

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jasmina D. Debeljak Martačić

Uticaj N-acetil-L-cisteina *in vitro* na  
proliferaciju i diferencijaciju matičnih ćelija  
zubne pulpe mlečnih zuba dece

Doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jasmina D. Debeljak Martacic

Effect of N-acetil-L-cysteine *in vitro* on  
proliferation and differentiation of children  
deciduous teeth dental pulp stem cells

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Članovi komisije,

Mentor: Dr Milica Kovačević Filipović, vanredni profesor Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu

---

Mentor: Dr Gordana Matić, redovni profesor Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

---

Dr Sunčica Borozan, redovni profesor Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu

---

Dr Vera Todorović, redovni profesor Stomatološkog fakulteta u Pančevu, Univerziteta „Privredna akademija“ u Novom Sadu,

---

Dr Tamara Popović, naučni saradnik Instituta za medicinska istraživanja, Univerziteta u Beogradu

---

Datum odbrane:

## ZAHVALNICA

*Zahvaljujem se svima koji su sa naučnog, materijalnog i/ili moralnog aspekta pomogli izradu ove teze.*

*Posebnu zahvalnost dugujem:*

***Dr Milici Kovačević Filipović**, mom mentoru, koja je sa neverovatnim strpljenjem radila sa mnom, kako tokom eksperimentalnog dela, tako i tokom pisanja i formiranja finalne verzije ove teze,*

***Dr Gordani Matić**, mom mentoru sa fakulteta, profesorki koja mi je pružala konstantnu pomoć i iskrenu podršku tokom doktorskih studija i same izrade teze,*

***Dr Veri Todorović**, na izuzetnoj naučnoj i materijalnoj pomoći kojom je omogućeno definisanje i finalizacija teze,*

***Dr Sunčici Borožan**, na izuzetnoj pomoći tokom izrade eksperimentalnog dela, kao i tokom pisanja teze,*

***Dr Tamari Popović**, kolegici i prijatelju bez čije nesebične pomoći i konstantne podrške ova teza ne bi bila realizovana.*

*Veliko hvala i:*

*Šefici laboratorije u kojoj sam zaposlena, **dr Mariji Glibetić**, na razumevanju i podršci koju mi je pružila tokom pisanja teze,*

*Kolegicama **dr Aleksandri Arsić**, **mr Mariji Takić** i **dipl. farmaceutu Danici Čujić** na korisnim sugestijama i konkretnoj pomoći tokom same izrade teze,*

*Kolegi **mr Slavku Mojsiloviću** na konkretnoj pomoći tokom izrade teze kao i korisnim sugestijama tokom sređivanja rezultata,*

*Kolegicama sa Veterinarskog fakulteta **Jeleni Francuski**, **Tijani Lužajić** i **dr Aniti Radovanović** tokom obrade histoloških preparata,*

*Zahvaljujem se i **dr Gordani Petrović Oggiano**, kao i ostalim kolegicama iz laboratorije na podršci tokom izrade teze.*

*Bez pomoći i iskrene podrške članova moje uže i šire porodice nikako ne bih uspela da privedem kraju ovaj veliki posao. U tom smislu sam zahvalna i svojoj doktorki **Aleksandri Potřebić** jer mi je njena podrška pomogla da održim ravnotežu koja mi je bila neophodna da tezu privedem kraju.*

*Na kraju, nemerljivu zahvalnost dugujem svom suprugu, jer samo on zna koliko je bilo teško biti uz mene tokom svih ovih godina.*

„Uticaj N-acetil-L-cisteina *in vitro* na proliferaciju i diferencijaciju matičnih ćelija zubne pulpe mlečnih zuba dece“

## REZIME

Zubna pulpa vodi poreklo od embrionalnog ektomezenhima i potencijalno je važan izvor mezenhimalnih matičnih ćelija (MMĆ) za regeneraciju svih tkiva kraniofacijalne regije koja su, takođe, poreklom od ektomezenhima. N-acetil-L-cistein (NAC) je antioksidant koji može da ima uticaj na terapijsku primenu MMĆ. Cilj ovog rada je bio da utvrdi da li ćelije izolovane iz zubne pulpe mlečnih zuba dece i ekspandirane *in vitro*, imaju karakteristike MMĆ i da ispita dejstvo NAC-a na njihovu proliferaciju i diferencijaciju, kao i da se utvrdi da li NAC utiče na aktivnost enzima antioksidativne zaštite, oksidativno oštećenje različitih ćelijskih struktura i metabolizam glukoze.

Metodom tkivnog eksplanta, iz šest pulpi mlečnih zuba dece, je dobijena početna populacija adherentnih ćelija. Za procenu broja CFU-F (eng. *Colony Forming Unit – Fibroblast*), ćelije su zasejavane u maloj gustini. Proliferativni potencijal i vreme udvajanja broja ćelija u kulturi je praćeno brojanjem ćelija posle tripsinizacije subkonfluentnih kultura, svaka 4 dana, tokom 40 dana. Protočna citometrija je korišćena za imunofenotipizaciju *ex vivo* umnoženih ćelija, određivanje aktivnosti aldehid-dehidrogenaze (ALDH), brzinu ulaska ćelija u sintetsku (S) fazu ćelijskog ciklusa, određivanje broja ćelijskih deoba i detekciju apoptoze. Aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze (SA- $\beta$ -Gal), određivana je korišćenjem citohemije. Diferencijacija ekspandiranih ćelija u smeru osteogeneze, hondrogeneze i adipogeneze izvedena je korišćenjem komercijalnih medijuma. Promene na ćelijama tokom osteogene diferencijacije su praćene preko aktivnosti alkalne fosfataze spektrofotometrijski, deponovanja kalcijuma u ekstracelularni matriks (bojenje alizarin crvenim) i pojave osteokalcina (imunocitohemija). Hondrogena diferencijacija u peletama je praćena određivanjem kolagena tip I (*in situ* hibridizacija), kolagena tip 2 (imunohistohemija) i određivanjem koncentracije glikozaminoglikana (spektrofotometrija). Adipogena diferencijacija je ispitana vizuelizacijom masnih kapljica (Oil red O bojenje). Aktivnost katalaze i superoksid-dismutaze (SOD) u ćelijskom lizatu je određena spektrofotometrijski.

Koncentracija malondialdehida (MDA) je određena reakcijom sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA). Karbonilni derivati proteina određivani su reakcijom sa 2,4 - dinitrofenilhidrazinom. Posle ekstrakcije ukupnih lipida i metilovanja masnih kiselina, metil-estri masnih kiselina su razdvajani gasno-tečnom hromatografijom (GLC), a koncentracija zasićenih (SFA), mononezasićenih (MUFA) i i polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) je izražena procentualno u odnosu na ukupne masne kiseline. Izoenzimski oblici laktat-dehidrogenaze (LDH<sub>1</sub>, LDH<sub>2</sub>, LDH<sub>3</sub>, LDH<sub>4</sub> i LDH<sub>5</sub>) su određivani vertikalnom elektroforezom. Sva navedena merenja su izvedena bez i sa različitim koncentracijama NAC-a (0,1 mM, 1 mM i 2 mM).

Naši rezultati su pokazali da je iz zubne pulpe mlečnih zuba dece dobijena populacija ćelija koja formira značajan broj CFU-F (4% izolovanih ćelija) i kontinuirano proliferiše tokom 40 dana, bez opadanja vremena potrebnog za udvajanje njihovog broja u kulturi. Ipak, dobijena populacija ćelija je bila heterogena po brzini deoba. Oko 12% ćelija je posle tri dana kultivacije bilo podeljeno manje od četiri puta, dok se ostatak ćelija podelio više od četiri puta. Vijabilitet ćelija je bio u proseku oko 95%, a svega 3% ćelija je bilo pozitivno na  $\beta$ -galaktozidazu. Tokom čitavog vremena kultivacije kapacitet za diferencijaciju u osteoblaste, adipocite i hondrocite se nije menjao. Gotovo sve ćelije su u pasaži četiri eksprimirale CD44, CD73, kolagen tipa I, CD29, CD90 i osteonektin. Deo ćelija je eksprimirao STRO-1, CD146 i CD106. Marker matičnih ćelija hematopoeze nije detektovan u našem sistemu kultivacije. Opseg u kome se kretao procenat ćelija koje pokazuju povišenu aktivnost ALDH je iznosio od 4% do 24% i bio je u negativnoj korelaciji sa vremenom udvajanja ćelija u kulturi.

Naši rezultati su pokazali da uticaj NAC-a na izolovane ćelije zavisi od njegove koncentracije. Naime, posle 72 sata od primene nižih koncentracija NAC-a (0,1 mM i 1 mM) povećavao se broj ćelija u kulturi za 20% i to najverovatnije zbog ubrzanja ćelijskog ciklusa jedne manje populacije ćelija. Primena 2 mM NAC-a smanjivala je broj ćelija u kulturi. Osim toga, rastuća koncentracija NAC-a je stimulisala osteogenezu i hondrogenezu, a inhibirala adipogenezu. Takođe, primena 0,1 mM NAC-a je povećala procenat ćelija u kojima se mogla detektovati visoka aktivnost ALDH, a smanjivala procenat SA  $\beta$ -gal pozitivnih ćelija. Primena 2 mM NAC je dovela do povećanja broja SA  $\beta$ -gal pozitivnih ćelija. Niže koncentracije NAC-a su smanjivale oksidativno oštećenje različitih ćelijskih makromolekula (smanjena lipidna peroksidacija kao i

formiranje karbonilnih derivata proteina), a to je bilo praćeno i smanjenjem aktivnosti SOD i katalaze. Osim toga, pokazano je i da je po dodavanju 0,1 mM NAC-a postojao porast aktivnosti LDH izoformi 4 i 5 što bi moglo da ukaže na povećanje obima glikolize.

