mesto, gde se *in vivo* indukuje regeneracija tkiva ili organa.

Bez obzira na tip tkiva koji se nadoknađuje, kada se dizajnira skafold bitno je razmotriti sledećih par karakteristika. Prvi kriterijum bilo kog skafolda za tkivno inženjerstvo je da mora biti biokompatibilan; ćelije moraju da prijanjaju, funkcionišu normalno i da migriraju na površinu i kroz skafold. Nakon implantacije, skafold ili konstrukcija skafold-ćelije moraju da izazovu zanemarljivu imunološku reakciju. Potrebno je izbeći jak inflamatorni odgovor kako ne bi došlo do odbacivanja od strane organizma ili usporenog zarastanja (147).

Cilj tkivnog inženjeringa je da omogući ćelijama organizma, da tokom vremena izvrše razgradnju i zamenu implantiranog skafolda. Skafoldi i njihova kombinacija sa ćelijama nije predviđena kao trajni implantat. Stoga skafold mora biti biorazgradiv kako bi se omogućilo ćelijama da proizvode sopstveni ekstracelularni matriks. Nusproizvodi ove degradacije takođe treba da budu netoksični i da njihova eliminacija iz organizma bude bez interakcije sa drugim organima. Da bi se omogućila degradacija istovremeno sa formiranjem tkiva, potreban je blagi inflamatorni odgovor sa kontrolisanom infuzijom ćelija kao što su makrofagi. U današnje vreme kada tkivni inženjering rutinski ulazi u kliničku praksu, polje imunologije počinje da igra sve veću ulogu u oblasti istraživanja (148, 149).

U idealnom slučaju, skafold treba da ima mehanička svojstva koja anatomski odgovaraju mestu u koje se implantira. Posmatrajući skafold i iz praktične perspektive, on mora biti dovoljno čvrst da omogući lako hirurško rukovanje tokom implantacije. Izrada skafolda sa adekvatnim mehaničkim svojstvima jedan je od velikih izazova u pokušaju da se rekonstruiše kost. Za koštano tkivo, implantirani skafold mora imati dovoljan mehanički integritet, koji funkcioniše od trenutka implantacije do završetka procesa remodeliranja (150). Dodatni izazov predstavljaju godine pacijenata kojima se implantira koštani zamenik; na primer, kod mladih osoba, prelomi normalno zarastaju za oko šest nedelja, pri čemu se potpuni mehanički integritet vraća tek otprilike godinu dana

nakon preloma, ali kod starijih osoba se brzina zarastanja usporava. Ovo se takođe mora uzeti u obzir pri projektovanju skafolda za ortopedske primene. Kako se ova oblast razvijala, previše fokusa je stavljeno na pokušaje da se razvije skafold sa mehaničkim svojstvima sličnim kosti. Mnogi materijali su proizvedeni sa dobrim mehaničkim svojstvima, ali nauštrb visoke poroznosti i mnogi materijali, koji su pokazali potencijal *in vitro*, nisu se pokazali kao zadovoljavajući kada su implantirani *in vivo* zbog nedovoljnog kapaciteta za razvijanje vaskularizacije. Jasno je da je ravnoteža između mehaničkih svojstava i porozne arhitekture važna, da omogući ćelijsku infiltraciju i vaskularizaciju koja je ključna za uspeh bilo kog skafolda.

Arhitektura skafolda koji se koristi za tkivno inženjerstvo je od kritične važnosti. Skafold treba da ima međusobno povezanu strukturu pora i visoku poroznost kako bi se osigurala ćelijska penetracija i adekvatna difuzija hranljivih materija do ćelija unutar konstrukcije i do vanćelijskog matriksa formiranog od ovih ćelija. Štaviše, potrebna je porozna međusobno povezana struktura koja omogućava difuziju otpadnih proizvoda iz skafolda, a proizvodi degradacije materijala trebalo da budu u stanju da se eliminišu iz organizma bez interakcije sa drugim organima i okolnim tkivima. Pitanje degradacije jezgra, koje proizilazi iz nedostatka vaskularizacije i uklanjanja otpada iz centra konstrukcije, predstavlja veliku nepoznanicu u oblasti tkivnog inženjeringa (151, 152). Druga ključna komponenta je prosečna veličina pora skafolda. Ćelije prvenstveno stupaju u interakciju sa skafoldom preko hemijskih grupa (liganada) na površini materijala. Skafoldi sintetisani od prirodnih ekstracelularnih materijala (npr. kolagen) prirodno poseduju ove ligande u obliku Arg-Gly-Asp (RGD) vezujućih sekvenci, dok skafoldi napravljeni od sintetičkih materijala stupaju u interakciju sa ćelijama preko liganada ugrađenih u procesu proizvodnje nosača. Na gustinu liganda utiče specifična površina, tj. raspoloživa površina unutar pore na koju ćelije mogu da prijanjaju. Ovo zavisi od gore spomenute prosečne veličine pora u skafoldu. Pore stoga moraju biti dovoljno velike da omoguće ćelijama da migriraju u strukturu, gde se na kraju vezuju za ligande unutar skafolda, ali dovoljno male da uspostave dovoljno visoku specifičnu površinu, što dovodi do minimalne gustine liganda kako bi se omogućilo efikasno vezivanje (153).



Da bi određen skafold napravljen za tkivni inženjering postao klinički i komercijalno održiv, trebalo bi da bude isplativ i trebalo bi da postoji mogućnost skaliranja, tj. povećanja od izrade jednog po jednog u istraživačkoj laboratoriji na proizvodnju u malim serijama (154). Razvoj proizvodnih procesa prema standardu dobre proizvodne prakse (eng. *good medical practice*, GMP) je od ključnog značaja za upotrebu novih skafolda u kliničkoj praksi (155). Drugi ključni faktor je definisanje načina na koji će proizvod biti isporučen i dostupan kliničaru. Kliničari obično preferiraju što jednostavnije procedure, bez potrebe za dodatnim hirurškim intervencijama kako bi sakupili ćelije nekoliko nedelja pre *in vitro* implantacije. Međutim, za neke tipove tkiva to nije moguće i potreban je *in vitro* inženjering skafolda i ćelija pre implantacije (147).

Biokeramički materijali (biokeramika) su grupa materijala koju čine specijalno dizajnirani materijali za popravku i rekonstrukciju oštećenih delova tela. Trenutna primena u kliničkoj praksi podrazumeva čvrste komade (koji se koriste, na primer, za rekonstrukciju koščica srednjeg uva ili kao komponente zglobnih proteza), prah i granule za nadoknadu koštanih defekata, premaze na metalnim zglobnim protezama i porozne skafolde. Na osnovu odgovora tkiva na materijal, biokeramika se može klasifikovati u tri velike porodice: skoro inertna (npr. cirkonijum), bioaktivna (npr. bioaktivno staklo) i keramika koja se resorbuje (npr.  $\beta$ - i  $\alpha$ -trikalcijum fosfat (TCP)). Inertna keramika se generalno koristi kao implant za femoralne glave i acetabularne čašice pri zameni kuka, kao i za izradu zubnih implantata; međutim, ovi materijali se ne koriste kao skafoldi zbog svoje inertnosti koja pokreće formiranje „zaštitne“ fibrozne kapsule debljine 1 do 3 mm na površini implantata. Čak i ako nema agresivnog odgovora organizma domaćina na strano telo, ne postoji veza između implantata i tkiva domaćina (156). Sposobnost stvaranja stabilne veze sa tkivom domaćina je od primarnog značaja u izboru biokeramike za izradu skafolda. U tom smislu, bioaktivna i bioresorbilna keramika predstavlja bolje rešenje.

Kalcijum fosfati su među najrasprostranjenijom bioaktivnom keramikom za regeneraciju koštanog tkiva. Za to su zaslužna njihova izuzetna svojstva koja uključuju sličnost strukture i hemijskog sastava sa mineralnom fazom kosti, potom osteokonduktivnost, odnosno sposobnost obezbeđivanja podloge za migriranje koštanih ćelija, i vezivanja za tkivo domaćina bez formiranja ožiljnog tkiva (157).

U poslednjoj deceniji, veliko interesovanje je posvećeno nano-hidroksiapatitu (HAP) za inženjering koštanog i zubnog tkiva zbog njegovog specifičnog hemijskog sastava koji odgovara prirodnim mineralnim kristalima kosti. Čelije i vlakna su klasifikovane kao organska jedinjenja, dok je HAP neorgansko jedinjenje u kostima i zubima koje okružuje kolagene fibrile u ekstracelularnom matriksu (ECM) stvarajući tvrdo koštano/zubno tkivo (158, 159, 160). Prava kombinacija organsko-neorganskih jedinjenja čini kost izdržljivom i otpornom (158). HA je prirodni mineralni oblik kalcijum apatita. Takođe je poznat kao kalcijum hidroksid fosfat sa hemijskom formulom  $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$ . Pošto je HAP glavna komponenta tvrdih tkiva kao što su zubi i kosti, biokompatibilnost HAP (svojstvo da prožima organski matriks kosti) i njegovih različitih funkcionalnih derivata sa različitim morfologijama čini ga savršenim kandidatom za regeneraciju kostiju u medicini i stomatologiji (161, 162, 163). Sintetički HAP ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) ima stehiometrijski odnos kalcijum/fosfor od 1.67 i, sa kristalografske tačke gledišta, predstavlja kalcijum-fosfatnu fazu najbližnju prirodnom koštanom apatitu. Naši rezultati EDS analize čestica SBA-16/HA nanokompozita pokazuju stehiometrijski odnos kalcijuma i fosfora koji odgovara onom iz literature. Zbog svoje odlične biokompatibilnosti i osteoprovodljivosti, HAP se uspešno koristi kao zamenik kostiju u obliku cementa, granula i u obliku premaza na metalnim zglobnim protezama. Međutim, njegova upotreba kao materijala za skafolde je ograničena zbog niskih mehaničkih svojstava i sporog stepena resorpcije (164). Uobičajeni nedostatak za svu biokeramiku od kalcijum fosfata koja se proizvodi u poroznom obliku jesu njihova niska mehanička svojstva koja u velikoj meri ograničavaju njihovu kliničku upotrebu na delove skeleta koji ne nose veće opterećenje. Skafoldi od kalcijum fosfata često konsoliduju postupkom sinterovanja koje ne može dovesti do potpunog zgušnjavanja materijala. Kombinacija biokeramike sa drugim materijalima, i stvaranje kompozita, pogodniji su za izradu čvrstih skafolda (165).

Silika, silicijum dioksid ( $\text{SiO}_2$ ) se pokazala kao biokompatibilan i bioaktivan materijal, i time postala dobar kandidat za poboljšanje bioaktivnosti drugih materijala (166, 167). Otkriveno je da silanolne grupe u silicijum dioksidu (već prisutne ili novoformirane) obezbeđuju dobra mesta nukleacije za HAP ne direktno, već kroz

formiranje kalcijum silikata i amornog kalcijum fosfata sa niskim atomskim odnosom Ca/P (168, 169).

Komercijalni goveđi zamenik Bio-oss<sup>®</sup> (*Geistlich Pharma AG, Volhusen, Švajcarska*) je široko korišćen i istraženi ksenograft koji se koristi u postupcima regeneracije kosti. Napravljen je od anorganske goveđe kosti i ima osteoprovodna svojstva (170). Mnoge studije su pokazale da se upotrebom ovog materijala može postići predvidljiva i pouzdana regeneracija kostiju (171, 172). Zbog toga je u našoj studiji korišćen kao pozitivna kontrola.

Što se tiče upotrebe čvrstih zubnih tkiva u regenerativnoj medicini, nedavno su postali vrlo aktuelni. Komponente zuba su vrlo slične onima u alveolarnoj kosti (40, 41). Dentinski matriks sadrži BMP kao organsku supstancu, pa ima određenu osteoinduktivnost (173). Zabeležene su brojne studije na različitim ćelijskim linijama gde su čestice dentina pokazane kao jedan od najpogodnijih supstituenata za regeneraciju kostiju (174, 175, 176).

### 5.1.3 Diskusija metodologije ispitivanja biokompatibilnosti

Kako bi se ispitao citotoksični efekat novosintetisanih materijala, koriste se testovi biokompatibilnosti. Ti testovi se mogu izvoditi na kulturama ćelija ili tkiva (*in vitro*), kao i implantacijom u potkožno vezivno tkivo, masno tkivo ili kosti eksperimentalnih životinja (*in vivo*) (177). Zbog jednostavnosti izvođenja, *in vitro* ispitivanja na kulturama ćelija su polazna tačka za procenu biološkog odgovora novosintetisanih materijala. Jedini nedostatak ovih ispitivanja je nemogućnost potpunog oponašanja uslova koji se dešavaju *in vivo* pri implementaciji materijala. Sa druge strane *in vitro* ispitivanja imaju mnogo prednosti među kojima su velika osetljivost kultura ćelija na toksične agense, mogućnost ispitivanja interakcija na ćelijskom nivou, kao i mogućnost ponavljanja eksperimenata pod istim uslovima iznova. Ispitivanja na kulturi ćelija predstavljaju pojednostavljene *in vivo* mehanizme reakcija koje se dešavaju pri ugradnji materijala (178).