Nakon sveobuhvatnog sagledavanja naših rezultata, možemo zaključiti da je primenjenom metodom, iz pulpe mlećnih zuba dece, izolovana heterogena populacija ćelija, među kojima su se nalazile i one ćelije koje su po svojim karakteristikama odgovarale matičnim ćelijama poreklom iz zubne pulpe. Niže koncentracije NAC-a su stimulisale proliferaciju izolovanih ćelija u kulturi, smanjujući njihovo oksidativno oštećenje i verovatno povećavajući obim glikolize, dok su sve koncentracije NAC-a stimulisale osteogenezu i hondrogenezu. Zbog toga smatramo da bi niske koncentracije NAC-a mogle da nađu primenu u kulturama matičnih ćelija zubne pulpe, posebno ukoliko je potrebno stimulisati njihovu proliferaciju i diferencijaciju u pravcu osteogeneze i hondrogeneze.

Ključne reći: matične ćelije zubne pulpe, N-acetil-L-cistein, proliferacija, diferencijacija, katalaza, superoksid-dismutaza, laktat-dehidrogenaza, oksidativno oštećenje

Naućna oblast: biologija

Uža naućna oblast: matične ćelije

UDK broj: 602:611.314.18.018]:616-092.4:[615.279:576.36](043.3)

„Effect of N-acetyl-L-cysteine *in vitro* on proliferation and differentiation of children deciduous teeth dental pulp stem cells“

#### Abstract

Dental pulp originates from the embryonic ectomesenchyme and represents potentially important source of mesenchymal stem cells (MSCs) with the ability to regenerate all tissues of the craniofacial region, originating from the ectomesenchyme, too. N-acetyl-L-cysteine (NAC) is an antioxidant that may have an impact on the therapeutic use of MSCs. The aim of this study was to determine whether the cells isolated from the dental pulp of children deciduous teeth of children and expanded *in vitro*, have the characteristics of MSC, to examine the effect of NAC on their proliferation and differentiation and to determine whether NAC influences the metabolism of glucose, the activity of antioxidant enzymes and whether it reduces oxidative damage of various cellular macromolecules.

The initial cell population was obtained from six pulps of deciduous teeth using *ex vivo* tissue explants method. The number of colonies (Colony Forming Unit – Fibroblast; CFU-F) was determined by seeding the low density cell culture. Proliferative potential and population doubling time of the cells in culture were followed by counting the cells after trypsinization of subconfluent cultures, every 4 days, respectively, during 40 days of cultivation. Flow cytometry was used for cell immunophenotypisation, aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity determination, number of cells in different phases of cell cycle, number of cell divisions and percentage of cells in apoptosis. Activity of  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -Gal), was determined using cytochemistry. Osteogenesis, chondrogenesis and adipogenesis were induced using complete commercial mediums. Osteogenic differentiation was monitored via alkaline phosphatase activity (spectrophotometry), deposition of calcium in the extracellular matrix (Alizarin red staining) and the appearance of osteocalcin (immunocytochemistry). Chondrogenic differentiation was followed by measuring collagen type I (in situ hybridization), collagen type 2 (immunohistochemistry) and the determination of the concentration of glycosaminoglycans (spectrophotometry). Adipogenic differentiation was examined by visualization of fat droplets (Oil Red O staining). Activity of catalase and superoxide dismutase (SOD) in cell lysates was determined spectrophotometrically. Malondialdehyde (MDA) was determined by



reaction with thiobarbituric acid (TBA). Carbonyl derivatives of proteins were determined by reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine. After total lipid extraction and methylation of fatty acids, fatty acid methyl esters were separated by gas-liquid chromatography, and the concentration of saturated fatty acids, monounsaturated fatty acids and polyunsaturated fatty acids was expressed as percentage of total fatty acids detected in the sample. Isoenzyme forms of lactate dehydrogenase (LDH<sub>1</sub>, LDH<sub>2</sub>, LDH<sub>3</sub>, LDH<sub>4</sub> and LDH<sub>5</sub>) were determined by vertical electrophoresis. All the above measurements were made with and without different concentrations of NAC (0,1 mM, 1 mM and 2 mM).

Our results showed that the dental pulp of deciduous teeth of children had population of cells that formed a significant number of CFU-F (4% of the isolated cells) and continually proliferated for 40 days without decrease in the population doubling time. However, the resulting cell population was heterogeneous in terms of the division velocity. After three days of cultivation, around 12% of the cells were divided less than four times, while the remaining cells divided more than four times. Viability of cells was in average 95%, and only 3% of the cells were positive for  $\beta$ -galactosidase. During the entire time of the cultivation, expanded cells retained the ability to differentiate into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes. Almost all cells expressed CD44, CD73, collagen type I, CD29, CD90 and osteonectin. Part of the cells expressed STRO-1, CD146 and CD106. Marker of hematopoietic stem cells have not been detected. Elevated ALDH activity ranged from 4% to 24% and was negatively correlated with the population doubling time.

Our results showed that the effect of NAC on isolated cells dependeds on its concentration. In fact, after 72 hours of application of lower NAC concentrations (0,1 mM and 1 mM) the number of cells in culture increased by 20%, most probably due to the acceleration of the cell cycle of a small population of cells. Application of 2 mM NAC decreased the number of cells in culture. In addition, the growing concentration of NAC stimulated osteogenesis and chondrogenesis and inhibited adipogenesis. Also, the application of 0,1 mM NAC increased the percentage of cells which expressed high ALDH activity, and reduced the percentage of SA- $\beta$ -gal positive cells. Application of 2 mM NAC led to an increase in the number of SA- $\beta$ -gal positive cells. Lower concentrations of NAC reduced oxidative damage to various cellular macromolecules

(reduced lipid peroxidation and the formation of carbonyl derivatives of proteins), and this was accompanied by reduced activity of SOD and catalase. In addition, it was shown that by adding 0,1 mM NAC the activity of LDH isoforms 4 and 5 increased, which could indicate an increase in the glycolytic activity, and at least in part explain the rapid proliferation of cells.

After a comprehensive review of our results, we could conclude that by the method we applied, we isolated heterogeneous population of cells from the pulp of children deciduous teeth. Isolated cells had characteristics of dental pulp stem cells. Lower concentrations of NAC stimulated proliferation of cells in culture, reducing their oxidative damage and possibly increasing the volume of glycolysis, while all concentrations of NAC stimulated osteogenesis and chondrogenesis.

We believe that the low concentration of NAC could find application in dental pulp stem cell expansion protocols, especially if necessary to stimulate their differentiation toward osteoblasts and chondrocytes.

Keywords: dental pulp stem cells, N acetyl-L-cysteine, proliferation, differentiation, catalase, superoxide dismutase, lactate dehydrogenase, oxidative damage

Scientific field: biology

Narrow scientific field: stem cells

UDC number: 602:611.314.18.018]:616-092.4:[615.279:576.36](043.3)

## LISTA SKRAĆENICA

**ALDH** – aldehid-dehidrogenaza

**AP** - alkalna fosfataza

**aP2** – eng. *Adipocyte Protein 2*

**APE1/Ref-1** - eng. *Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease/Redox Effector Factor-1*

**NFE2L2 (Nrf2)** - eng. *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*

**ATP** – adenzin-trifosfat

**BAA** - bodipi-aminoacetate

**BAAA** - bodipi-aminoacetaldehid

**Cu,Zn-SOD** – bakar, cink-superoksid-dismutaza

**BCA** – bicinoninična kiselina (eng. *Bicinchoninic Acid*)

**bFGF** – bazični faktor rasta fibroblasta (eng. *Basic Fibroblast Growth Factor*)

**BMP2** - eng. *Bone Morphogenetic Protein 2*

**BSA** – goveđi serum albumin

**BrdU**- 5-bromo-2-deoksiuridin

**CDK** – ciklin-zavisne kinaze

**CFDA-SE** - karboksifluorescein-sukcinimidil-estar (eng. *carboxyfluorescein succinimidyl ester*)

**CFU-F** - eng. *Colony Forming Unit- Fibroblasts*

**DEAB** - dietilamino-benzaldehid

**DFC** – ćelije poreklom iz zubnog folikula (eng. *Dental Follicle Cells*)

**DIG** - digoksinin

**DPSC** – matične ćelije poreklom iz zubne pulpe (eng. *Dental Pulp Stem Cells*)

**DTSC** – matične ćelije poreklom iz dentalnih tkiva (eng. *Dental Tissue derived Stem Cells*)

**ECM** - ekstracelularni matriks

**EcSOD** - ekstracelularna superoksid-dismutaza

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

**GAG** - glikozaminoglikani

**GFP** - eng. *Green Fluorescent Protein*

**GLC**- gasno-tečna hromatografija (eng. *Gas-liquid Chromatography*)

**GPx** – glutation-peroksidaza

**GSH** - glutation

**GVHD** – reakcija kalema protiv domaćina (eng. *Graft versus host disease*)

**HEMA** - 2-hidroksietil-metakrilat

**HA/TCP** - hidroksipatit/trikalcijum-fosfat

**HIF-1** – hipoksija-inducibilni faktor 1 (eng. *Hypoxia-Inducible Factor 1*)

**HIF-1 $\alpha$**  – hipoksija-inducibilni faktor 1,  $\alpha$  subjedinica (eng. *Hypoxia-Inducible Factor 1, alpha subunit*)

**HIF-1 $\beta$**  – hipoksija-inducibilni faktor 1,  $\beta$  subjedinica (eng. *Hypoxia-Inducible Factor 1, beta subunit*)

**HNE** - 4-hidroksi-nonenal

**IBMX** - izobutil-metil-ksantin

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

**IGF-1** – insulinu sličan faktor rasta-1 (eng. *Insulin-like growth factor 1*)

**IDO** – indoleamin-dioksidogenaza

**ISCT** – Međunarodno udruženje za ćelijsku terapiju (eng. *International Society for Cellular Therapy*)

**ISH** - *in situ* hibridizacija

**JNK** - eng. *c-Jun N-terminal kinase*

**CAT** - katalaza

**LDH** – laktat-dehidrogenaza

**LPO** - lipidna peroksidacija

**Mn-SOD** – mangan-superoksid-dismutaza

**M $\acute{C}$ H** - matične ćelije hematopoeze

**M $\acute{C}$ K** - matične ćelije kancera

**M $\acute{C}$**  - matične ćelije

**MDA** - malondialdehid

**MK** - masne kiseline

**MM $\acute{C}$**  - mezenhimalne matične ćelije

**MMS $\acute{C}$**  - multipotentne mezenhimalne stromalne ćelije

**MSC** - eng. Mesenchymal stem cells/Mesenchymal stromal cells

**MTA** - eng. *Mineral trioxide aggregate*

**mTOR** - eng. *Mammalian Target of Rapamycin*

**MUFA** - mononezasićene masne kiseline (eng. *Monounsaturated Fatty Acids*)

**NAC** - N-acetil-L-cistein

**NADPH** – Nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat

**NFκB** - eng. *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

**NOX4** – NADPH-oksidaža, izoforma 4

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

**PDLSCs** – matične ćelije poreklom iz periodontalnog ligamenta (eng. *Periodontal Ligament Stem Cells*)

**PDT** – vreme udvajanja broja ćelija u kulturi (eng. *Population Doubling Time*)

**PGE2** - prostaglandin E2

**PHD** – prolil-hidroksilaza

**PI** – propidijum-jodid

**PI3K** - fosfatidil-inozitol 3-kinaza

**PKB** - protein-kinaza B

**pNPP** - p-nitrofenil-fosfat

**PPAR-γ2** - eng. *Peroxisome Proliferator - activated Receptor γ2*

**PUFA** - polinezasićene masne kiseline (eng. *Polyunsaturated Fatty Acids*)

**RhoA** - eng. *Ras Homolog Gene Family, Member A*

**ROS** – reaktivne vrste kiseonika

**RUNX2** - eng. *Runt-related Transcription Factor 2*

**SA-β-gal** - eng. *Senescence- associated β-galactosidase*

**SAHF** - eng. *Senescence-associated Heterochromatic Foci*

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

**SFA** - zasićene masne kiseline

**SHED** – matične ćelije poreklom iz humanih eksfoliranih zuba (eng. *Stem Cells From Human Exfoliated Deciduous Teeth*)

**SHH** - eng. *Sonic Hedgehog*

**SOD** – superoksid-dismutaza

**TAZ** - eng. *Transcriptional Coactivator with PDZ binding motif*

**TBA** - tiobarbiturna kiselina

**TGF- $\beta$**  - eng. *Transforming Growth Factor- $\beta$*

**SH** - tiolne grupe

**TIP** - proteini eng. *Tension-Induced/Inhibited Proteins*

**TRX** - tioredoksin

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

**VHL** - eng. *von Hippel Lindau Proteine*

**Wnt** – eng. *Wingless-type MMTV integration site family*

## SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD.....  | 1  |
| 2. PREGLED LITERATURE .....   | 4  |
| 2.1. Pojam i podela matičnih ćelija .....   | 4  |
| 2.2. Mezenhimalne matične ćelije .....  | 5  |
| 2.2.1. Izolacija i karakterizacija mezenhimalnih matičnih ćelija .....                            | 5  |
| 2.2.2. Potencijal za diferencijaciju mezenhimalnih matičnih ćelija <i>in vitro</i> .....          | 15 |
| 2.3. Starenje mezenhimalnih matičnih ćelija u kulturi .....                                       | 20 |
| 2.4. Imunomodulatorna uloga mezenhimalnih matičnih ćelija .....                                   | 22 |
| 2.5. Matične ćelije poreklom iz zubne pulpe.....  | 23 |
| 2.5.1. Formiranje zubne pulpe tokom embriogeneze kod ljudi .....                                  | 24 |
| 2.5.2. Karakteristike DPSC, SHED i IDPSC <i>in vitro</i> .....                                    | 26 |
| 2.5.3. Potencijal za diferencijaciju DPSC, SHED i IDPSC posle transplantacije ..                  | 28 |
| 2.5.4. Regulacija proliferacije i diferencijacije matičnih ćelija poreklom iz zubne pulpe .....   | 29 |
| 2.5.5. Pretkliničke i kliničke studije .....  | 31 |
| 2.6. Oksidativni stres i antioksidativna zaštita .....  | 32 |
| 2.6.1. Oksidativni stres .....  | 32 |
| 2.6.2. Mehanizmi antioksidativne zaštite na nivou ćelije.....                                     | 35 |
| 2.7. Dejstvo N-acetil-L-cistein-a .....   | 38 |
| 3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA .....   | 41 |
| 4. MATERIJAL I METODE .....   | 42 |
| 4.1. Izolacija ćelija.....  | 42 |
| 4.2. Određivanje CFU-F .....  | 43 |
| 4.3. Analiza efekta NAC na populaciju ekspaniranih ćelija poreklom iz zubne pulpe .....           | 43 |
| 4.3.1. Vreme udvajanja broja ćelija u kulturi .....   | 43 |
| 4.3.2. Određivanje fenotipa ekspaniranih ćelija .....   | 44 |
| 4.3.3. Određivanje aktivnosti aldehid-dehidrogenaze .....   | 45 |
| 4.3.4. Analiza ćelijskog ciklusa propidijum-jodidom.....  | 45 |
| 4.3.5. Određivanje broja deoba testom sa karboksifluoresceinom .....                              | 46 |
| 4.3.6. Procena ćelijske proliferacije pomoću BrdU eseja.....                                      | 46 |
| 4.3.7. Određivanje broja živih ćelija „Trypan Blue” testom .....                                  | 47 |
| 4.3.8. Određivanje broja apoptotičnih ćelija.....   | 47 |
| 4.3.9. Određivanje aktivnosti $\beta$ -galaktozidaze .....  | 48 |
| 4.3.10. Diferencijacija ćelija <i>in vitro</i> .....  | 49 |
| 4.3.11. Alizarin Red S bojenje.....   | 50 |
| 4.3.12. Oil Red O-bojenje i kvantifikacija adipogene diferencijacije .....                        | 50 |
| 4.3.13. Histohepijska i imunohistohepijska analiza hondrogenih peleta .....                       | 51 |
| 4.3.14. Kolorimetrijsko određivanje aktivnosti enzima alkalna fosfataza u ćelijskom lizatu.....   | 51 |
| 4.3.15. In situ hibridizacija .....   | 52 |
| 4.3.16. Određivanje koncentracije glikozaminoglikana .....  | 52 |
| 4.3.17. Kvantifikacija DNK.....   | 53 |
| 4.4. Određivanje stepena oksidativnog oštećenja i aktivnosti enzima antioksidativne odbrane ..... | 53 |
| 4.4.1. Liziranje ćelija i odvajanje ćelijskih proteina.....                                       | 53 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.4.2. Koncentracija proteina u ćelijskom lizatu .....  | 54  |
| 4.4.3. Određivanje aktivnosti katalaze.....   | 54  |
| 4.4.4. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze.....   | 54  |
| 4.4.5. Određivanje količine malondialdehida (MDA).....  | 55  |
| 4.4.6. Određivanje ukupnih tiolnih (-SH) grupa.....   | 55  |
| 4.4.7. Određivanje relativne zastupljenosti LDH izoenzimskih oblika u<br>supernatantu.....            | 55  |
| 4.4.8. Određivanje sadržaja karbonilnih grupa u oksidovanim proteinima u<br>supernatantu.....         | 56  |
| 4.5. Analiza masno-kiselinskog profila ukupnih ćelijskih lipida gasno-tečnom<br>hromatografijom ..... | 56  |
| 4.5.1. Ekstrakcija ukupnih lipida iz ćelija .....   | 56  |
| 4.5.2. Ekstrakcija ukupnih lipida iz FBS .....  | 57  |
| 4.5.3. Gasno-tečna hromatografija .....   | 57  |
| 4.6. Statistička analiza .....  | 58  |
| 5. REZULTATI .....  | 59  |
| 5.1. Izolacija početne populacije ćelija.....   | 59  |
| 5.2. Proliferacija ćelija tokom dugotrajne kultivacije.....   | 59  |
| 5.3. Ekspresija površinskih antigena tokom kultivacije .....  | 61  |
| 5.4. Određivanje apoptoze tokom kultivacije ćelija .....  | 64  |
| 5.5. Detekcija HIF-1 $\alpha$ tokom kultivacije ćelija .....  | 65  |
| 5.6. Određivanje aktivnosti $\beta$ -galaktozidaze tokom kultivacije ćelija.....                      | 65  |
| 5.7. Diferencijacija .....  | 67  |
| 5.7.1. Osteogena diferencijacija .....  | 67  |
| 5.7.2. Adipogena diferencijacija.....   | 70  |
| 5.7.3. Hondrogena diferencijacija .....   | 71  |
| 5.8. Uticaj N-acetil-L-cisteina na proliferaciju ćelija u kulturi .....                               | 72  |
| 5.9. Uticaj N-acetil-L-cisteina na procenat ćelija u apoptozi .....                                   | 76  |
| 5.10. Uticaj N-acetil-L-cisteina na ekspresiju antigena na površini ćelija .....                      | 78  |
| 5.11. Uticaj N-acetil-L-cisteina na broj ćelija koje ekspimiraju ALDH .....                           | 79  |
| 5.12. Uticaj N-acetil-L-cisteina na aktivnost $\beta$ -galaktozidaze .....                            | 80  |
| 5.13. Uticaj N-acetil-L-cisteina na diferencijaciju ćelija izolovanih iz pulpe zuba ...               | 81  |
| 5.13.1. Uticaj N-acetil-L-cisteina na osteogenu diferencijaciju .....                                 | 81  |
| 5.13.2. Uticaj N-acetil-L-cisteina na adipogenu diferencijaciju.....                                  | 83  |
| 5.13.3. Uticaj N-acetil-L-cisteina na hondrogenu diferencijaciju .....                                | 85  |
| 5.14. Određivanje oksidativnog oštećenja lipida i proteina.....                                       | 86  |
| 5.14.1. Stepen lipidne peroksidacije.....   | 86  |
| 5.14.2. Profil masnih kiselina .....  | 86  |
| 5.14.3. Sadržaj karbonilnih grupa.....  | 89  |
| 5.14.4. Sadržaj -SH grupa.....  | 90  |
| 5.14.5. Aktivnost enzimskih antioksidanata: superoksid-dismutaze i katalaze.....                      | 91  |
| 5.15. Uticaj NAC-a na ekspresiju HIF-1 $\alpha$ .....   | 94  |
| 5.16. Uticaj NAC-a na relativnu aktivnost ukupne LDH i relativnu zastupljenost LDH<br>izoforni .....  | 94  |
| 6. DISKUSIJA .....  | 98  |
| 6.1. CFU-F test i proliferacija ćelija tokom dugotrajne kultivacije.....                              | 99  |
| 6.2. Ekspresija površinskih antigena tokom kultivacije .....  | 101 |
| 6.3. Diferencijacija DTSC .....   | 103 |