Za ispitivanje biokompatibilnosti postoji veliki broj testova. Rezultati ispitivanja citotoksičnosti zavise pre svega od izbora kulture ćelija i testova. Veći broj testova i

ćelijskih linija su korisni za preciznije ispitivanje citotoksičnosti materijala. Upravo zbog toga, u ovoj doktorskoj disertaciji je korišćena ćelijska kultura pulpe mlečnih zuba i rađena su dva testa za ispitivanje citotoksičnosti- MTT i DET.

Za ispitivanje biokompatibilnosti materijala na ćelijama najčešće se priprema ekstrakt tih supstanci u medijumu za kultivaciju ćelija (179). Korišćenje praškastih i granuliranih materijala direktno na ćelijama otežava očitavanje apsorbance na mikroplejt čitaču, koji radi na principu spektrofotometrije. Stoga, uzorci materijala su ranije pripremljeni i sterilisani pre upotrebe.

Kolorimetrijski metil-tiazol-tetrazolijum (MTT) test se najčešće koristi kao test za procenu citotoksičnosti novih biomaterijala u kulturama ćelija (180). Ovaj test se zasniva na sposobnosti živih ćelija da redukuju 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazol bromid (MTT), tetrazolijumovu so, rastvorljivu u vodi, žute boje u nerastvorljivi ljubičasti formazan. Ova reakcija se može dogoditi samo u metabolički aktivnim ćelijama, a količina stvorenog formazana je u korelaciji sa brojem živih i metabolički aktivnih ćelija (141). *Fotakis* i sar. u svom istraživanju navode da je MTT test najpouzdaniji u otkrivanju rane citotoksičnosti. Prednosti ovog testa u odnosu na druge su jednostavnost, tačnost, pouzdanost i brzina (181). Mi smo MTT testom merili citotoksičnost ispitivanih materijala nakon 24h izlaganja ćelija ekstraktima materijala starih 24h, 7 i 14 dana. Zapravo, merili smo metaboličku aktivnost ćelija tokom vremena, koristeći vrednost apsorbancije, kao indirektni pokazatelj proliferacije ćelija. Ćelijski odgovori na testirane materijale u MTT testu mogu zavisi od mnogih faktora, bilo da je korišćen svež ili prethodno pripremljeni materijal, ili u zavisnosti da li je došlo do direktnog kontakta ili ekstrakata materijala sa ćelijama, i od koncentracije materijala u medijumu za kulturu (182).

Test odbacivanja boje (DET test) je jednostavan i brz test koji se koristi za određivanje broja vijabilnih ćelija. Princip testa se zasniva na tome da vijabilne ćelije imaju intaktnu ćelijsku membranu i da je tripan plavo boji onemogućen prodor unutar ćelije. Vijabilne ćelije zadržavaju žućkastu boju, dok se mrtve ćelije boje u ljubičastu (183). Mane ovog testa su subjektivnost, zbog toga što istraživač broji ćelije u komori, kao i procenjivanje vijabilnosti ćelija isključivo na osnovu intaktnosti ćelijske membrane.

*Black* i *Berenbaum* su još 1964. godine u svom istraživanju zaključili da četiri faktora mogu uticati na rezultate DET testa i to koncentracija ćelija u rastvoru, koncentracija boje, vreme bojenja i koncentracija seruma (184).

## 5.2 Diskusija dobijenih rezultata

### 5.2.1 Diskusija morfologije izolovanih ćelija

Morfološke osobine ćelija koje smo izolovali su odgovarale osobinama mezenhimalnih matičnih ćelija zubne pulpe, budući da su adherirale za plastiku i rasle formirajući diskretne kolonije. Primarna kultura se sastojala iz morfološki homogenih adherentnih ćelija vretenastog oblika. Ćelije se bile slične fibroblastima i odgovarale su osobinama ranije opisanih izolovanih matičnih ćelija zubne pulpe (130).

Izolovane SHED su i nakon nekoliko pasaža zadržale zadovoljavaje kriterijume Komiteta za mezenihmalne stem ćelije Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju, budući da su ove ćelije rasle kao adherentne ćelije na plastičnoj podlozi, ispoljavajući karakteristične mezenhimske markere, i nisu bile kontaminirane ćelijama hematopoetskih linija (87).

### 5.2.2 Diskusija rezultata testa formiranja kolonija- CFU-F test

Najbolji test za procenu proliferativnog efekta izolovane primarne ćelijske kulture je test formiranja kolonija tokom dugotrajne kultivacije malog broja ćelija. *Menicanin* i sar. su pokazali da u adekvatnim uslovima kolonija nastaje od jedne ćelije, te da su sve ćelije potomci u koloniji zapravo klonovi one primarne (185). Ćelije niskih pasaža formiraju multipotentne, bipotentne ili unipotentne ćelije potomke sa velikim proliferativnim potencijalom. Ovaj test je dobar, jer ukoliko ćelija niske pasaže nije primitivna i multipotentna, njenim presađivanjem kultura neće nastaviti da se umnožava, zbog neadekvatnog proliferativnog potencijala. Ovaj test pokazuje koji broj ćelija u *in vitro* uslovima ima značajan proliferativni potencijal, odnosno koje su ćelije multipotentni progenitori.

Naprimjer, matične ćelije koštane srži ne mogu formirati adherentne kolonije, već se one detektuju *in vitro* samo indirektno, u suspenziji kulture u kojoj proliferišu, tokom dužeg vremena. Test formiranja kolonija hematopoetskih ćelija ima klinički značaj jer učestalost i broj progenitora korelira sa uspehom transplantacije koštane srži (186). Vodeći se tom činjenicom, učestalost CFU kolonija bi trebalo da pokazuje potencijal pojedinih tkiva u pogledu mogućnosti produkcije zadovoljavajućeg broja ćelija koje se mogu iskoristiti za ćelijsku terapiju. S obzirom da su naše ćelije izolovane metodom tkivnog eksplanta, broj kolonija je određen tek nakon prve pasaže, kada su ćelije dostigle dovoljan broj migracijom iz fragmenta pulpe. Prosečan broj CFU kolonija na 10000 zasejanih ćelija prve pasaže bio je  $450 \pm 4$ . Naš rezultat je u skladu sa rezultatima drugih autora (12, 187).

### 5.2.3 Diskusija rezultata protočne citometrije

Izolacijom ćelija zubne pulpe mlečnih zuba dokazali smo da poseduju karakterističnu morfologiju i svojstvo adhezije za plastiku. Time su delimično ispunile kriterijume koje treba da imaju matične ćelije (87). Ispitivanje fenotipa, odnosno ekspresije površinskih markera koje ćelije ekspimiraju je takođe jedan od kriterijuma za uspešnu izolaciju matičnih ćelija. Naši rezultati su pokazali da je ekspresija CD73, CD90 i CD105, homogena u izolovanoj populaciji SHED. U odnosu na ekspresiju CD45 i CD235a, kultivisane ćelije su bile heterogene i manje od 5% ćelija je ekspimiralo te markere. SHED nisu ekspimirale CD34 antigen, karakterističan za nezrele ćelije hematopoetske loze. Akcenat na ovom antigenu je mnogo veći prilikom izolacije matičnih ćelija iz koštane srži, s obzirom da se prilikom uzorkovanja ćelija iz tog izvora, uvek dobije populacija koja sadrži i hematopetske matične ćelije. Bez obzira na način izolacije primarne ćelijske populacije iz zubne pulpe mlečnih zuba, svi do sada opisani postupci, kao rezultat imaju umnožavanje populacije ćelija koja je heterogena po svom fenotipu (130, 131). Odsustvo pozitivnosti za hematopoetski marker CD45, koji je označen kao leukocitni, monocitni i antigen T-ćelija, sugeriše da unutar izolovanih ćelija pulpe mlečnih zuba hematopoetski progenitori nisu prisutni (123). Nadalje, kako bismo bili sigurni da SHED nisu kontaminirane drugim ćelijama, koristili smo i marker CD235a

za isključivanje prisustva hematopoetskih ćelija, konkretno humanih crvenih krvnih zrnaca i eritroidnih prekursora (188). Pretpostavka je da smo metodom tkivnog eksplanta izolovali populaciju ćelija koju u malom procentu sačinjavaju ćelije krvne loze i to je u skladu sa sve većim brojem literaturnih podataka (189, 190). Ono što bi se sa velikim stepenom sigurnosti moglo tvrditi jeste da izolovanu populaciju ćelija čine multipotentni progenitori koji ne ekspimiraju markere matičnih ćelija hematopoeze.

CD73 ima funkciju molekula za ćelijsku adheziju i posrednika u vezivanju limfocita za endotelne ćelije. CD73 se zbog toga ekspimirira u mezenhimalnim matičnim ćelijama. CD90 (Thy-1) je glikozilfosfatidilinositol (GPI) glikoprotein ekspimiran uglavnom u leukocitima i uključen u interakcije ćelija-ćelija i ćelija-matriks. CD90 se ekspimirira u mezenhimskim matičnim ćelijama dobijenim iz koštane srži (191). CD105, takođe poznat kao endoglin, je homodimerni membranski glikoprotein prvenstveno prisutan u endotelijumu krvnih sudova čoveka. Endoglin je komponenta kompleksa receptora transformišućeg faktora rasta-beta ( $TGF\beta$ ), i ekspimirira se u matičnim mezenhimalnim ćelijama. CD105 pozitivne ćelije zubne pulpe pokazuju visoku aktivnost proliferacije i migracije, i potencijal ka diferencijaciji u više linija (191).

Mora se napomenuti da se pozitivnost ili negativnost markera u protočnoj citometriji ne može koristiti kao krajnja potvrda porekla matičnih ćelija, te se povećanjem broja proučavanih markera može sa većom tačnošću proceniti poreklo ćelija (192).

#### **5.2.4 Diskusija sinteze i rezultata karakterizacije materijala SBA-16/HA**

U našoj studiji, procenili smo potencijal SBA-16/HA kao biomaterijala za aplikacije u tkivnom inženjeringu. Dobro je poznato da multifunkcionalne nanočestice zasnovane na silicijum dioksidu i hidroksiapatitu koje sadrže polimere koji dobro reaguju na stimulanse, čine obećavajući materijal za upotrebu u biomedicinskim aplikacijama. Ovaj materijal je pokazao sinergističke efekte za regeneraciju kostiju, kontrolisanu isporuku lekova i dijagnostiku (193).

Značaj korišćenja odgovarajuće metodologije karakterizacije je očigledan, jer je svaki novi nanomaterijal specifičan (194). Kao što je prikazano u rezultatima na skanirajućem elektronskom mikroskopu uočena je morfologija čestica sfernog oblika.

Prečnik najmanje čestice je oko 2  $\mu\text{m}$ , dok je prečnik najvećih oko 5  $\mu\text{m}$ . Ove čestice spajaju se jedna s drugom i teže da formiraju aglomerate od 10 do 60  $\mu\text{m}$  veličine unutar etanolne disperzije. Međutim, otkriveno je prisustvo i malih pahuljastih HA kristala oko polu-sfernih čestica SBA-16. *Li i sar.* (195) su u sličnoj studiji posmatrali tanjirastu morfologiju nukleotidnih apatita sa česticama veličine od 10–60  $\mu\text{m}$  i prosečnog obima od 27  $\mu\text{m}$ . Slične vrednosti veličine čestica (prosečnog prečnika od 2.44  $\mu\text{m}$ ) su pokazane i kod drugih autora u radovima u vezi sa apatitnim biomimetskim strukturama (195). Morfologija čestica koje su oni sintetisali izgleda veoma slično morfologiji dobijenoj u ovoj studiji (196). Dobijeni rezultat upućuje da se vrlo brzo može očekivati proces naseljavanja progenitorskih ćelija na površini takvog skafolda, njihova veoma brza diferencijacija u osteoblastne ćelije i brza oseintegracija nakon toga. Rezultati SWAXS merenja i XRD ukazuju na uspešno formiranje kristala HA, kao jedne kristalne faze unutar SBA-16 sistema. Ovi rezultati su u skladu sa ranije opisanim istraživanjima *El Boujadi i sar.* (197). FTIR analiza je urađena da bi se odredio hemijski sastav i ispitalo prisustvo vibraconih traka tipičnih za ovaj tip jedinjenja i spektra uzoraka SBA-16 i SBA-16/HA. FTIR analiza zajedno sa kvalitativnom elementarnom analizom (EDS) potvrđuje formiranje HA deficijentnog Ca ( $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ,  $0 < x < 1$ ) - SBA-16 kompozita. Ovaj SBA-16/HA kompozit sa nedostatkom Ca već je našao svoju primenu u isporuci lekova (198, 199, 200).