|  |     |
|--|-----|
| 6.4. NAC povećava broj ćelija u kulturi.....                                     | 104 |
| 6.5. NAC povećava aktivnost ALDH u jednoj populaciji ćelija u kulturi.....       | 106 |
| 6.6. NAC smanjuje aktivnost SA- $\beta$ -gal <i>in vitro</i> .....               | 107 |
| 6.7. NAC stimuliše osteogenu i hondrogenu, a inhibira adipogenu diferencijaciju  | 108 |
| 6.8. NAC smanjuje oksidativno oštećenje proteina i lipida .....                  | 110 |
| 6.9. NAC smanjuje aktivnost enzima antioksidativne zaštite .....                 | 111 |
| 6.10. NAC povećava relativnu aktivnost LDH <sub>4</sub> i LDH <sub>5</sub> ..... | 112 |
| 7. ZAKLJUČAK.....  | 115 |
| 8. LITERATURA .....  | 117 |
| BIOGRAFIJA   |     |
| PRILOZI  |     |

## 1. UVOD

Razvoj nauke i naučne misli u biologiji nekada ide ispred tehnološkog napretka, a nekada mora da sačeka razvoj različitih tehnologija da bi uhvatio zamah i napravio kvalitativan pomak napred. Početak XXI veka je u biologiji i medicini obeležen obimnim radom na proučavanju matičnih ćelija, izolovanih iz različitih tkiva ljudi i životinja u svim fazama njihovog rasta i razvoja. Osobine koje poseduju ove za život strateške ćelije, čine ih jedinstvenim za razvoj regenerativne medicine i daju nadu da bi kvalitet života ljudi i životinja, sa mnogim hroničnim bolestima, mogao da bude bolji ukoliko bi terapija matičnim ćelijama postala dostupna u rutinskoj praksi. Veliki naučnici kao što su *Rudolph Virchow*, *Artur Pappenheim*, *Ernst Neumann*, *Alexandar Maximov* i drugi su još sredinom XIX i početkom XX veka oblikovali savremeni koncept obnove i održanja homeostaze tkiva pomoću matičnih ćelija (rev: Huntly i Gilliland, 2005). Međutim, tek je XXI vek sa sobom doneo tehnologije (genetski inženjering, bioreaktori, nanotehnologija) koje bi mogle da budu baza realnih mogućnosti primene matičnih ćelija u terapiji različitih oboljenja. Brojne kontroverze oko terapijske upotrebe embrionalnih matičnih ćelija i indukovanih pluripotentnih matičnih ćelija, čine da su matične ćelije odraslog organizma najaktuelnija populacija ćelija za terapijsku primenu. Osim matičnih ćelija hematopoeze (MČH) koje su suvereno vladale poljem ćelijske terapije više od 50 godina, i koje su na jedan način dogmatski oblikovale naš pogled na koncept matičnosti, kroz veliki broj istraživačkih poduhvata, poslednjih desetak godina, se probila druga velika i značajna populacija matičnih ćelija: mezenhimalne matične ćelije (MMC). Prema bazi podataka Nacionalnog instituta za zdravlje u Sjedinjenim Američkim Državama, trenutno su u svetu odobrene 324 kliničke studije, koje imaju za cilj evaluaciju dejstva MMC u regeneraciji i reparaciji različitih tkiva (juni 2013 godine). Tako je 180 studija usmereno na stimulaciju regeneracije koštanog tkiva, 44 studije na regeneraciju/reparaciju srčanog mišića, 40 studija na regeneraciju jetre i 20 studija na poboljšanje reparacije zglobne hrskavice (<http://www.clinicaltrials.gov>). Takođe, 20 studija je posvećeno ublažavanju posledica reakcije kalema protiv domaćina posle terapijske primene MČH (<http://www.clinicaltrials.gov>). Osnovna osobina koja MMC odraslih organizama čini značajnim za kliničku praksu je činjenica da tokom postnatalnog života zadržavaju

svojstvo da po adekvatnoj stimulaciji prođu čitav embrionalni put razvoja pojedinih tkiva da bi u slučaju oštećenja ćelija tih tkiva mogle na odgovarajući način da učestvuju u reparaciji i regeneraciji. Koštana srž je tradicionalno osnovni izvor MČH i MMČ za kliničku praksu. Alternativni izvor MMČ sa izrazitom sposobnošću *in vitro* ekspanzije su **pulpa mlečnih i stalnih zuba**. Naime, matične ćelije koje se nalaze u pulpi mlečnih i stalnih zuba potiču od ektomezenhima koji je postnatalno zadržao svojstva slična embrionalnim matičnim ćelijama (Kerkis i Caplan, 2012). Iako matičnih ćelija u zubnoj pulpi ima malo, one su lako dostupne posle vađenja zuba (poželjno je da je zub za obradu dobijen posle vađenja iz ortodontskih razloga), njihova izolacija je jednostavna, rast u kulturi brz i imaju antiinflamatorno i/ili imunosupresivno dejstvo (Tomić i sar., 2011; Djokić i sar., 2012). Takođe imaju mogućnost diferencijacije u odontoblaste, osteoblaste, hondroците, adipocite, mišićne ćelije, neurone i ćelije pankreasa (Kerkis i Caplan, 2012) te predstavljaju idealnu populaciju ćelija za regenerativnu medicinu. Takođe, na prostoru Evrope, postoji nekoliko privatnih banaka za dugotrajno deponovanje matičnih ćelija izolovanih iz zubne pulpe. Postojanje banaka omogućava njihovu lakšu primenu za autologu/alogenu transplantaciju.

Iako dentalna medicina prednjači u istraživanjima i primeni inovativnih biotehnoloških rešenja, do juna 2013. godine prijavljeno je regrutovanje kandidata za samo jednu kliničku studiju čiji je cilj regeneracija zubne pulpe transplantacijom autologih matičnih ćelija izolovanih iz zubne pulpe mlečnih zuba (<http://www.clinicaltrials.gov>). S druge strane, više radova je posvećeno pretkliničkim ispitivanjima na miševima i pacovima koja imaju za cilj definisanje metoda koje bi dovele do *in vivo* regeneracije svih struktura zuba i njegovo adekvatno uzgobljavanje u alveolarnu kost (Yamamoto i sar., 2013; Duailibi i sar., 2004; Oshima i sar., 2011).