### 5.2.5 Diskusija rezultata biokompatibilnosti- MTT test

Rezultati MTT testa pokazuju da nisu pronađeni dokazi o citotoksičnosti HA/SBA-16. Ćelije su zadržale proliferaciju tokom 24 sata inkubacije u sva tri mezoporozna ekstrakta. Ćelije su pokazale inicijalan skok proliferativnog efekta u ekstraktu starom jedan dan, da bi u onom nešto starijem od sedam dana pokazale rani apoptotički efekat. Apoptoza je genetski modifikovan mehanizam ćelijske smrti. Prate je različite morfološke promene poput nuklearne kondenzacije i fragmentacije, izolacije citoplazmatskih organela u diskretne regione, formiranja površinskih membranskih fleka i fragmentacije mrtvih ili umirućih ćelije u tela vezanih za membranu. Efekat rane apoptoze je opisan u ćelijama kao mehanizam privikavanja na novonastalu sredinu (201).



Međutim, u ekstraktu starom 14 dana ćelije su opet proliferisale i pokazale visoku stopu biokompatibilnosti. Dobijeni rezultati svedoče o biokompatibilnosti HA/SBA-16 na SHED.

Bio-oss<sup>®</sup> važi za zlatni standard među ksenograftima, i zbog toga je korišćen kao pozitivna kontrola u ovom ispitivanju. Sva tri ekstrakta Bio-oss<sup>®</sup> su imala proliferativni efekat na matične ćelije zubne pulpe. Ovi rezultati potvrđuju njegov superiorni efekat kada su komercijalni koštani zamenci u pitanju.

*Bono* i sar. otkrili su osteogeni potencijal čestica dentina u *in vitro* uslovima. Rezultati su pokazali da je koštana regeneracija bila bolja u defektima gde su postavljene čestice dentina u poređenju sa defektima gde je postavljan Bio-oss<sup>®</sup> (koji je zlatni standard kao materijal za kalemljenje u stomatološkoj praksi) (32). Naši rezultati se ne slažu sa rezultatima drugih autora (173, 175). Čestice dentina pokazale su statistički značajno nižu citokompatibilnost u poređenju sa kontrolom i Bio-oss<sup>®</sup> grupama. Razlog za to može pronaći u činjenici da je granulirani dentin hemijski obrađen radi postizanja sterilnosti, te je moguće da su neke od hemikalija iz tog procesa mogle zaostati. Takođe, postoji i uticaj veličine čestica materijala transplantata za regeneraciju kostiju. Veličina čestica je veoma važna za adheziju i proliferaciju ćelija, a sa druge strane za resorpciju materijala (173). Postoji razlika u veličini čestica kod svakog aparata koji se koristi za proizvodnju dentinskih opiljaka, pa tako sve dobijene čestice imaju različito ponašanje *in vivo* i dugoročne efekte. Zbog nepostojanja jasnih preporuka i dokaza o optimalnoj veličini čestica materijala za transplantaciju u koštanoj regeneraciji, to može biti razlog smanjene biokompatibilnosti, te bi čestice drugih veličina mogle imale bolje rezultate. U svakom slučaju, čestice dentina su na testu pokazale niži stepen biokompatibilnosti u poređenju sa komercijalnim supstratom koji se koristi za regeneraciju koštanih defekata u praksi.

### 5.2.6 Diskusija rezultata biokompatibilnosti- DET test

Srednja vrednost nivoa citotoksičnosti u svim grupama Bio-oss<sup>®</sup> materijala iznosila je -4.37%, što ukazuje na njegov generalni proliferativni efekat na ćelijsku kulturu pulpe zuba. Ovaj materijal pokazuje biokompatibilnost i na drugim ćelijskim

kulturama (202). Ksenografti poput Bio-oss<sup>®</sup> zahtevaju opsežnu pripremu kako bi se uklonila mogućnost transmisije bolesti. Ova obrada transplantata uništava osteoblaste i mnoge proteine prisutne u koštanom zameniku koji pospešuju zarastanje, ali ne utiče na biokompatibilnost materijala (203).

Visok stepen biokompatibilnosti pokazao je i SBA-16/HA, gde je prosečna vrednost indeksa citotoksičnosti bila -1.43%. Niske vrednosti citotoksičnosti su verovatno posledica visoke biokompatibilnosti oba sastojka biokompozitnog materijala. Efekat citotoksičnosti, ujedno i najveću vrednost citotoksičnosti, pokazao je samo ekstrakt dentinskih opiljaka u sve tri vremenske tačke, i iznosio je 12.75%. Efekat koji su dentinski opiljci imali na matične ćelije zubne pulpe, nije u skladu sa drugim istraživanjima, gde je on imao povoljan efekat na ćelije (175).

Rezultati biokompatibilnosti ukazuju na visok nivo stepena ćelijske kompatibilnosti za Bio-oss<sup>®</sup> i SBA-16/HA materijale, dok je on nešto niži za dentinske opiljke. Razlike u rezultatima merenja citotoksičnosti i prijanjanju ćelija na površine osteoinduktivnih biomaterijala su brojne, ali u svakom slučaju direktno povezane sa fenomenima interakcije između površine biomaterijala i ćelija. Površinske karakteristike biomaterijala, kao što su topografija i hemijski sastav ključne su za razumevanje takvih pojava (204).

### **5.2.6 Diskusija rezultata diferencijacije SHED u osteoblaste (Alizarin red bojanje)**

Matične ćelije zubne pulpe su definisane kao multipotentne ćelije sposobne za samoobnavljanje i za višelinijsku diferencijaciju. Ranije je dokazano da se te ćelije mogu stimulisati i diferencirati u više ćelijskih linija, kao što su adipociti, hondrociti i osteoblasti (205). Ova svojstva se mogu pokazati kao ključna za izolaciju SHED i njihovu naknadnu upotrebu kao izvora mnogih tipova ćelija u regenerativnoj i rekonstruktivnoj medicine, u cilju zamene izgubljenih ili oštećenih tkiva. Ćelije zubne pulpe se mogu smatrati populacijom mezenhimalnih matičnih ćelija (MMC) sličnih karakteristika kao i MMC izolovane iz koštane srži (206). Njihova velika prednost u odnosu na mnoge druge tipove ćelija za ćelijsku terapiju je to da su imunološki neutralne. Ovo ima važan značaj za terapijsku primenu budući da SHED potiču od zdravih davaoca,

i da se te ćelije mogu krioprezervirati, čime su blagovremeno dostupne za pacijenata (205).

Diferencijacija matičnih ćelija u osteoblaste se postiže izlaganjem ćelija niske pasaže specifičnim uslovima kultivacije. U literature postoji više načina za prevođenje ćelija. Najjednostavniji je kultivisanje multipotentnih ćelija najmanje 30 dana u MEM medijumu sa 20% FBS. *Mangano i sar.* su pokazali da FBS ispoljava aktivnost diferencijacije, favorizujući osteoblastnu diferencijaciju, kada se koristi u velikom procentu (207). Drugi način za indukciju osteoblastične diferencijacije, je kultivacija ćelija u MEM-u dopunjenom sa 10% FBS, 50 g/mL askorbinske kiseline i  $10^{-8}$  M deksametazona. Pristustvo kortikosteroida i askorbinske kiseline u navedenim koncentracijama izaziva diferencijaciju ćelija zubne pulpe u osteoblaste (205). Treći mogući način diferencijacije, koji smo i mi koristili, podrazumeva dodavanje 2 mM beta-glicerofosfata u tu smešu. Medijum za diferencijaciju se dodaje ćelijama koje su dostigle subkonfluentnost, i proces prevođenja traje tri nedelje, uz menjanje medijuma na par dana (208).

Dokazivanje diferencijacije SHED u osteogenu lozu je složeno i postoji više načina za to. Najjednostavniji metod je bojenje kalcifikovanih komponenti ekstracelularnog matriksa. Alizarin crvena, istorijski važna boja koja se nekada koristila za proizvodnju „crvenih mantila“ britanskih vojnika, sada se koristi za dokazivanje prisustva nodusa bogatih kalcijumom koje proizvode ćelije u kulturi. Ovo bojenje služi kao standardna kolorimetrijska metoda za kvantitativno određivanje kalcijumovih depozita prisutnih u ćelijama osteogenog porekla, na osnovu čega se opisuje stepen mineralizacije koja prethodi formiranju ekstracelularnog matriksa zrele kosti. Međutim, ova metoda ne pokazuje specifičnu diferencijaciju SHED u osteoblastnu liniju. Pokazalo se da jednostavne manipulacije ćelijskom kulturom, poput dodavanja kalcijuma hranljivom medijumu za rast ćelija, imaju pozitivan rezultat na bojenje alizarin red bojom za samo 7 dana (209). Bojenjem ovom metodom pokazana je osteogena diferencijacija humanih mezenhimalnih ćelija zubne pulpe mlečnih inciziva i umnjaka (210). Očekivano, zbog veće sposobnosti diferencijacije, crveno obojenih kalcijumovih depozita je bilo značajno više u prisustvu osteoblasta poreklom iz pluripotentnih matičnih ćelija zubne pulpe mlečnih zuba nego u osteoblastima poreklom iz mezenhimalnih ćelija zubne

pulpe umnjaka istog donora (211). *Vakhrushev* i sar. su poredili sposobnost osteoblastne diferencijacije mezenhimalnih ćelija zubne pulpe mlečnih zuba i mezenhimalnih ćelija poreklom iz koštane srži, bojeći ih alizarin crvenom bojom. Rezultati su pokazali da nakon 8 dana kultivisanja u osteogenom medijumu, kod obe vrste ćelija se uočavaju područja sa visokom koncentracijom ćelija koje su za sebe vezale boju. Nakon 15 dana kultivisanja gustina ćelija se povećala, a na osnovu intenzivnijeg bojenja moglo se zaključiti da su ćelije u tom području aktivno akumulirale kalcijumove soli. Nakon 22 dana kultivisanja, kod obe vrste ćelija bio je vidljiv značajan broj područja sa osifikacijama koja su se odlikovala prisustvom ćelija sa tipičnom morfologijom osteoblasta i visokim sadržajem kalcijumovih soli u vakuolama. Ćelije su aktivno učestvovala u osteogenoj diferencijaciji. Na taj način autori su pokazali da SHED imaju osteogeni potencijal sličan osteogenom potencijalu mezenhimalnih ćelija poreklom iz koštane srži (212).

U našem istraživanju, tretman bojenja Alizarin crvenom bojom kulture ćelija gajenih u osteogenom medijumu 3 nedelje, pokazao je prisustvo obojenih kompleksa oko ćelija, koji odgovaraju kalcifikovanim nodusima, koje proizvode osteoblasti. Novodeponovani mineralizovani matriks je bio pokazatelj diferencijacije izolovanih mezenhimalnih ćelija u osteoblaste. Međutim, zbog nespecifičnosti ovog testa, urađena je i ekspresija gena specifičnih za osteoblastične ćelije.

### **5.2.7 Diskusija imunoflorescentnog bojanja**

Imunofluorescencija je tehnika koja koristi fluorescentno obeležena antitela za otkrivanje specifične mete- antigena na ćelijama. Indirektna imunofluorescencija podrazumeva tehniku u dva koraka, u kojoj se primarno, neobeleženo antitelo vezuje za antigen, nakon čega se drugo antitelo obeleženo fluoroforom (usmereno protiv Fc dela primarnog antitela) koristi se za otkrivanje prvog antitela. Ova tehnika je komplikovanija i zahteva duže vremena od direktne imunofluorescencije (jer zahteva duži period inkubacije); međutim, ona je senzitivna metoda jer se pojačava signal fluorescencije (213).

Kolageni čine familiju od 28 različitih složenih tipova lanaca, koji formiraju vezivno tkivo (214). Kolagen tipa I je najvažnija komponenta vanćelijskog matriksa koštanog tkiva i ima ulogu u adheziji, proliferaciji i diferencijaciji osteoblastnih ćelija, ali se može naći u drugim tkivima, pa se zato ne može smatrati usko specifičnim za koštano tkivo (215). Kolagen tipa I predstavlja važnu komponentu organskog dela koštanog matriksa, čija se ekspresija pokreće još u ranim stadijumima osteogeneze (215, 216). Kolagen tipa I je sastavljen od dva alfa 1 lanca i jednog alfa 2 lanaca (217). Alfa 1 lanac kolagena tipa I kodiran je *Coll1* genom (218). To je jedini protein koji je u razvoju koštanog tkiva zastupljeniji čak i od osteokalcina (219). On stvara osnovu za depoziciju minerala i s obzirom na to neophodan je za normalan razvoj kostiju (220). Ćelije tretirane medijumom za diferencijaciju ćelija u osteoblaste, eksprimirale su jaku imunopozitivnost ovog antetela, pri imunofluorescentom bojanju. I drugi autori govore o ranoj pozitivnosti ćelija pulpe na kolagen I. S obzirom da je on veoma važan strukturni protein ekstracelularnog matriksa, njegova povećana ekspresija u početnoj fazi sugerise da je on neophodan za kasnije deponovanje neorganskih kristala u mineralizovani matriks (221). U mnogim istraživanjima je opisana veza između povećanog ekstracelularnog matriksa i sinteze proteina, u ranim fazama osteogeneze gde je prisutna pozitivnost ćelija na kolagen I (222, 223).

Osteopontin je glikozilisani fosfoprotein koji je obilato prisutan u ekstracelularnom matriksu kostiju. On nije usko specifičan za koštano tkivo, već je široko rasprostranjen i u drugim tkivima, vezivnim i epitelnim, krvnom serumu i svim telesnim tečnostima. Njegova uloga je važna u procesima kao što su ćelijska adhezija i migracija, angiogeneza, antiapoptoza, imunološki odgovor, zapaljenje i zarastanje rana (224, 225). U fiziološkoj mineralizaciji koštanog tkiva, osteopontin se eksprimira u ćelijama koje su zadužene za remodeliranje kostiju (226). U tom procesu, osteopontin poreklom iz osteoklasta inhibira stvaranje hidroksiapatita (227, 228). Osteopontin vezuje veliku količinu  $Ca_2$ , iako ima ulogu u inhibiranju rasta kristala (229). U ovom istraživanju, imunofluorescentno bojanje pokazalo je umeren intenzitet pozitivnosti na osteopontin, kvalitativno ocenjen. Pozitivno ekprimiranje ovog antetela je prisutno i kod drugih autora, s obzirom da osteopontin igra važnu ulogu u početnim fazama formiranja matriksa i/ili kalcifikacije (230). Inicijalni događaj pri formiranju mineralizovanog matriksa je

akumulacija Ca<sub>2</sub> za koju je odgovoran osteopontin. Otkriveno je takođe da njegova ekspresija ne zavisi od upotrebe drugih materijala. Koristeći MTA (engl. *mineral trioxide aggregate*) u nekim studijama zabeležena je njegova ekspresija, pošto ga osteoblasti ekspimiraju fiziološki pri deponovanju mineralizovanog matriksa (231, 232).

Ki67 se koristi kao marker proliferacije ćelija. Izražen je tokom svih aktivnih faza ćelijskog ciklusa (G1, S, G2, M) osim G0 faze, i eksprimira se u jedru ćelija. Ovo antitelo se ističe među drugim markerima proliferacije ćelija jer nije specifično, već ono reaguje (tj. boji) sve ćelije u fazi proliferacije. Ovaj protein je konstantno ekspimiran u jedrima svih delecij ćelija, u svakom delu ćelijskog ciklusa, uz varijabilnost u G1 fazi i u ranoj S fazi kada je na niskom nivou. Njegova koncentracija raste tokom S i G2 faze, a najveća je tokom mitoze (233). Stepenn njegove ekspresije koristi se za određivanje statusa proliferacije ćelija (234). Ki67 antitelo se može odrediti pomoću nekoliko kvalitativnih i kvantitavnih metoda, kao što su: imunohistohemijske analize, elektronska mikroskopija, ELISA, protočna citometrija, imunocitohemija (235). U našem istraživanju korišćena je metoda imunofluorescencije. Wang i sar. su pokazali visok proliferativni kapacitet SHED ćelija, u odnosu na DPSC, jer su ekprimirale jače Ki67 antitelo (236). Matične ćelije koje se prevode u osteoblaste zadržavaju kapacitet umnožavanja, koji su imali pre izlaganja osteogenom medijumu. Slabiji intezitet pozitivnosti na Ki67 antitelo matičnih ćelija diferentovanih u osteoblaste pokazuje da je on nešto slabiji nego kod nediferentovanih matičnih ćelija, što je očekivano s ozbirom da diferenciranije ćelije gube visok kapacitet umnožavanja koji su imale kao nezrele ćelije.

SOX2 je kao važan faktor transkripcije, uključen u embriogenezu ćelija, razvijanje matičnih ćelija i proliferaciju primordijalnih nezrelih ćelija (237). Istraživači koji su se bavili eksresijom ovog faktora otkrili su da je SOX2 neophodan za proliferaciju primordijalnih nezrelih ćelija i pluripotenciju (238, 239, 240). Štaviše, SOX2 se eksprimira u brojnim delovima endodermalnih i ektodermalnih matičnih ćelija odraslih i ključan je za normalnu regeneraciju i razvitak tkiva (237). Utvrđeno je da se ekspresija SOX2 u mozgu značajno smanjuje sa starenjem kod ljudi, što sugeriše da pad ekspresije SOX2 antitela može da se koristiti kao biomarker starenja (241). Kopp i sar. (242) su pokazali da samostalno minimalno povećanje nivoa SOX2 pokreće diferencijaciju embrionalnih matičnih ćelija u osteoblaste, bez primene ostogenog medijuma. Ovaj

mehanizam dleovanja podrazumeva aktivacija signalnog puta *Hippo* i regulaciju gena porodice BMP. Prema dosadašnjoj literaturi, *Hippo* signalni put je važan za osteogenu diferencijaciju mezenhimalnih ćelija (243). *Liu* i sar. su pokazali da je eksprimirani SOX2 normalno prisutan u ćelijama promoviše proliferaciju, migraciju i adheziju DPSC (244). Kasnije je ista grupa autora pokazala da SOX2 ekspresija promoviše osteogenu diferencijaciju DPSC-a (245). Matične ćelije koje smo diferencirali ka osteoblastima pokazavale su slabu ekspresiju SOX2 antitela, što je u skladu sa literaturnim podacima. Imunofluorescencija nije specifična metoda dokazivanja ostogene diferencijacije matičnih ćelija, jer SOX2 pokazuje pozitivnost i kod nediferenciranih ćelija pulpe mlečnih zuba (246).

### 5.2.8 Diskusija rezultata ekspresije osteogenih markera

Matične ćelije koje su indukovane ka diferencijaciji u zrele koštane ćelije menjaju obrazac ekspresije specifičnih gena tokom sazrevanja, i zbog toga postoje mnogobrojni markeri osteoblastne ćelijske linije i osteogeneze kojima se definiše stepen zrelosti ćelija. Markeri osteoblastne ćelijske linije, koje smo analizirali su: transkripcioni faktori Runx2 i alkalna fosfataza.

Alkalna fosfataza (engl. *Alkaline phosphatase - ALP*) je molekularni marker rane osteoblastične diferencijacije. Kod ljudi postoje četiri forme alkalne fosfataze, a okarakterisane su na osnovu toga u kojim se tkivima uglavnom eksprimiraju kao placentalna, intestinalna, alkalna fosfataza iz jetre/kostiju/bubrega i iz polnih ćelija (247). Tkivno nespecifični oblik (TNSALP) se eksprimira u mnogim tkivima u celom telu, a posebno je prisutna u jetrenom, skeletnom i bubrežnom tkivu (248). Male razlike u elektroforetskoj pokretljivosti i termo stabilnosti između jetrene/koštane/bubrežne *ALP* pripisuju se posttranslacionoj modifikaciji iako je moguće da su njihovi proteinski delovi kodirani odvojeno ali srodnim genima (249). Alkalna fosfataza nespecifična za jetru/kosti/bubrege (TNSALP) je kodirana kao jedan genetski lokus, a nalazi se na kratkom kraku hromozoma 1 (250). Komoda i Sakagiši (251) su postavili hipotezu o fiziološkom pristupu ugljenohidratnih delova *ALP*: oni štite enzim od brze degradacije iz cirkulacije kroz vezivanje sa asialoglikoproteinskim receptorima jetre. Evolucija *ALP*

porodice gena je verovatno uključivala umnožavanje primordijalnog tkiva-nespecifičnog *ALP* gena za stvaranje TNSALP gena (252). Jedna od uloga nespecifične alkalne fosfataze jeste mineralizacija matriksa koštanog tkiva (253). Osteoblasti *ALP* eksprimiraju u vidu vezikula na membrani (250) i uz pomoć nje hidrolizuju neorganski pirofosfat (PPi) u nezelom koštanom matriksu, pri čemu nastaje pirofosfat, koji je neophodan za formiranje hidroksiapatitnih kristala koji čine neorgansku komponentu kostiju. Nezrele osteoprogenitorne ćelije ne eksprimiraju alkalnu fosfatazu, preosteoblasti i osteoblasti je eksprimiraju najviše, dok je zreli osteociti ne eksprimiraju (254). Osteoblasti koje smo diferencirali iz SHED su značajno eksprimirali ovaj gen, što nam potvrđuje da su to zreli osteoblasti. To znači da se u koštanom tkivu alkalna fosfataza eksprimira u ranoj fazi formiranja koštanog tkiva, dok njena ekspresija opada u kasnijim stadijumima maturacije (255).

U našem istraživanju ksenograftni material Bio-oss<sup>®</sup> je najmanje eksprimirao marker rane osteogeneze, što se objašnjava njegovim poznatim svojstvima. Naime, Bio-oss<sup>®</sup> poseduje samo osteokonduktivna svojstva, ali ne i osteoinduktivna, tako da on nema mogućnost da indukuje ćelije da se diferenciraju u osteoblaste (256). Novosintetisani SBA-16/HA je pokazao pozitivnu ekspresiju osteospecifičnog gena u grupi ekstrakata starih 1. dan. U ostale dve grupe vrednost ekspresije ovog gena je bila niža od kontrolne grupe, što znači da nije došlo do inicijane diferencijacije ćelija ka koštanom tkivu. Iako do sad nisu ispitivana osteoinduktivna svojstva ovog materijala, poznato je da HA ima osteoinduktivna svojstva na matične ćelije (257). *Lin* i *sar.* su pokazali da HA indukuje osteogenetsku diferencijaciju u ćelijama sličnim osteoblastima (Saos-2), i pritom ekprimira gen za alkalnu fosfatazu (258), slično onome što smo i mi zabeležili na ćelijama u grupi ekstrakta starog jedan dan. U dostupnoj literaturi ne postoje podaci o istraživanjima koja su pretkliničkim studijama ispitivala osteoinduktivna svojstva dentinskih opiljaka. Pretpostavlja se da opiljci poseduju osteoinduktivni potencijal zbog pristustva BMP-2 u svom sastavu (259). U našem istraživanju ovaj materijal se pokazao superiornim u odnosu na druga dva kada je u pitanju ekspresija ranog markera osteogeneze. Ovo potkrepljuje kliničke studije koje su dokazale stvaranje koštanog tkiva nakon implantacije dentinskih opiljaka *in vivo* (43).



Multipotentne mezenhimalne ćelije diferenciraju se u osteoblaste (260), prolazeći kroz stadijum preosteoblasta do konačne diferencijacije u osteoblaste. Proces diferencijacije podrazumeva ekspresiju gena osteogeneze, koja je kontrolisana sa dva glavna markera- *RUNX2* (engl. *Runt-related transcription factor 2*) i osteriksa (engl. *Osterix - Sp7*) (261). *RUNX2* je neophodan faktor za normalan razvoj skeleta, jer indukuje ekspresiju gena za osteoklacin, kolagen tipa I, osteopontin i druge proteine neophodne za razvoj kostiju. Ipak on nije usko specifičan za osteoblaste (219, 215). *RUNX2* indukuje ekspresiju osteoblastičnog fenotipa tako što podstiče diferencijaciju preosteoblasta iz mezenhimalnih ćelija, i pritom inhibira diferencijaciju progenitora prema hondrocitima i adipocitima. Njegova aktivnost se kontroliše i modulira preko signalnih puteva, u početku preko Wnt/ $\beta$ -katenin (engl. *Wingless-int/ $\beta$ catenin*) i TGF- $\beta$ /BMP (engl. *Transforming growth factor- $\beta$ /bone morphogenic protein*) (262).

Kada posmatramo ekspresiju *RUNX2* gena u Bio-oss<sup>®</sup> grupama, ona je konstantno niže od ekspresije u grupi osteoblasta. To nam potvrđuje da ovaj material nema osteoinduktivna svojstva na SHED, i da ne utiče sam po sebi na stvaranje koštanog tkiva. Poznato je da ovaj material izbora u svakodnevnoj stomatološkoj hirurgiji ima samo osteokonduktivna svojstva, ali se u literaturi nalaze podaci o njegovim osteoinduktivnim svojstvima na ćelije, kada se kombinuje sa različitim faktorima rasta (263). U našem istraživanju novoispitivani material, SBA-16/HA nije pokazao osteoinduktivni potencijal ni u jednoj grupi kada je u pitanju ovaj gen. Ranije je dokazano da HA u sastavu drugih nanomateriala ima osteogenetski potencijal na ćelijama (264), što naše istraživanje nije potvrdilo za SBA-16/HA. Dentinski opiljci su u grupama ekstrakata starim 1. i 14. dana statistički značajno pozitivno eksprimirali *RUNX2* gen. To govori u prilog diferencijacije SHED u osteoblastične ćelije. Kliničkim studijama je dokazano pristupstvo novostvorenog koštanog tkiva nakon implantacije ovog materijala u koštani defekt (33). Da bi se isključilo osteokonduktivno svojstvo ovog materijala, on je implantiran u subkutno tkivo gde je uočeno formiranje koštanog nodusa osteoindukcijom okolnih ćelija, što potvrđuje njegov osteoinduktivni potencijal (265).