Nezaobilazna faza u svim biotehnološkim rešenjima u regenerativnoj medicini i ćelijskoj terapiji je dobijanje zadovoljavajućeg broja MMČ koje imaju potencijal da se diferenciraju u željeni tip ćelije. Najveći broj laboratorija koje se bave matičnim ćelijama i tkivnim inženjeringom ekspandira MMČ u nefiziološkim uslovima sa 20% O<sub>2</sub>. Visoke koncentracije kiseonika mogu da dovedu do oksidativnog oštećenja različitih ćelijskih struktura, promena u metabolizmu ekspandiranih ćelija (Vacanti i Metallo, 2013), ali mogu da poremete i finu signalizaciju usmerenu na balans procesa kao što su samoobnova, proliferacija i diferencijacija ćelija (Hermitte i sar., 2006;

Kovačević Filipović i sar., 2007). S druge strane, danas je već višestruko potvrđeno da je kultivacija MMĆ, kao i MČH u uslovima u kojima je koncentracija kiseonika bliska fiziološkim mnogo bolja za očuvanje matičnosti (Ivanović i Boiron, 2009; Kovačević Filipović i sar., 2007) i za dobijanje boljih rezultata prihvatanja kalema po transplantaciji ćelija (Jaussaud i sar., 2013). Takođe je pokazano da postoji mogućnost da se kultivacija ćelija na niskim koncentracijama O<sub>2</sub> zameni dodavanjem antioksidanasa u kulture. N-acetil-L-cistein (NAC) je antioksidans koji se već koristi u medicini kao pomoćno lekovito sredstvo (Kelly, 1998). Njegova primena *in vitro* na matičnim ćelijama se još uvek ispituje, a dosadašnji rezultati pokazuju da NAC ima pozitivan efekat u smislu inhibicije nastanka oksidativnih oštećenja i poboljšanja ekspresije adhezivnih molekula obezbeđujući *in vitro* uslove u kojima je transplantacija MMĆ efikasnija (Song i sar., 2010). Međutim, koncentracija NAC koja može da ima pozitivno dejstvo na proliferaciju i/ili diferencijaciju matičnih ćelija zubne pulpe nije do sada ispitana. Zbog toga je cilj ovog rada bio da ispita *in vitro* efekte NAC na proliferaciju i diferencijaciju matičnih ćelija zubne pulpe dece.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Pojam i podela matičnih ćelija

Matične ćelije su nediferencirane ćelije jednog organizma koje imaju sposobnost samoobnove, visok proliferativni potencijal i mogućnost diferencijacije u različite tipove zrelih ćelija. Matične ćelije možemo podeliti prema periodu života u kom vrše određenu funkciju, na embrionalne, fetalne i adultne matične ćelije. Embrionalne i fetalne matične ćelije su neophodne za embrionalni razvoj i organogenezu. Embrionalne matične ćelije su pluripotentne, odnosno od njih nastaju ćelije endoderma, mezoderma i ektoderma. Fetalne matične ćelije se smatraju multipotentnim ćelijama, odnosno njihov potencijal za diferencijaciju je ograničen na razvoj ćelija jednog klicinog lista, mada u zavisnosti od anatomske lokalizacije i perioda uzorkovanja, ove ćelije pokazuju veliku plastičnost i još uvek nisu dovoljno ispitane (Pojda i sar., 2005). Matične ćelije koje su prisutne u tkivima postnatalno se nazivaju adultne matične ćelije. One su takođe multipotentne i imaju ulogu u održavanju homeostaze pojedinih tkiva kao i ulogu u regeneraciji i reparaciji različitih tkiva. Osim embrionalnih, fetalnih i adultnih matičnih ćelija koje su neophodne za normalan rast i razvoj organizma i održavanje homeostaze tkiva, smatra se da postoje i matične ćelije tumora koje su odgovorne za nastanak i rast tumora (Chen i sar., 2013).

Matične ćelije se takođe mogu podeliti prema anatomsko/histološkoj lokalizaciji i samoj funkciji. Najbolji primer matičnih ćelija, i hijerarhijske organizacije nezrelih i zrelih ćelija jednog tkiva, je svakako hematopoetsko tkivo. Tokom procesa hematopoeze od malog broja nediferenciranih MČH, preko niza progenitora koji su opredeljeni za pojedine krvne loze, svakog sekunda u organizmu nastaju milioni zrelih ćelija krvi (Dzierzak i Philipsen, 2013). Epitelna tkiva koja se kontinuirano obnavljaju, takođe poseduju definisanu funkcionalnu hijerarhijsku organizaciju koja podrazumeva da od malog broja primitivnih ćelija nastaje veliki broj diferenciranih, zrelih ćelija neophodnih za funkciju tkiva. U epitelnim tkivima je čak i anatomsko/histološka lokalizacija matičnih ćelija definisana (Freeman, 2008). Međutim, anatomska lokalizacija MMĆ još uvek nije sa sigurnošću pokazana. MMĆ koje se zapravo *in vivo* najviše aktiviraju tokom oštećenja tkiva, *in vitro* pokazuju zadivljujući proliferativni

potencijal, ali i mogućnosti diferencijacije kakva nije pokazana za MČH i matične ćelije epitela. Od svih MMC, ćelije zubne pulpe pokazuju najveću plastičnost, što je najverovatnije povezano sa činjenicom da one nastaju od ćelija koje su tokom embrionalnog razvoja prošle ektomezenhimalnu tranziciju (Kerkis i Caplan, 2012). Zbog toga je ova ćelijska populacija od posebnog značaja za regenerativnu medicinu.

## **2.2. Mezenhimalne matične ćelije**

### **2.2.1. Izolacija i karakterizacija mezenhimalnih matičnih ćelija**

Mezenhimalne matične ćelije (MMC) se postnatalno mogu izolovati iz različitih tkiva koja imaju vezivno tkivne komponente (**Tabela 1**). One vode poreklo od mezoderma/ektomezenhima i za sada je jasno definisano da je njihova *in vivo* uloga da omoguće sporo, ali kontinuirano, obnavljanje koštanog tkiva, umnožavanje adipocita, obezbede apozicioni rast hrskavice ukoliko je prisutan odgovarajući stimulus i obezbede adekvatnu mikrosredinu za neometano odvijanje hematopoeze (Pittenger i sar., 2000). U uslovima fiziološke ravnoteže, biološki aktivni molekuli omogućavaju da se paralelno sa retkim proliferacijama odvija i diferencijacija MMC u ćelije pojedinih tkiva. Nasuprot tome, intenzivan stimulus za aktivaciju MMC je svako oštećenje tkiva koje pokreće inflamatornu reakciju. Inflamatorna reakcija s jedne strane uključuje aktivaciju različitih vrsta leukocita koji uništavaju i uklanjaju štetni agens, a sa druge strane obezbeđuje aktivaciju MMC koje proliferišući i stvarajući fibroblaste popunjavaju defekt tkiva i vode rezoluciji inflamacije (Caplan i Correa, 2011). Iako su navedene uloge MMC jasne, njihova tkivna lokalizacija i tačan fenotip na osnovu koga bi se razlikovale od zrelijih ćelija potomaka još uvek nisu sa sigurnošću pokazane (Frenette i sar., 2013). Zapravo, većina autora koji se bave problematikom MMC ističe da se o funkcionalnim i fenotipskim karakteristikama ovih ćelija više zna na osnovu njihovih *in vitro* karakteristika nego na osnovu zapažanja *in vivo* (da Silva Meirelles i sar., 2008).