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih prilikom izolacije i karakterizacije ćelija zubne pulpe, sinteze, karakterizacije i ispitivanja citotoksičnosti i osteoinduktivnosti sintetisanih biomaterijala mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Iz pulpe mlečnih zuba dece izoluju se ćelije koje imaju visok proliferativni potencijal i pozitivno eksprimiraju markere matičnih ćelija na protočnom citometru, čime ispunjavaju neophodne kriterijume da budu definisane kao humane mezenhimalne stem ćelije.
2. Ispitivani SBA-16/HA materijal i kontrolni Bio-oss<sup>®</sup> su pokazali biokompatibilni i proliferišući efekat na SHED; dok su dentinski opiljci pokazali blagi citotoksični efekat na ćelijama na osnovu rezultata MTT i DET testa.
3. Izolovane ćelije iz pulpe mlečnih zuba u fiziološkoj smeni diferencirane su u osteoblaste nakon perioda inkubacije od tri nedelje u osteogenom medijumu. Prisustvo obojenih kompleksa u kulturi ćelija nakon bojenja alizarin crvenim ukazuje na novodeponovani mineralizovani matriks i pokazatelj je diferencijacije ćelija. Osteoblastična diferencijacija je dokazana pozitivnim imunofluorecentnim bojanjem osteogenim markerima; ćelije su pokazale visoku ekspresiju anti-Coll 1 i osteopontina, dok je ekspresija Ki-67 i anti-SOX 2 antitela bila nešto slabija.
4. Od svih ispitivanih materijala, samo su dentinski opiljci pokazali statistički značajna osteoinduktivna svojstva, eksprimirajući *ALPL* i *RUNX2* gene. Materijal Bio-oss<sup>®</sup> je u sve tri grupe pokazao ekspresiju oba gena koja je niža od kontrolne grupe, dok je SBA-16/HA samo u grupi ekstrakta starog 1. dan imao blago povišenu ekspresiju *ALPL* gena, gena rane osteoblastične diferencijacije.
5. Na osnovu ovog istraživanja, SBA-16/HA i Bio-oss<sup>®</sup> su pokazali pokazali zadovoljavajuć nivo biokompatibilnosti. Sa malom prednošću SBA-16/HA je bio bolji od primenjivanog zlatnog standarda Bio-oss<sup>®</sup>. Dentinski opiljci koji se već koriste u kliničkoj praksi su pokazali niži nivo biokompatibilnosti, ali visok osteoinduktivni potencijal.

## 7. REFERENCE

1. Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *Int J Polym Sci.* 2011;2011(290602):19 pages.
2. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993;260(5110):920–6.
3. Nerem RM. Tissue engineering in the USA. *Med Biol Eng Comput.* 1992;30(4):CE8-12.
4. Hipp J, Atala A. Sources of stem cells for regenerative medicine. *Stem Cell Rev.* 2008;4(1):3–11.
5. Salgado AJ, Oliveira JM, Martins A, Teixeira FG, Silva NA, Neves NM, et al. Tissue engineering and regenerative medicine: past, present, and future. *Int Rev Neurobiol.* 2013;108:1-33.
6. Salgado AJ, Oliveira JT, Pedro AJ, Reis RL. Adult stem cells in bone and cartilage tissue engineering. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2006;1(3):345–64.
7. Esposito M, Grusovin MG, Felice P, Karatzopoulos G, Worthington HV, Coulthard P. Interventions for replacing missing teeth: horizontal and vertical bone augmentation techniques for dental implant treatment. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009;3:CD003607.
8. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 2009;88(9):792–806.
9. Kolk A, Handschel J, Drescher W, Rothamel D, Kloss F, Blessmann M, et al. Current trends and future perspectives of bone substitute materials -from space holders to innovative biomaterials. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012;40(8):706-18.
10. Hallman M, Thor A. Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry. *Periodontol* 2000. 2008;47:172–92.

11. La Noce M, Paino F, Spina A, Naddeo P, Montella R, Desiderio V, et al. Dental pulp stem cells: state of the art and suggestions for a true translation of research into therapy. *J Dent*. 2014;42(7):761-8.
12. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13625-30.
13. Cristaldi M, Mauceri R, Tomasello L, Pizzo G, Pizzolanti G, Giordano C, et al. Dental pulp stem cells for bone tissue engineering: a review of the current literature and a look to the future. *Regen Med*. 2018.
14. Noeaid P, Salih V, Beier JP, Boccaccini AR. Osteochondral tissue engineering: scaffolds, stem cells and applications. *J Cell Mol Med*. 2012;16(10):2247–70.
15. Asti A, Gioglio L. Natural and synthetic biodegradable polymers: different scaffolds for cell expansion and tissue formation. *Int J Artif Organs*. 2014;37(3):187–205.
16. Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus*. 2001;10(4):E1.
17. Qing H, Bonewald LF. Osteocyte remodeling of the perilacunar and pericanalicular matrix. *Int J Oral Sci*. 2009;1:59–65.
18. Savaridas T, Wallace RJ, Muir AY, Salter DM, Simpson AH. The development of a novel model of direct fracture healing in the rat. *Bone Joint Res*. 2012;1:289–96.
19. Ajduković Z. Evolucija nadoknade oseoporotične kosti donje vilice sintetičkim biomaterijalima. Niš: doktorska disertacija; 2003.
20. Cruess R, Dumont J. Fracture healing. *Can J Surg*. 1975;18:403–13.
21. Isaksson H, Gröngröft I, Wilson W, Van Donkelaar CC, Ven Rietbergen B, Tami A, et al. Remodeling of fracture callus in mice is consistent with mechanical loading and bone remodeling theory. *J Orthop Res*. 2009;27:664–72.
22. Mokbel N, Bou Serhal C, Matni G, Naaman N. Healing patterns of critical size bony defects in rat following bone graft. *Oral Maxillofac Surg*. 2008;12:73–8.
23. Gazdag AR, Lane J, Glaser PM, Forster RA. Alternatives to autogenous bone grafts, efficacy and indications. *J Am Acad Orthop Surg*. 1995;3:1-8.

24. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001;10(Supp2):S96-101.
25. Buchardt H. The biology of bone graft repair. *Clinical Orthop.* 1983;174:28-42.
26. Ray RD. Bone grafts and bone implants. *Otolaryngol Clin N Am.* 1972;5:389.
27. Ray RD. Vascularisation of bone graft and implants. *Clin Orthop.* 1972;87:43-8.
28. Hammack BL, Enneking W. Comparative vascularization of autogenous and homogenous bone transplants. *J Bone Joint Surg.* 1960;42A:811.
29. Misch CE, Misch-Dietsch F. Keys to Bone Grafting and Bone Grafting Materials. Misch CE, editor. *Contemporary Implant Dentistry.* 2008:839-69.
30. Cunningham NS, Reddi AH. Biological principles of bone induction: application of bone grafts. In Habal MB, Reddi HA, editors: *Bone grafts and bone substitutes*, Philadelphia: Saunders; 1992.
31. Mulliken JB, Glowacki J. Induced osteogenesis for repair and construction in craniofacial region. *Plast Reconstr Surg.* 1980;65:553.
32. Bono N, Tarsini P, Candiani G. Demineralized dentin and enamel matrices as suitable substrates for bone regeneration. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2017;15(3):e236-e243.
33. Pang KM, Um IW, Kim YK, Woo JM, Kim SM, Lee JH. Autogenous demineralized dentin matrix from extracted tooth for the augmentation of alveolar bone defect: a prospective randomized clinical trial in comparison with anorganic bovine bone. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(7):809-15.
34. Tadic D, Epple M. A thorough physicochemical characterization of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials.* 2004;25:987-94.
35. Piattelli A, Ricci L. Is there a preferential indication for a biomaterial in sinus bone augmentation. 2nd Scientific Round Table Biofunctionality. Kusnacht: Switzerland; 2009.
36. Moore WR, Graves S, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg.* 2001;71:354-61.

37. Constantino PD, Freidmann C. Synthetic bone graft substitutes. *Otolaryngol Clin North Am.* 1994;27:1037-73.
38. Rogers GF, Greene AK. Autogenous bone graft: basic science and clinical implications. *J Craniofac Surg.* 2012;23(1):323-7.
39. Kim YK, Kim SG, Byeon JH, Lee HJ, Um IU, Lim SC, et al. Development of a novel bone grafting material using autogenous teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109:496–503.
40. Kim YK, Kim SG, Oh JS, Jin SC, Son JS, Kim SY, et al. Analysis of the inorganic component of autogenous tooth bone graft material. *J Nanosci Nanotechnol.* 2011;11:7442–5.
41. Kim YK, Kim SG, Yun PY, Yeo IS, Jin SC, Oh JS, et al. Autogenous teeth used for bone grafting: A comparison with traditional grafting materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2014;117:e39–45.
42. Murata M. Collagen biology for bone regenerative surgery. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2012;38:321–5.
43. Um IW, Kim YK, Mitsugi M. Demineralized dentin matrix scaffolds for alveolar bone engineering. *J Indian Prosthodont Soc.* 2017;17(2):120-7.
44. Yeomans JD, Urist MR. Bone induction by decalcified dentine implanted into oral, osseous and muscle tissues. *Arch Oral Biol.* 1967;12:999–1008.
45. Reddi AH, Huggins CB. Influence of geometry of transplanted tooth and bone on transformation of fibroblasts. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1973;143:634–7.
46. Kim YK, Um IW, Murata M. Tooth bank system for bone regeneration-safety report. *J Hard Tissue Biol.* 2014;23:371–6.
47. Murata M, Akazawa T, Takahata M, Ito M, Tazaki J, Hino J, et al. Bone induction of human tooth and bone crushed by newly developed automatic mill. *J Ceram Soc Jpn.* 2010;118:434–7.
48. Gomes MF, dos Anjos MJ, Nogueira TO, Guimarães SA. Histologic evaluation of the osteoinductive property of autogenous demineralized dentin matrix on surgical bone

defects in rabbit skulls using human amniotic membrane for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001;16:563–71.

49. Togari K, Miyazawa K, Yagihashi K, Tabuchi M, Maeda H, Kawai T, et al. Bone Regeneration by Demineralized Dentin Matrix in Skull Defects of Rats. *Journal of Hard Tissue Biology*. 2012;21(1):25-34.

50. Khan Y, Yaszemski MJ, Mikos AG, Laurencin CT. Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. *J Bone Joint Surg Am*. 2008;90(Supp1):36-42.

51. Williams RJ, Gamradt SC. Articular cartilage repair using a resorbable matrix scaffold. *Instructional Course Lectures*. 2008;57:563-71.

52. Olszta MJ, Cheng X, Jee SS, Kumar R, Kim YY, Kaufman MJ, et al. Bone structure and formation: A new perspective. *Mater Sci Eng R:Rep*. 2007;58:77-116.

53. Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol*. 2012;30(10):546-54.

54. Poinern GE, Brundavanam RK, Mondinos N, Jiang ZT. Synthesis and characterisation of nanohydroxyapatite using an ultrasound assisted method. *Ultrason Sonochem*. 2009;16(4):469-74.

55. Hellmich C, Ulm FJ. Average hydroxyapatite concentration is uniform in the extracollagenous ultrastructure of mineralized tissues: evidence at the 1-10-microm scale. *Biomech Model Mechanobiol*. 2003;2(1):21-36.

56. Braddock M, Houston P, Campbell C, Ashcroft P. Born again bone: tissue engineering for bone repair. *News Physiol Sci*. 2001;16:208-13.

57. Blokhuis TJ, Arts JJ. Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: definitions, facts and myths. *Injury*. 2011;42(Supp 2):S26–S29.

58. Barradas AM, Yuan H, van Blitterswijk CA, Habibovic P. Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *Eur Cell Mater*. 2011;21:407–29.

59. Habibovic P, de Groot K. Osteoinductive biomaterials—properties and relevance in bone repair. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007;1(1):25-32.

60. Orlovskii V, Komlev C, Barinov S. Hydroxyapatite and hydroxyapatite-based ceramics. *Inorg Mater.* 2002;38(10):973–84.
61. Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury.* 2000;31:D37–D47.
62. Dorozhkin SV. Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid biomaterials. *J Mater Sci.* 2009;44(9):2343–87.
63. Ginebra MP, Espanol M, Montufar EB, Perez RA, Mestres G. New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine. *Acta Biomater.* 2010;6(8):2863-73.
64. Wahl DA, Czernuszka JT. Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. *Eur Cell Mater.* 2006;11:43-56.
65. Kim YG, Seo DS, Lee JK. Comparison of dissolution resistance in artificial hydroxyapatite and biologically derived hydroxyapatite ceramics. *J Phys Chem Solids.* 2008;9(5-6):1556–9.
66. Zhu W, Zhang X, Wang D, Lu W, Ou Y, Han Y, et al. Experimental study on the conduction function of nano-hydroxyapatite artificial bone. *IET Micro Nano Lett.* 2010;5(1):19–27.
67. Boskey A. Bone mineral crystal size. *Osteoporos Int.* 2003;14(5):16–21.
68. Yuasa T, Miyamoto Y, Ishikawa K, Takechi M, Momota Y, Tatehara S, et al. Effects of apatite cements on proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Biomaterials.* 2004;25(7-8):1159-66.
69. Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 2008;26(8):434-41.
70. Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2010;31(3):461-6.



71. Woodard JR, Hilldore AJ, Lan SK, Park CJ, Morgan AW, Eurell JA, et al. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials*. 2007;28(1):45-54.
72. Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006;27(18):3413-31.
73. Gobin, OS. SBA-16 materials synthesis, diffusion and sorption properties [dissertation]. Laval University, Ste-Foy Quebec; Canada; 2006.
74. Sing KSW, Everett DH, Haul RAW, Moscou L, Pierotti RA, Rouquerol J, et al. Reporting Physisorption Data for Gas Solid Systems with Special Reference to the Determination of Surface-Area and Porosity (Recommendations 1984). *Pure and Applied Chemistry*. 1985;57(4):603–19.
75. Hu Y, Wang J, Zhi Z, Jiang T, Wang S. Facile synthesis of 3D cubic mesoporous silica microspheres with a controllable pore size and their application for improved delivery of a waterinsoluble drug. *J Colloid Interface Sci*. 2011;363:410–7.
76. Zhao D, Feng J, Huo Q, Melosh N, Fredrickson GH, Chmelka BF, et al. Triblock copolymer synthesis of mesoporous silica with periodic 50–300 angstrom pores. *Science*. 1998;279:548–52.
77. Zhao D, Huo Q, Feng J, Chmelka BF, Stucky GD. Nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant synthesis of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures. *J Am Chem Soc*. 1998;120:6024–36.
78. Hu Y, Zhi Z, Zhao Q, Wu C, Zhao P, Jiang H, et al. 3D cubic mesoporous silica microsphere as a carrier for poorly soluble drug carvedilol. *Microporous Mesoporous Mater*. 2012;147:94–101.
79. Shrivats AR, McDermott MC, Hollinger JO. Bone tissue engineering: state of the union. *Drug Discov Today*. 2014;19(6):781-6.
80. Heitz F, Morris MC, Divita G. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br J Pharmacol*. 2009;157(2):195-206.

81. Fischer PM. Cellular uptake mechanisms and potential therapeutic utility of peptidic cell delivery vectors: progress 2001-2006. *Med Res Rev.* 2007;27(6):755-95.
82. Eppler SM, Combs DL, Henry TD, Lopez JJ, Ellis SG, Yi JH, et al. A target-mediated model to describe the pharmacokinetics and hemodynamic effects of recombinant human vascular endothelial growth factor in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 2002;72(1):20-32.
83. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968;6(2):230-47.
84. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9:641– 50.
85. Caplan AI. Mesenchymal stem cells: Time to change the name! *Stem Cells Translational Medicine.* 2017;6:1445–51.
86. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al.; International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;7(5):393-5.
87. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
88. Han Y, Li X, Zhang Y, Han Y, Chang F, Ding J. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells.* 2019;8(8):886.
89. Muhammad G, Jablonska A, Rose L, Walczak P, Janowski M. Effect of MRI tags: SPIO nanoparticles and <sup>19</sup>F nanoemulsion on various populations of mouse mesenchymal stem cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2015;75(2):144-59.
90. Liu J, Yu F, Sun Y, Jiang B, Zhang W, Yang J, et al. Concise reviews: Characteristics and potential applications of human dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2015;33(3):627-38.

91. Andrzejewska A, Lukomska B, Janowski M. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *Stem Cells*. 2019;37(7):855-64.
92. Steward AJ, Kelly DJ. Mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation. *J Anat*. 2015;227(6):717-31.
93. Tucker A, Sharpe P. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet*. 2004;5(7):499-508.
94. Thesleff I. Current understanding of the process of tooth formation: transfer from the laboratory to the clinic. *Aust Dent J*. 2014;59(Supp 1):48–54.
95. Thesleff I, Wang XP, Suomalainen M. Regulation of epithelial stem cells in tooth regeneration. *C R Biol*. 2007 Jun-Jul;330(6-7):561-4.
96. Tummers M, Thesleff I. The importance of signal pathway modulation in all aspects of tooth development. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 2009;312B(4):309-19.
97. Ikeda E, Morita R, Nakao K, Ishida K, Nakamura T, Takano-Yamamoto T, et al. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(32):13475-80.
98. Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, et al. The development of a bioengineered organ germ method. *Nat Methods*. 2007;4(3):227-30.
99. Takahashi C, Yoshida H, Komine A, Nakao K, Tsuji T, Tomooka Y. Newly established cell lines from mouse oral epithelium regenerate teeth when combined with dental mesenchyme. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2010;46(5):457-68.
100. Harada H, Kettunen P, Jung HS, Mustonen T, Wang YA, Thesleff I. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J Cell Biol*. 1999;147(1):105-20.
101. Morscheck C, Reichert TE. Dental stem cells in tooth regeneration and repair in the future. *Expert Opin Biol Ther*. 2018;18(2):187-96.
102. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*. 2003;18(4):696-704.

103. Morszeck C, Shi S, Huang G. Stem/progenitor cells of dental and gingival tissue origin. In: Huang, Thesleff, editors. Stem cells in craniofacial development, regeneration and repair. New Jersey: Wiley-Blackwell John Wiley & Sons; 2013.
104. Khojasteh A, Nazeman P, Rad MR. Dental Stem Cells in Oral, Maxillofacial and Craniofacial Regeneration. In: Şahin F., Doğan A., Demirci S. (editors) Dental Stem Cells. Stem Cell Biology and Regenerative Medicine. Springer: Cham; 2016.
105. McCulloch CA, Bordin S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J Periodontol Res.* 1991;26(3 Pt 1):144-54.
106. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 2004;364(9429):149-55.
107. Park JC, Kim JM, Jung IH, Kim JC, Choi SH, Cho KS, et al. Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations. *J Clin Periodontol.* 2011;38(8):721-31.
108. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod.* 2008;34(2):166-71.
109. Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod.* 2008;34(6):645-51.
110. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One.* 2006;1(1):e79.
111. Wei F, Song T, Ding G, Xu J, Liu Y, Liu D, et al. Functional tooth restoration by allogeneic mesenchymal stem cell-based bio-root regeneration in swine. *Stem Cells Dev.* 2013;22(12):1752-62.
112. Ten Cate AR. The development of the periodontium--a largely ectomesenchymally derived unit. *Periodontol 2000.* 1997;13:9-19.

113. Morszeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* 2005;24(2):155-65.
114. Kémoun P, Laurencin-Dalicious S, Rue J, Farges JC, Gennero I, Conte-Auriol F, et al. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res.* 2007;329(2):283-94.
115. Völlner F, Ernst W, Driemel O, Morszeck C. A two-step strategy for neuronal differentiation in vitro of human dental follicle cells. *Differentiation.* 2009;77(5):433-41.
116. Morszeck C, Moehl C, Götz W, Heredia A, Schäffer TE, Eckstein N, et al. In vitro differentiation of human dental follicle cells with dexamethasone and insulin. *Cell Biol Int.* 2005;29(7):567-75.
117. Morszeck C, Schmalz G. Transcriptomes and proteomes of dental follicle cells. *J Dent Res.* 2010;89(5):445-56.
118. Honda MJ, Imaizumi M, Tsuchiya S, Morszeck C. Dental follicle stem cells and tissue engineering. *J Oral Sci.* 2010;52(4):541-52.
119. Paduano F, Marrelli M, Palmieri F, Tatullo M. CD146 Expression Influences Periapical Cyst Mesenchymal Stem Cell Properties. *Stem Cell Rev Rep.* 2016;12(5):592-603.
120. Marrelli M, Paduano F, Tatullo M. Human periapical cyst-mesenchymal stem cells differentiate into neuronal cells. *J Dent Res.* 2015;94(6):843-52.
121. Karaöz E, Doğan BN, Aksoy A, Gacar G, Akyüz S, Ayhan S, et al. Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochem Cell Biol.* 2010;133(1):95-112.
122. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002;81(8):531-5.

123. Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res.* 2005;20(8):1394-402.
124. Carinci F, Papaccio G, Laino G, Palmieri A, Brunelli G, D'Aquino R, et al. Comparison between genetic portraits of osteoblasts derived from primary cultures and osteoblasts obtained from human pulpar stem cells. *J Craniofac Surg.* 2008;19(3):616-25; discussion 626-7.
125. Giuliani A, Manescu A, Langer M, Rustichelli F, Desiderio V, Paino F, et al. 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 Transl Med.* 2013;2(4):316-24.
126. d'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L, Graziano A, et al. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cell Mater.* 2009;18:75-83.
127. Paino F, La Noce M, Giuliani A, De Rosa A, Mazzoni S, Laino L, et al. Human DPSCs fabricate vascularized woven bone tissue: a new tool in bone tissue engineering. *Clin Sci (Lond).* 2017;131(8):699-713.
128. Tirino V, Paino F, De Rosa A, Papaccio G. Identification, isolation, characterization, and banking of human dental pulp stem cells. *Methods Mol Biol.* 2012;879:443-63.
129. Tirino V, Papaccio G. A New, Most Likely Unusual Approach is Crucial and Upcoming for the Use of Stem Cells in Regenerative Medicine. *Front Physiol.* 2012;2:119.
130. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(10):5807-12.
131. Kerkis I, Caplan AI. Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. *Tissue Eng Part B Rev.* 2012;18(2):129-38.
132. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp

stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs*. 2006;184(3-4):105-16.

133. Seo BM, Sonoyama W, Yamaza T, Coppe C, Kikuri T, Akiyama K, et al. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Dis*. 2008;14(5):428-34.

134. Huang GT, Sonoyama W, Chen J, Park SH. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res*. 2006;324:225–36.

135. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells*. 2003;21:50–60.

136. Jing W, Xiao J, Xiong Z, Yang X, Huang Y, Zhou M, et al. Explant culture: an efficient method to isolate adipose-derived stromal cells for tissue engineering. *Artif Organs*. 2011;35:105–12.

137. Struys T, Moreels M, Martens W, Donders R, Wolfs E, Lambrichts I. Ultrastructural and immunocytochemical analysis of multilineage differentiated human dental pulp- and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs*. 2011;193:366–78.

138. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, et al. Assessment of the impact of two different isolation methods on the osteo/odontogenic differentiation potential of human dental stem cells derived from deciduous teeth. *Calcif Tissue Int*. 2011;88:130–41.

139. Hilkens P, Gervois P, Fanton Y, Vanormelingen J, Martens W, Struys T, et al. Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Res*. 2013;353(1):65-78.

140. Ellerstrom C, Hyllner J, Strehl R. Single cell enzymatic dissociation of human embryonic stem cells: a straightforward, robust, and standardized culture method. *Methods Mol Biol*. 2010;584:121–34.

141. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.

142. Evans ND, Gentleman E, Polak JM. Scaffolds for stem cells. *Materials Today*. 2006;9(12):26-33.
143. Martens W, Wolfs E, Struys T, Politis C, Bronckaers A, Lambrechts I. Expression pattern of basal markers in human dental pulp stem cells and tissue. *Cells Tissues Organs*. 2012;196(6):490-500.
144. Struys T, Ketkar-Atre A, Gervois P, Leten C, Hilkens P, Martens W, et al. Magnetic resonance imaging of human dental pulp stem cells in vitro and in vivo. *Cell Transplant*. 2013;22(10):1813-29.
145. Wang J, Wang X, Sun Z, Yang H, Shi S, Wang S. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth can differentiate into dopaminergic neuron-like cells. *Stem Cells Dev*. 2010;19(9):1375-83.
146. Arora V, Arora P, Munshi AK. Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): saving for the future. *J Clin Pediatr Dent*. 2009;33(4):289-94.
147. O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*. 2011;14(3):88-95.
148. Brown BN, Valentin JE, Stewart-Akers AM, McCabe GP, Badylak SF. Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. *Biomaterials*. 2009;30(8):1482-91.
149. Lyons FG, Al-Munajjed AA, Kieran SM, Toner ME, Murphy CM, Duffy GP, et al. The healing of bony defects by cell-free collagen-based scaffolds compared to stem cell-seeded tissue engineered constructs. *Biomaterials*. 2010;31(35):9232-43.
150. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 2000;21(24):2529-43.
151. Phelps EA, Garcia AJ. Update on therapeutic vascularization strategies. *Regen Med*. 2009;4(1):65-80.
152. Ko HC, Milthorpe BK, McFarland CD. Engineering thick tissues--the vascularisation problem. *Eur Cell Mater*. 2007;14:1-18; discussion 18-9.