Tabela 1. Tkiva i organi iz kojih su izolovane MMC

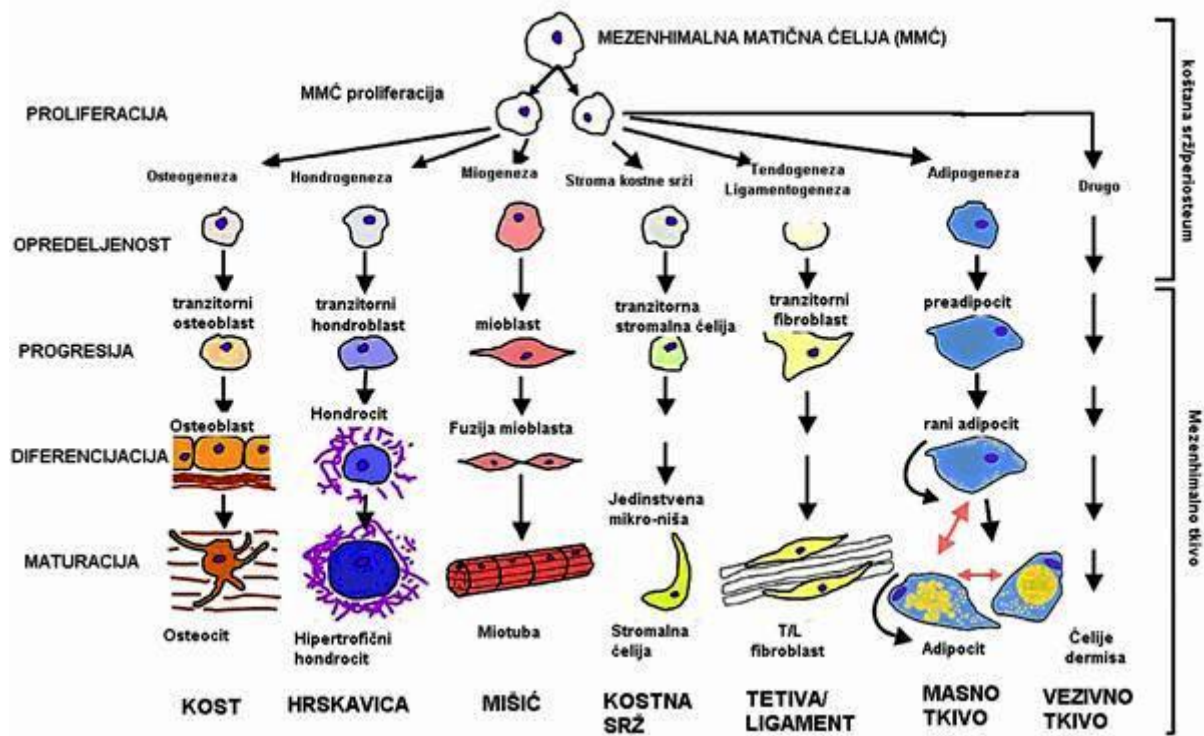
| <i>Izvor MMC</i>               | <i>Diferencijacija in vitro</i>   | <b>Reference</b>  |
|--------------------------------|---|---|
| <b>Koštana srž</b>             | Osteoblasti, hondroblasti, stromalne ćelije <sup>1</sup><br>Osteoblasti, adipociti, hondroblasti <sup>2</sup>   | Friedenstein i sar., 1966 <sup>1</sup><br>Pittenger i sar., 1999 <sup>2</sup>   |
| <b>Masno tkivo</b>             | Osteoblasti, adipociti, hondroblasti, neuroni, miociti <sup>3</sup><br>Osteoblasti, adipociti, hondroblasti, mioblasti <sup>1</sup><br>Osteoblasti, adipociti, hondroblasti, neuroni, endotelne ćelije <sup>2</sup> , kardiomiocitima slične ćelije <sup>3</sup> , ćelije koje proizvode insulin <sup>4</sup> | Bianco i sar., 2001 <sup>3</sup><br>Zuk i sar., 2002 <sup>1</sup><br>Nakagami i sar., 2006 <sup>2</sup> ,<br>Dave i sar., 2013 <sup>3</sup> ,<br>Léobon i sar., 2009 <sup>4</sup>       |
| <b>Perihondrium</b>            | Osteoblasti, adipociti, hondroblasti, ćelije strome   | Arai i sar., 2002   |
| <b>Mišići</b>                  | Mišićne ćelije, adipociti, hondroblasti, osteoblasti, fibroblasti, endotelne ćelije   | Young i sar., 2001  |
| <b>Pupčanik krv</b>            | Osteoblasti, adipociti, hondroblasti, neuroni, ćelije slične endotelnim ćelijama <sup>1</sup> , ćelije koje proizvode insulin <sup>2</sup>  | Li i sar., 2012 <sup>1</sup><br>Boroujeni i sar., 2013 <sup>2</sup>   |
| <b>Pupčanik stroma</b>         | Osteoblasti, adipociti, hondroblasti, hepatocitima <sup>1</sup> i neuronima <sup>2</sup> slične ćelije  | Zhang i sar., 2009 <sup>1</sup> , Ma i sar., 2005 <sup>2</sup>  |
| <b>Korneal stroma</b>          | Hondroblasti, nervne ćelije   | Du i sar., 2005   |
| <b>Jetra (stomatne ćelije)</b> | Adipociti, osteoblasti  | Kordes i sar., 2013   |
| <b>Pankreas</b>                | Osteociti, adipociti, neuroni, ćelije pankreasa   | Gopurappilly i sar., 2013   |
| <b>Koža</b>                    | Neuroni, glija, glatkomišićne ćelije, adipociti   | Toma i sar., 2001   |
| <b>Folikuli dlake</b>          | Adipociti, osteoblasti <sup>1</sup><br>Neuroni, glija, keratinociti, glatkomišićne ćelije, melanociti <sup>2</sup>  | Jahoda i sar., 2003 <sup>1</sup><br>Amoh i sar., 2008 <sup>2</sup>  |
| <b>Tetive</b>                  | adipociti, osteoblasti, hondroblasti  | Bi i sar., 2007   |
| <b>Zubna pulpa</b>             | Odontoblasti, adipociti, nervne ćelije <sup>1</sup><br>Osteoblasti, odontoblasti <sup>2</sup><br>Osteoblasti, adipociti, hondroblasti, neuroni, miociti <sup>3</sup> , endotelne ćelije <sup>4</sup> , hepatocitima slične ćelije <sup>5</sup>  | Miura i sar., 2003 <sup>1</sup><br>Gronthos i sar., 2000 <sup>2</sup><br>Kerkis i sar., 2006 <sup>3</sup> ,<br>Bento i sar., 2013 <sup>4</sup> ,<br>Ishkitiev i sar., 2012 <sup>5</sup> |
| <b>Periodontalni ligament</b>  | Cementoblasti, adipociti, ćelije koje sintetiziraju kolagen   | Seo i sar., 2004  |
| <b>Placenta</b>                | Adipociti, osteoblasti  | Fukuchi i sar., 2004  |
| <b>Endometrium</b>             | Osteoblasti, adipociti, hondroblasti, glatkomišićne ćelije  | Gargett i sar., 2009  |
| <b>Zglobna hrskavica</b>       | Osteoblasti, adipociti, hondroblasti <sup>1</sup><br>Hondroblasti <sup>2</sup>  | Alsalamah i sar., 2004 <sup>1</sup><br>Williams i sar., 2010 <sup>2</sup>   |
| <b>Sinovium</b>                | Adipociti, osteoblasti, hondroblasti  | Sakaguchi i sar., 2005  |
| <b>Amnionska tečnost</b>       | Adipociti, osteoblasti, mišićne ćelije, endotelne, nervne ćelije, hepatociti <sup>1</sup><br>Osteoblasti, adipociti, hondroblasti, neuroblasti <sup>2</sup>   | De Coppi i sar., 2007 <sup>1</sup><br>Mareschi i sar., 2009 <sup>2</sup>  |

*Alexandar Friedenstein* (Friedenstein i sar., 1966, 1970) je, uz pomoć nekoliko različitih eksperimentalnih pristupa, pokazao da se među ćelijama izolovanim iz koštane srži, osim MČH, nalaze i ćelije koje *in vivo* mogu da se diferenciraju u stromu koštane srži, osteoblaste i hondroците, a *in vitro* formiraju kolonije fibroblasta. Analogno tada

već uvedenoj terminologiji za opisivanje ranih prethodnika krvnih ćelija, ćelije koje formiraju kolonije sastavljene od fibroblasta nazvane su *Colony Forming Unit - Fibroblasts* (CFU-F). Njihova klonalna priroda pokazana je pozitivnom linearnom zavisnošću broja zasađenih ćelija koštane srži i broja nastalih CFU-F (Friedenstein i sar., 1970). Ovaj funkcionalni test je i do danas ostao osnova za definisanje proliferativnog potencijala MMĆ izolovanih iz pojedinih tkiva. Što je još značajnije, Friedenstein je u svojim eksperimentima pokazao da CFU-F nakon serije transplantacija singenim životinjama zadržavaju mogućnost ektopičnog formiranja koštanog tkiva, odnosno pokazao je **mogućnost samoobnove MMĆ** (Friedenstein i sar., 1974).

Paralelno sa ispitivanjima Alexandra Friedensteina, u laboratoriji Arnolda Caplana proučavan je osteogeni i hondrogeni potencijal mezenhima pilećih embriona starih nekoliko dana. Posle dužeg niza eksperimenata koji su imali za cilj da pokažu da osteoblasti nastaju od hondroblasta, uočeno je da su nezavisne progenitorske/prekursorske ćelije odgovorne za nastanak hondroblasta, osteoblasta i mioblastu, na osnovu čega je postavljena hipoteza o postojanju **multipotentnih mezenhimalnih matičnih ćelija** (Caplan i sar., 1991). Takođe je pretpostavljeno da se i kod odraslih organizama u tkivima zadržavaju ćelije sa karakteristikama mezenhimalnih ćelija, te je Arnold Caplan popularisao termin **mezenhimalne matične ćelije** za sve ćelije koje imaju potencijal istovetan onom koji je utvrđen kod pilećih embriona. Šema 1 prikazuje originalan crtež ovog naučnika koji se odnosi na potencijal diferencijacije MMĆ (**šema 1**). Kako je izolacija adherentnih ćelija koje se karakterišu visokim proliferativnim potencijalom i mutipotentnošću, relativno jednostavna za izvođenje, a široka paleta mogućnosti njihove kliničke upotrebe stimulatívna, veliki broj laboratorija je svoju pažnju usmerio na istraživanja ovog tipa ćelija. Da bi se ćelije određene ćelijske populacije smatrale matičnim, moraju da pokazuju sposobnost **samoobnove**. Termin samoobnova označava deobu ćelije na dve ćelije ćerke od kojih najmanje jedna ima istovetne kapacitete za samoobnovu, proliferaciju i diferencijaciju kao i ćelija majka.