153. O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, Gibson LJ. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*. 2005;26(4):433-41.
154. Partap S, Lyons F, O'Brien FJ. IV.1. Scaffolds & surfaces. *Stud Health Technol Inform*. 2010;152:187-201.
155. Hollister SJ. Scaffold engineering: a bridge to where? *Biofabrication*. 2009;1(1):012001.
156. Hench LL. Ceramics, glasses, and glass-ceramics. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, editors. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. San Diego, CA: Academic Press; 1996. pp 73–84.
157. LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res*. 2002;395:81-98.
158. Marieb EN. *Human Anatomy*. Pearson Education Limited. Edinburgh Gate: Harlow; 2017.
159. Bilezikian JP. *Principles of bone biology*. Academic Press. 4<sup>th</sup> ed. Elsevier; 2002.
160. Meert M. Mesoporous silica as a possible drug delivery system for tricalcium silicate cements (dissertation). Faculty of Medicine and Health Sciences: Ghent University; 2018.
161. Mi P, Kokuryo D, Cabral H, Kumagai M, Nomoto T, Aoki I, et al. Hydrothermally synthesized PEGylated calcium phosphate nanoparticles incorporating Gd-DTPA for contrast enhanced MRI diagnosis of solid tumors. *J Control Release*. 2014;174:63-71.
162. Fu Q, Saiz E, Rahaman MN, Tomsia AP. Toward Strong and Tough Glass and Ceramic Scaffolds for Bone Repair. *Adv Funct Mater*. 2013;23(44):5461-76.
163. Xu YJ, Dong L, Lu Y, Zhang LC, An D, Gao HL, et al. Magnetic hydroxyapatite nanoworms for magnetic resonance diagnosis of acute hepatic injury. *Nanoscale*. 2016;8(3):1684-90.
164. Barrère F, van Blitterswijk CA, de Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int J Nanomedicine*. 2006;1(3):317-32.

165. Baino F, Vitale-Brovarone C. Three-dimensional glass-derived scaffolds for bone tissue engineering: current trends and forecasts for the future. *J Biomed Mater Res A*. 2011;97(4):514-35.
166. Porter AE, Best SM, Bonfield W. Ultrastructural comparison of hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite for biomedical applications. *J Biomed Mater Res A*. 2004;68(1):133-41.
167. A A, Menon D, T B S, Koyakutty M, Mohan CC, Nair SV, Nair MB. Bioinspired Composite Matrix Containing Hydroxyapatite-Silica Core-Shell Nanorods for Bone Tissue Engineering. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(32):26707-18.
168. Kokubo T, Kim HM, Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*. 2003;24(13):2161-75.
169. Takadama H, Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T. Mechanism of apatite formation induced by silanol groups: TEM observation. *Journal of the Ceramic Society of Japan*. 2000;108:118-21.
170. Carmagnola D, Adriaens P, Berglundh T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14(2):137-43.
171. Jensen T, Schou S, Stavropoulos A, Terheyden H, Holmstrup P. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23(3):263-73.
172. Aludden HC, Mordenfeld A, Hallman M, Dahlin C, Jensen T. Lateral ridge augmentation with Bio-Oss alone or Bio-Oss mixed with particulate autogenous bone graft: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2017;46(8):1030-1038.
173. Koga T, Minamizato T, Kawai Y, Miura K, I T, Nakatani Y, et al. Bone Regeneration Using Dentin Matrix Depends on the Degree of Demineralization and Particle Size. *PLoS One*. 2016;11(1):e0147235.
174. Scheven BA, Marshall D, Aspden RM. In vitro behaviour of human osteoblasts on dentin and bone. *Cell Biol Int*. 2002;26(4):337-46.

175. Li R, Guo W, Yang B, Guo L, Sheng L, Chen G, et al. Human treated dentin matrix as a natural scaffold for complete human dentin tissue regeneration. *Biomaterials*. 2011;32(20):4525-38.
176. Moharamzadeh K, Freeman C, Blackwood K. Processed bovine dentine as a bone substitute. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2008;46(2):110-3.
177. Bodrumlu E. Biocompatibility of retrograde root filling materials: A review. *Aust Endod J*. 2008;34(1):30-5.
178. Pizzoferrato A, Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Arciola CR, Granchi D, et al. Cell culture methods for testing biocompatibility. *Clin Mater*. 1994;15(3):173-90.
179. Wijesinghe WPSL, Mantilaka MMMGPG, Nirmal Peiris TA, Rajapakse RMG, Upul Wijayantha KG, Pitawala HMTGA, et al. Preparation and characterization of mesoporous hydroxyapatite with non-cytotoxicity and heavy metal adsorption capacity. *New J Chem*. 2018;42:10271-8.
180. Zhou HM, Shen Y, Wang ZI, Li L, Zheng YF, Hakkinen L, et al. In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. *J Endod*. 2013;39(4), 478-83.
181. Fotakis G, Timbrell J. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett*. 2006;160(2):171-7.
182. Sanz JL, Forner L, Llana C, Guerrero-Gironés J, Melo M, Rengo S, et al. Cytocompatibility and Bioactive Properties of Hydraulic Calcium Silicate-Based Cements (HCSCs) on Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHEDs): A Systematic Review of In Vitro Studies. *J Clin Med*. 2020;9(12):3872.
183. Ribeiro D, Duarte M, Matsumoto M, Marques M, Salvadori D. Biocompatibility In Vitro Tests of Mineral Trioxide Aggregate and Regular and White Portland Cements. *J Endod*. 2005;31(8):605-7.
184. Black L, Berenbaum M. Factors affecting the dye exclusion test for cell viability. *Exp Cell Res*. 1964;35(1):9-13.

185. Menicanin D, Bartold PM, Zannettino AC, Gronthos S. Identification of a common gene expression signature associated with immature clonal mesenchymal cell populations derived from bone marrow and dental tissues. *Stem Cells Dev.* 2010;19:1501-1510.
186. Balint B, Ivanović Z, Petakov M, Taseski J, Jovčić G, Stojanović N, et al. The cryopreservation protocol optimal for progenitor recovery is not optimal for preservation of marrow repopulating ability. *Bone Marrow Transplant.* 1999;23:613-19.
187. Yamaza T, Kentaro A, Chen C, Liu Y, Shi Y, Gronthos S, et al. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1(1):5.
188. Nikolić N, Krstić A, Trivanović D, Mojsilović S, Kocić J, Santibanez JF, et al. Mesenchymal stem cell properties of dental pulp cells from deciduous teeth. *Arch Biol Sci.* 2011;63(4):933-42.
189. Chen CW, Montelatici E, Crisan M, Corselli M, Huard J, Lazzari L, et al. Perivascular multi-lineage progenitor cells in human organs: regenerative units, cytokine sources or both? *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20:429-34.
190. Spath L, Rotilio V, Alessandrini M, Gambarà G, De Angelis L, Mancini M, et al. Explant-derived human dental pulp stem cells enhance differentiation and proliferation potentials. *J Cell Mol Med.* 2010; 14:1635-44.
191. Kawashima N. Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? *Arch Oral Biol.* 2012;57(11):1439-58.
192. Agha-Hosseini F, Jahani MA, Jahani M, Mirzaii-Dizgah I, Ali-Moghaddam K. In vitro isolation of stem cells derived from human dental pulp. *Clin Transplant.* 2010;24(2):E23-8.
193. dos Apostolos RCR, Cipreste MF, de Sousa RG, de Sousa EMB. Multifunctional hybrid nanosystems based on mesoporous silica and hydroxyapatite nanoparticles applied as potential nanocarriers for theranostic applications. *J Nano Res.* 2020;22:368.
194. Linkov P, Artemyev M, Efimov AE, Nabiev I. Comparative advantages and limitations of the basic metrology methods applied to the characterization of nanomaterials. *Nanoscale.* 2013;5(19):8781-98.

195. Lee M, Li W, Siu RK, Whang J, Zhang X, Soo C, et al. Biomimetic apatite-coated alginate/chitosan microparticles as osteogenic protein carriers. *Biomaterials*. 2009;30(30):6094-101.
196. Bulajić DV, Drljača J, Čapo I, Savić SM, Vojisavljević K, Hodžić A, Sekulić S, Bajkin BV. Biocompatibility of mesoporous SBA-16/hydroxyapatite nanocomposite and dentin demineralized particles on human dental pulp stem cells. *Microsc Res Tech*. 2021.
197. El Boujaady H, Mourabet M, EL Rhilassi A, Bennani-Ziatni M, El Hamri R, Taitai A. Adsorption of a textile dye on synthesized calcium deficient hydroxyapatite (CDHAp): Kinetic and thermodynamic studies. *Journal of Materials and Environmental Science*. 2016;7(11):4049-63.
198. Andrade GF, Gomide VS, da Silva Júnior AC, Goes AM, de Sousa EM. An in situ synthesis of mesoporous SBA-16/hydroxyapatite for ciprofloxacin release: in vitro stability and cytocompatibility studies. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25(11):2527-40.
199. Andrade GF, Ferreira Soares DC, de Sousa Almeida RK, Barros Sousa EM. Mesoporous Silica SBA-16 Functionalized with Alkoxysilane Groups: Preparation, Characterization, and Release Profile Study. *Journal of Nanomaterials*. 2012;2012:816496.
200. Andersson J, Areva S, Spliethoff B, Lindén M. Sol-gel synthesis of a multifunctional, hierarchically porous silica/apatite composite. *Biomaterials*. 2005;26(34):6827-35.
201. Jaganathan SK, Mazumdar A, Mondhe D, Mandal M. Apoptotic effect of eugenol in human colon cancer cell lines. *Cell Biol Int*. 2011;35(6):607-15.
202. Ignjatović N, Ninkov P, Kojić V, Bokurov M, Srdić V, Krnojelac D, et al. Cytotoxicity and fibroblast properties during in vitro test of biphasic calcium phosphate/poly-dl-lactide-co-glycolide biocomposites and different phosphate materials. *Microsc Res Tech*. 2006;69(12):976-82.
203. Simon CG Jr, Khatri CA, Wight SA, Wang FW. Preliminary report on the biocompatibility of a moldable, resorbable, composite bone graft consisting of calcium

- phosphate cement and poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *J Orthop Res.* 2002;20(3):473-82.
204. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials.* 2000;21(7):667-81.
205. Mori G, Brunetti G, Oranger A, Carbone C, Ballini A, Lo Muzio L, et al. Dental pulp stem cells: osteogenic differentiation and gene expression. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1237:47-52.
206. Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone.* 2001;29(6):532-9.
207. Mangano C, De Rosa A, Desiderio V, d'Aquino R, Piattelli A, De Francesco F, et al. The osteoblastic differentiation of dental pulp stem cells and bone formation on different titanium surface textures. *Biomaterials.* 2010;31(13):3543-51.
208. Han X, Kato H, Sato H, Hirofuji Y, Fukumoto S, Masuda K. Accelerated osteoblastic differentiation in patient-derived dental pulp stem cells carrying a gain-of-function mutation of TRPV4 associated with metatropic dysplasia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;523(4):841-6.
209. Locke M, Feisst V, Dunbar PR. Concise review: human adipose-derived stem cells: separating promise from clinical need. *Stem Cells.* 2011;29(3):404-11.
210. Eslaminejad MB, Vahabi S, Shariati M, Nazarian H. In vitro Growth and Characterization of Stem Cells from Human Dental Pulp of Deciduous Versus Permanent Teeth. *J Dent (Tehran).* 2010;7(4):185-95.
211. Atari M, Caballé-Serrano J, Gil-Recio C, Giner-Delgado C, Martínez-Sarrà E, García-Fernández DA, et al. The enhancement of osteogenesis through the use of dental pulp pluripotent stem cells in 3D. *Bone.* 2012;50(4):930-41.
212. Vakhrushev IV, Suzdaltseva YG, Burunova VV, Karalkin PA, Lupatov AY, Yarygin KN. Mesenchymal cells of the decidual tooth pulp: cytophenotype and initial evaluation of possibility of their use in bone tissue engineering. *Bull Exp Biol Med.* 2010;149(1):161-6.

213. Odell ID, Cook D. Immunofluorescence techniques. *J Invest Dermatol.* 2013;133(1):e4.
214. Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens and collagen-related diseases. *Ann Med.* 2001;33(1):7-21.
215. Kirkham G, Cartmell S. Genes and proteins involved in the regulation of osteogenesis. *Topics in tissue engineering.* 2007;3:1-22.
216. Lee HR, Kim HJ, Ko JS, Choi YS, Ahn MW, Kim S, et al. Comparative characteristics of porous bioceramics for an osteogenic response in vitro and in vivo. *PLoS One.* 2013;8(12):e84272.
217. van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J.* 1991;5(13):2814-23.
218. Nehls MC, Rippe RA, Veloz L, Brenner DA. Transcription factors nuclear factor I and Sp1 interact with the murine collagen alpha 1 (I) promoter. *Mol Cell Biol.* 1991;11(8):4065-73.
219. Lian JB, Stein GS. Runx2/Cbfa1: a multifunctional regulator of bone formation. *Curr Pharm Des.* 2003;9(32):2677-85.
220. Bonadio J, Saunders TL, Tsai E, Goldstein SA, Morris-Wiman J, Brinkley L, et al. Transgenic mouse model of the mild dominant form of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(18):7145-9.
221. Vermiglio G, Centofanti A, Matarese G, Militi A, Matarese M, Arco A, et al. Human Dental Pulp Tissue during Orthodontic Tooth Movement: An Immunofluorescence Study. *J Funct Morphol Kinesiol.* 2020;5(3):65.
222. Timpl R, Wiedemann H, van Delden V, Furthmayr H, Kühn K. A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur J Biochem.* 1981;120(2):203-11.
223. Engel J, Odermatt E, Engel A, Madri JA, Furthmayr H, Rohde H, et al. Domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix. *J Mol Biol.* 1981;150(1):97-120.

224. Nomiya T, Perez-Tilve D, Ogawa D, Gizard F, Zhao Y, Heywood EB, et al. Osteopontin mediates obesity-induced adipose tissue macrophage infiltration and insulin resistance in mice. *J Clin Invest.* 2007;117:2877-88.
225. Gursoy G, Acar Y, Alagoz S, Ankara SB. Osteopontin: A multifunctional molecule. *J Med and Med Science.* 2010;1:055-60.
226. Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R, Hughes J. Osteopontin--a molecule for all seasons. *QJM.* 2002;95:3-13.
227. Hunter GK, Kyle CL, Goldberg HA. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem J.* 1994;300(Pt3):723-8.
228. Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J.* 1996;317(Pt1):59-64.
229. Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11:279–303.
230. Kuratate M, Yoshida K, Shigetani Y, Yoshida N, Ohshima H, Okiji T. Immunohistochemical analysis of nestin, osteopontin, and proliferating cells in the reparative process of exposed dental pulp capped with mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2008;34(8):970-4.
231. Moses KD, Butler WT, Qin C. Immunohistochemical study of small integrin-binding ligand, N-linked glycoproteins in reactionary dentin of rat molars at different ages. *Eur J Oral Sci.* 2006;114:216–22.
232. Aguiar MC, Arana-Chavez VE. Ultrastructural and immunocytochemical analyses of osteopontin in reactionary and reparative dentine formed after extrusion of upper rat incisors. *J Anat.* 2007;210:418–27.
233. Fujii K, Watanabe R, Ando T, Kousaka J, Mouri Y, Yoshida M, et al. Alterations in three biomarkers (estrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor 2) and the Ki67 index between primary and metastatic breast cancer lesions. *Biomed Reports.* 2017;7(6): 535-42



234. Panjković M, Ivković-Kapicil T. Ki-67 expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *Arch Oncol.* 2006;14(1-2): 23-5.
235. Yim EK, Park JS. Biomarkers in cervical cancer. *Biomark Insights.* 2007;1:215-25.
236. Wang X, Sha XJ, Li GH, Yang FS, Ji K, Wen LY, et al. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. *Arch Oral Biol.* 2012;57(9):1231-40.
237. Arnold K, Sarkar A, Yram MA, Polo JM, Bronson R, Sengupta S, et al. Sox2(+) adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. *Cell Stem Cell.* 2011;9(4):317-29.
238. Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol.* 2008;26(11):1269-75.
239. Nagamatsu G, Kosaka T, Saito S, Honda H, Takubo K, Kinoshita T, et al. Induction of pluripotent stem cells from primordial germ cells by single reprogramming factors. *Stem Cells.* 2013;31(3):479-87.
240. Nettersheim D, Heimsoeth A, Jostes S, Schneider S, Fellermeier M, Hofmann A, et al. SOX2 is essential for in vivo reprogramming of seminoma-like Tcam-2 cells to an embryonal carcinoma-like fate. *Oncotarget.* 2016;7(30):47095-110.
241. Carrasco-Garcia E, Moreno-Cugnon L, Garcia I, Borrás C, Revuelta M, Izeta A, et al. SOX2 expression diminishes with ageing in several tissues in mice and humans. *Mech Ageing Dev.* 2019;177:30-6.
242. Kopp JL, Ormsbee BD, Desler M, Rizzino A. Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2008;26:903-11.
243. Byun MR, Hwang JH, Kim AR, Kim KM, Hwang ES, Yaffe MB, et al. Canonical Wnt signalling activates TAZ through PP1A during osteogenic differentiation. *Cell Death Differ.* 2014;21(6):854-63.

244. Liu P, Cai J, Dong D, Chen Y, Liu X, Wang Y, et al. Effects of SOX2 on Proliferation, Migration and Adhesion of Human Dental Pulp Stem Cells. *PLoS One*. 2015;10(10):e0141346.
245. Yuan J, Liu X, Chen Y, Zhao Y, Liu P, Zhao L, et al. Effect of SOX2 on osteogenic differentiation of dental pulp stem cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2017;63(1):41-4.
246. Govindasamy V, Abdullah AN, Ronald VS, Musa S, Ab Aziz ZA, Zain RB, et al. Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. *J Endod*. 2010;36(9):1504-15.
247. Sharma U, Pal D, Prasad R. Alkaline phosphatase: an overview. *Indian J Clin Biochem*. 2014;29(3):269-78.
248. Tsai LC, Hung MW, Chen YH, Su WC, Chang GG, Chang TC. Expression and regulation of alkaline phosphatases in human breast cancer MCF-7 cells. *Eur J Biochem*. 2000;267:1330-9.
249. Harris H. The harvey lectures: series 76. New York: Academic; 1986. p. 95-123.
250. Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch*. 2010;77(1):4-12.
251. Komoda T, Sakagishi Y. The function of carbohydrate moiety and alteration of carbohydrate composition in human alkaline phosphatase isoenzymes. *Biochim Biophys Acta*. 1978;523(2):395-406.
252. Fishman WH. Alkaline phosphatase isozymes: recent progress. *Clin Biochem*. 1990;23(2):99-104.
253. Wuthier RE, Register T. Role of alkaline phosphatase, a polyfunctional enzyme, in mineralizing tissues. In: Butler WT, editors. *Chemistry and biology of mineralized tissues*, Birmingham: EBSCO Media; 1985. p. 113-24.
254. Huang W, Yang S, Shao J, Li YP. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci*. 2007;12:3068-92.

255. Golub EE, Boesze-Battaglia K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Current opinion in orthopaedics*. 2007;18(5):444-8.
256. de Carvalho Moreira A, Silva JR, de Paula Samico R, de Melo Nishioka GN, Nishioka RS. Application of Bio-Oss in tissue regenerative treatment prior to implant installation: literature review. *Brazilian Dental Science*. 2019;22:147-54.
257. García-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone*. 2015 Dec;81:112-121.
258. Lin L, Chow KL, Leng Y. Study of hydroxyapatite osteoinductivity with an osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 2009 May;89(2):326-35.
259. Minamizato T, Koga T, I T, Nakatani Y, Umabayashi M, Sumita Y, Ikeda T, et al. Clinical application of autogenous partially demineralized dentin matrix prepared immediately after extraction for alveolar bone regeneration in implant dentistry: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2018 Jan;47(1):125-132.
260. Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest*. 2006;116(5):1195-201.
261. Baek WY, Lee MA, Jung JW, Kim SY, Akiyama H, de Crombrughe B, et al. Positive regulation of adult bone formation by osteoblast-specific transcription factor osterix. *J Bone Miner Res*. 2009;24(6):1055-65.
262. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol*. 2008;61(5):577-87.
263. Yildirim M, Spiekermann H, Biesterfeld S, Edelhoff D. Maxillary sinus augmentation using xenogenic bone substitute material Bio-Oss in combination with venous blood. A histologic and histomorphometric study in humans. *Clin Oral Implants Res*. 2000 Jun;11(3):217-29.
264. Hayrapetyan A, Bongio M, Leeuwenburgh SC, Jansen JA, van den Beucken JJ. Effect of Nano-HA/Collagen Composite Hydrogels on Osteogenic Behavior of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Rev Rep*. 2016 Jun;12(3):352-64.
265. Murata M. Bone Engineering Using Human Demineralized Dentin Matrix and Recombinant Human BMP-2. *Journal of Hard Tissue Biology*. 2005;14(2):80-1.

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

<b>Назив пројекта/истраживања</b>
<b>Биокомпатибилност, цитотоксичност и остеоиндуктивност различитих коштаних заменика на матичним ћелијама пулпе млечних зуба</b>
<b>Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање</b>
а) Катедра за хистологију и ембриологију, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду б) Одељење Дечије и превентивне стоматологије, Клиника за стоматологију Војводине
<b>Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање</b>
Докторске академске студије, Клиничка истраживања, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду
<b>1. Опис података</b>
<p>1.1 Врста студије</p> <p><i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i></p> <p><b>Експериментални рад на ћелијској линији пулпе млечних зуба, испитивање биокомпатибилности и остеоиндуктивности три коштана заменика актуелним методама хистологије и молекуларне биологије.</b></p> <p>епитела дојке уз примену савремене врсте наночестица и актуелних метода молекуларне</p>

биологије.

## 1.2 Врсте података

**а) квантитативни**

**б) квалитативни**

## 1.3. Начин прикупљања података

а) анкете, упитници, тестови

б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи

в) генотипови: навести врсту \_\_\_\_\_

г) административни подаци: навести врсту \_\_\_\_\_

**д) узорци ткива: ткиво зубне пулпе млечних зуба**

**ђ) снимци, фотографије: фотографије имунофлуоресцентно обојених ћелија, фотографје хистолошки обојених ћелија зубне пулпе ализарин ред методом и кристал виолет методом, и фотографије нативне ћелијске културе**

**е) текст, навести врсту литературни изводи**

ж) мапа, навести врсту \_\_\_\_\_

**з) остало: експериментална испитивања**

## 1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

**Табеле (5), слике (23). Подаци су приказани као релативни компаративни односи генске експресије и ћелијске вијабилности у виду корелације између контролних и третираних ћелија.**

### 1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

а) Excel фајл, датотека \_\_\_\_\_**.xlsx**\_\_\_\_\_

b) SPSS фајл, датотека \_\_\_\_\_**.sav**\_\_\_\_\_

c) PDF фајл, датотека \_\_\_\_\_

d) Текст фајл, датотека \_\_\_\_\_**.docx**\_\_\_\_\_

e) JPG фајл, датотека \_\_\_\_\_**.jpg**\_\_\_\_\_

f) Остало, датотека \_\_\_\_\_

### 1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

a) број варијабли **Велики број варијабли**

б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) **Сваки биолошки експеримент је независно изведен најмање три пута, у оквиру којих је сваки биолошки узорак припремљен у најмање три реплике уколико није другачије назначено.**

### 1.3.3. Поновљена мерења

a) да

**б) не**

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

a) временски размак између поновљених мера је \_\_\_\_\_

б) варијабле које се више пута мере односе се на \_\_\_\_\_

в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као \_\_\_\_\_

Напомене: \_\_\_\_\_

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## 2. Прикупљање података

### 2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

#### 2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, **Експерименти на примарној ћелијској линији зубне пулпе млечних зуба, анализа фенотипа и способности формирања колонија изолованих ћелија, анализа тестова карактеризације синтетисаног материјала, анализа имунофлуоресцентног и ализарин ред бојања диференцираних остеобласта, анализа тестова цитотоксичности испитиваних материјала, одређивање остеоиндуктивности испитиваних материјала.**

б) корелационо истраживање, навести тип \_\_\_\_\_

ц) анализа текста, навести тип **Прикупљање података анализом доступне литературе.**

д) остало, навести шта \_\_\_\_\_

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

---

## 2.2 Квалитет података и стандарди

### 2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) Колики је број недостајућих података? \_\_\_\_\_

б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не

в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

---

### 2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

**Квалитет података контролисан је применом различитих статистичких метода и поређењем са литературним подацима.**

### 2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

**Поређењем добијених података са литературним подацима.**

## **3. Третман података и пратећа документација**

### 3.1. Третман и чување података



3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Репозиторијуму Универзитета у Новом Саду.

3.1.2. URL адреса <https://cris.uns.ac.rs/searchDissertations.jsf>

3.1.3. DOI \_\_\_\_\_

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) Да

б) Да, али после ембарга који ће трајати до \_\_\_\_\_

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог \_\_\_\_\_

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен?

\_\_\_\_\_

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

\_\_\_\_\_

---

*Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.*

---

---

---

---

---

### 3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? **Трајно**

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да **Не**

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да **Не**

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да **Не**

Образложити

---

## 4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

#### 4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности ([https://www.paragraf.rs/propisi/zakon\\_o\\_zastiti\\_podataka\\_o\\_licnosti.html](https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html)) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

**Истраживање је одобрено од стране Етичке комисије Клинике за стоматологију Војводине, 04.07.2019. године, и од стране Етичке комисије Медицинског факултета у Новом Саду, 18.11.2019. године.**

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да Не

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
- б) Подаци су анонимизирани
- ц) Остало, навести шта

## 5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

**а) јавно доступни**

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

---

---

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

---

---

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

**Ауторство – некомерцијално – без прераде**

## **6. Улоге и одговорност**

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

**Драгица Булајић**

[dragica.bulajic@uns.ac.rs](mailto:dragica.bulajic@uns.ac.rs)

*6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима*

**Драгица Булајић**

[dragica.bulajic@uns.ac.rs](mailto:dragica.bulajic@uns.ac.rs)

*6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима*

**Драгица Булајић**

[dragica.bulajic@uns.ac.rs](mailto:dragica.bulajic@uns.ac.rs)