Šema 1. Mezenhimalne matične ćelije (MMC) *in vitro* imaju veliki potencijal za proliferaciju i diferencijaciju. Na ovoj šemi su prikazani putevi diferencijacije MMC u različite zrele ćelije (Šema preuzeta iz rada Caplan i sar., 1994)

Klasičan i elegantan pristup dokazivanju svojstva samoobnove ostvaren je prilikom ispitivanja matičnih ćelija za hematopoezu (MČH). Naime, zlatni standard za dokazivanje samoobnove MČH je dugotrajna/doživotna repopulacija hematopoeze primaoca sa mijeloblacijom, tokom serijskih transplantacija MČH (Till i McCulloch, 1961; Nibley i Spangrude, 1998). Kako su eksperimenti sa transplantacijom MMC izuzetno zahtevni u odnosu na transplantaciju MČH, ovaj vid ispitivanja nikada nije preporučen kao deo nezaobilaznih procedura prilikom definisanja MMC. Iz tog razloga, veliki broj istraživača smatra da je MMC zapravo bolje definisati kao **mutipotentne ćelije strome**, jer taj naziv u potpunosti opisuje njihovo poreklo, kao i njihov potencijal za diferencijaciju koji se može pokazati *in vitro*. Međutim, kako u engleskom govornom području *Mesenchymal Stem Cells* i *Multipotent Stromal Cells* imaju isti akronim – MSCs, opšte je prihvaćeno da su i sami nazivi sinonimi (Bianco i sar., 2008). Ipak, nedavno je samoobnova humanih MMC potvrđena eksperimentalnim pristupom koji u osnovi ima isti funkcionalni pristup kao eksperimenti koje je izveo A. Friedenstein

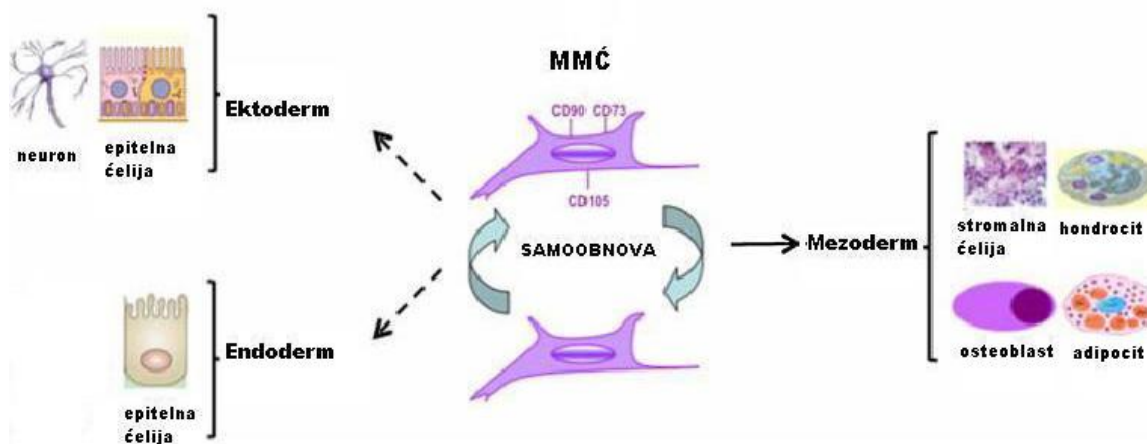
(Sacchetti i sar., 2007). Naime, serijskim ksenotransplantacijama CD146+ ćelija poreklom od jedne CFU-F izolovane iz koštane srži, pokazano je da humane adventicijalne retikularne ćelije učestvuju u ektopičnom formiranju krvnih sudova i koštanog tkiva primaoca, odnosno da mogu da se samoobnavljaju i da se diferenciraju u osteoblaste (Sacchetti i sar., 2007).

**Proliferativni potencijal MMĆ** se prevashodno procenjuje brojem deoba koje se mogu odigrati *in vitro*, pre nego što dođe do ćelijskog starenja i prekida deoba ćelija. Za kliničku primenu je veoma važno proceniti optimalan broj deoba, koji treba da omogući dobijanje dovoljnog broja ćelija za terapiju, u odnosu na očuvanje njihovog kapaciteta za diferencijaciju u funkcionalne ćelije različitih tkiva. Pojedine procene u literaturi ukazuju da se ekspanzija ćelija mora prekinuti u trećoj pasaži (oko 15 dana kultivacije) dok se neke studije baziraju na upotrebi ćelija ekspanziranih do osme pasaže (oko 40 dana kultivacije) s obzirom na to da je i u osmoj pasaži pokazana visoka proliferativna sposobnost, stabilnost fenotipa i pluripotentnost MĆ poreklom iz koštane srži (Khoo i sar., 2008). Neželjeni efekat dugotrajne kultivacije ćelija je njihova spontana imortalizacija (Brandl i sar., 2010). Veliki broj kliničkih studija se ograničava na primenu ćelija izolovanih iz vezivnih tkiva bez prethodne manipulacije *in vitro* (Martin i sar., 2012)

**Hijerarhijska organizacija i plastičnost mezenhimalnih matičnih ćelija:** Pretpostavka o hijerarhijskoj organizaciji MMĆ se zasniva na analogiji između MČH i MMĆ i na eksperimentalnim dokazima takve organizacije. Naime, mali broj primitivnih multipotentnih matičnih ćelija koje imaju svojstvo samoobnove, proliferiše i diferencira se u veći broj bipotentnih i/ili unipotentnih progenitorskih ćelija koje gube sposobnost samoobnove i čiji se proliferativni potencijal smanjuje (Caplan i sar., 1991; Aubin i sar., 1998). Tako je pokazano, da se jedna trećina CFU-F iz koštane srži sastoji od ćelija koje imaju sposobnost diferencijacije u adipocite, osteoblaste i hondrocite i da se oko dve trećine ćelija mogu diferencirati u pravcu osteoblasta i hondrocita (Pittenger i sar., 1999; Muraglia i sar., 2000). Nijedna CFU-F nije imala ćelije koje su mogle istovremeno da se diferenciraju u osteoblaste i adipocite ili hondrocite i adipocite, a posle dugotrajne kultivacije ćelije su zadržavale samo osteogeni potencijal (Muraglia i sar., 2000). U istim ispitivanjima nisu pokazani unipotentni progenitori za adipocite (Muraglia i sar., 2000). Noviji podaci ukazuju da MMĆ kao i zrele ćelije potekle od MMĆ imaju

sposobnost unutar tkivne i međutkivne plastičnosti. Plastičnost je definisana kao mogućnost jedne ćelije da poprими morfološke i funkcionalne karakteristike drugog tipa ćelija i da te karakteristike trajno zadrži i posle transplantacije određenom primaocu (Lakshmipathy i Verfaillie, 2005). Ukoliko se preobražaj odigrava u ćelije koje nastaju od iste multipotentne matične ćelije onda se govori o unutartkivnoj plastičnosti, a ukoliko su u pitanju ćelije koje pripadaju drugoj lozi matičnih ćelija ili drugom klicinom listu onda je u pitanju međutkivna plastičnost (**šema 2**). Mehanizmi plastičnosti leže u epigenetskom reprogramiranju ćelija i uključuju dediferencijaciju i transdiferencijaciju ćelija (Wagers i Weissman, 2004). Dediferencijacija ćelija je proces u kome diferencirana ćelija prestaje da eksprimira gene karakteristične za njenu terminalnu funkcionalnu aktivnost, a eksprimira gene koji su bili aktivni u progenitorskoj ili matičnoj ćeliji od koje je ta zrela ćelija nastala. Na primer, hondrociti izolovani iz hrskavice digestijom, *in vitro* se dediferenciraju i proliferišu, a po transplantaciji u defekt hijaline hrskavice ponovo diferenciraju u hondrocite što je iskorišćeno u terapijske svrhe (Brittberg i sar., 1994). Takođe, dediferencirani hondrociti poreklom iz hijaline hrskavice u kulturi sintetišu kolagen tipa I, a ne sintetišu kolagen tip II (Schnabel i sar., 2002). Transdiferencijacija je direktno pretvaranje jedne ćelije u drugu ćeliju poreklom od istog ili drugog klicinog lista (Wagers i Weissman, 2004). U prisustvu odgovarajućih biološki aktivnih molekula kao što su, deksametazon i IBMX-a (3-isobutil-1-metilksantin), osteoblasti se u kulturi mogu transdiferencirati u adipocite (Nutall i sar., 1998), dok se adipociti mogu transdiferencirati u osteoblaste (Park i sar., 1999). Iako *in vitro* nalazi ukazuju na izuzetnu unutartkivnu plastičnost ćelija koje vode poreklo od mezenhimalnih ćelija, značaj tih nalaza *in vivo* ostaje da se utvrdi.

Intrigantan i još uvek nedovoljno proučen fenomen je međutkivna plastičnost koja se pripisuje samim MMĆ ili ćelijama potomcima MMĆ. Transfekcija ćelija u kulturi odgovarajućim transkripcionim faktorima i ekspresija određenih mikro-RNK molekula, dovodi do konverzije fibroblasta u neurone (Yoo i sar., 2011). Pokazano je i da se MMĆ *in vitro* mogu diferencirati i/ili transdiferencirati u kardiomiocite (Martin-Rendon i sar., 2008), glija ćelije (Radtke i sar., 2009), hepatocite (Snykers i sar., 2009), endotelne ćelije (Nakashima i sar., 2009) i ćelije endokrinog pankreasa (Zulewski, 2009).



Šema 2. Šema prikazuje sposobnost samoobnove MMĆ, kao i markere koje se najčešće koriste tokom identifikacije i karakterizacije MMĆ *in vitro*. Na šemi je prikazana sposobnost multipotentne diferencijacije u ćelije mezoderma, ali i plastičnost MMĆ u smislu diferencijacije/transdiferencijacije u ćelije koje pripadaju drugim klicinim listovima (preuzeto uz modifikacije iz Kuhn i Tuan, 2010)

**Preporuke za definisanje mezenhimalnih matičnih ćelija *in vitro*:** Da bi rezultati različitih studija bili uporedivi i da bi se kvantitet objavljenih rezultata pretvorio u kvalitativnu spoznaju o pojedinim fenomenima, a to dovelo do napretka kako u bazičnim istraživanjima tako i u kliničkoj praksi, Međunarodno udruženje za ćelijsku terapiju (ISCT – International Society for Cellular Therapy) je 2006. godine (Dominici i sar.) predložilo uniformnu karakterizaciju ovih ćelija. Preporuke ovog udruženja su da sve ćelije koje *in vitro* mogu da adheriraju za plastičnu podlogu treba da nose naziv **multipotentne mezenhimalne stromalne ćelije (MMSCĆ)**. Podgrupa ovih ćelija koja ispunjava minimalne kriterijume koji potvrđuju primitivnost *in vitro* treba da nosi naziv MMĆ. Ti kriterijumi su sledeći:

1. Adhezija za plastičnu podlogu
2. Ekspresija površinskih markera CD105, CD73 i CD90, odnosno nedostatak površinskih markera koji karakterišu hematopoetske ćelije: CD34, CD14, CD 45, HLA DR ili CD11b i CD79a ili CD19.
3. Mogućnost *in vitro* diferencijacije u adipocite, hondrocite i osteoblaste

**Adhezija za plastičnu podlogu:** Maximov (1928) je prvi uočio i opisao fibroblaste u kulturi ćelija izolovanih iz krvi zamorca. Podloga tih kultura je bio

fibrinski koagulum (Maximov, 1928). Friedenstien i sar., (1970) su razvili sistem kultivacije CFU-F u plastičnim *flask*-ovima, sa i bez sloja ozračenih ćelija. Ova prva istraživanja adherentnih ćelija prisutnih u koštanoj srži su dovela do razvoja kultura sa tzv. adherentnim *feeder* slojem u kojima se tokom više meseci održavala kontinuirana proizvodnja hematopoetskih ćelija koje su se nalazile u suspenziji (Dexter i sar., 1977). Na ovaj način je počelo oblikovanje ideje o nerazdvojnomo jedinstvu MČH i MMĆ u koštanoj srži. Brojni kasnije objavljeni radovi su pokazali da različite komponente ekstracelularnog matriksa (ECM) mogu selektivno da dovedu do adhezije pojedinih populacija mezenhimalnih ćelija sveže izolovanih iz različitih tkiva (Chen i sar., 2010). Paralelno, industrija koja podržava razvoj ćelijskih kultura je proizvela i proizvodi sve širu paletu plastičnih materijala koji stimulišu adheziju mezenhimalnih (matičnih) ćelija. Na taj način je izolacija adherentnih ćelija iz različitih tkiva postala jednostavna za rutinski rad u laboratoriji, iako još uvek nisu postignuti uslovi u kojima bi se značajno povećao broj primitivnih MMĆ. Zanimljivo je da postoje radovi u kojima je pokazano da MMĆ mogu da se održe u nediferenciranom stanju kada se nalaze u kulturi u obliku suspenzije (Baksh i sar., 2007).

**Fenotip mezenhimalnih matičnih ćelija *in vitro*:** Fenotipska karakterizacija određene ćelijske populacije je važna sa aspekta jasnog povezivanja fenotipa i funkcije ćelija koje su izolovane iz pojedinih tkiva i njihove moguće kliničke primene. Kako je veliki broj istraživanja izveden na MMĆ izolovanim iz koštane srži, najvažnija potreba prilikom njihove karakterizacije je jasno razdvajanje od hematopoetskih ćelija. Tako se definisanje fenotipa MMĆ *in vitro* bazira na identifikaciji kombinacije antigena koji ukazuju da ćelije imaju mezodermalno poreklo (CD44, CD106, STRO-1, CD146), i da ne pripadaju hematopoetskoj lozi ćelija (nema ekspresije CD34, CD14 i CD45). Istraživanja sprovedena poslednjih godina ukazuju da ekspresija CD146 molekula na MMĆ *in vitro* i na pericitima *in vivo* ukazuje da su periciti MMĆ. Mnoge studije su pokazale da periciti imaju sve karakteristike MMĆ (Baksh i sar., 2007; Sacchetti i sar., 2007; Covas i sar., 2008)

**Aktivnost aldehid-dehidrogenaze kao potencijalni marker matičnosti:** Fenotipska karakterizacija ne ukazuje uvek na funkcionalne osobine ćelija, te je za bazična i primenjena istraživanja važno utvrditi i metaboličke/funkcionalne osobine matičnih ćelija. Pretpostavlja se da matične ćelije (MMĆ i MČH) kao i tumorske ćelije

imaju visoku aktivnost podklase 1 aldehid-dehidrogenaze (**ALDH**) (izoformi ALDH1A1 i ALDH1A3), enzima koji je uključen u metabolizam retinoične kiseline. Retinoična kiselina je mali molekul, morfogen koji svoje delovanje ostvaruje posredstvom specifičnih receptora, aktivirajući transkripcione faktore koji regulišu brojne razvojne procese u organizmu (Dolle, 2009; Mark, 2009). Takođe se smatra da su ove izoforme važne u antioksidativnoj zaštiti ćelija (Marchitti sar., 2008). Kako su MMC važne za održanje homeostaze različitih tkiva tokom čitavog života jedinke, može se pretpostaviti da je sa evolutivnog stanovišta značajno da matične ćelije imaju aktivirane sve enzime koji učestvuju u antioksidativnoj zaštiti, uključujući i ALDH1. Tako je ALDH1 visoko eksprimirana u embrionalnim tkivima, kao i u adultnim matičnim ćelijama poreklom iz koštane srži, mozga, mišića i brojnih drugih tkiva (Moreb i sar., 2012)

Tabela 2. Izoforme ALDH i njihova uloga u MĆ, normalnim i kancerskim (preuzeto uz modifikacije iz Muzio i sar., 2012)

| <i>Familija</i> | <i>Izoforme</i> | <i>Lokalizacija</i>    | <i>Najznačajniji supstrat</i>      | <i>MĆ/MĆK uloga</i>   |
|-----------------|-----------------|------------------------|------------------------------------|---|
| <b>ALDH1</b>    | ALDH1A1         | citoplazma             | Retinal, acetaldehid, LPO          | MĆ citoprotektivna uloga, modulacija diferencijacije i proliferacije<br>MĆ, MĆK citoprotektivna uloga, modulacija diferencijacije i proliferacije<br>MĆ, MĆK citoprotektivna uloga, modulacija diferencijacije i proliferacije<br>MĆ, MĆK citoprotektivna uloga, modulacija diferencijacije i proliferacije<br>MĆ, MĆK citoprotektivna uloga, modulacija diferencijacije i proliferacije<br>MĆ, MĆK detoksikacija |
|                 | ALDH1A2         | citoplazma             | Retinal                            |   |
|                 | ALDH1A3         | citoplazma             | Retinal                            |   |
|                 | ALDH1A7         | citoplazma             | Retinal                            |   |
|                 | ALDH1B1         | mitohondrije           | Acetaldehid, LPO                   |   |
|                 | ALDH1L1         | citoplazma             | 10-formiltetrahidrofolat           |   |
|                 | ALDH1L2         | citoplazma             | -                                  |   |
| <b>ALDH2</b>    | ALDH2           | citoplazma             | Acetaldehid                        | MĆK detoksikacija   |
| <b>ALDH3</b>    | ALDH3A1         | citoplazma, nukleus    | Srednjelančani alifatični aldehidi | MĆ, MĆK proliferacija   |
|                 | ALDH3A2         | mikrozomi, peroksizomi | Dugolančani alifatični aldehidi    |   |
|                 | ALDH3B1         | mitohondrije           | LPO                                |   |
| <b>ALDH4</b>    | ALDH3B2         | mitohondrije           | -                                  | MĆK , p53-zavisna aktivacija  |
|                 | ALDH4A1         | mitohondrije           | Metabolizam prolina                |   |
| <b>ALDH5</b>    | ALDH5A1         | mitohondrije           | Sukcinatni semialdehid             | MĆK , hemiovezistencija   |
| <b>ALDH6</b>    | ALDH6A1         | mitohondrije           | Metilmalonat semialdehid           | MĆK   |
| <b>ALDH7</b>    | ALDH7A1         | mitohondrije, citosol  | Betain aldehid, LPO                | MĆK   |
| <b>ALDH8</b>    | ALDH8A1         | citoplazma             | Retinal                            | MĆK   |
| <b>ALDH9</b>    | ALDH9A1         | citoplazma             | Aminoaldehidi                      |   |
| <b>ALDH16</b>   | ALDH16A1        | nepoznata              | -                                  |   |
| <b>ALDH18</b>   | ALDH18A1        | mitohondrije           | Glutamatski $\gamma$ -semialdehid  |   |

MĆ-matične ćelije; MĆK-matične ćelije kancera; LPO-lipidni peroksidi

### 2.2.2. Potencijal za diferencijaciju mezenhimalnih matičnih ćelija *in vitro*

Najvažnija funkcionalna karakteristika MMC *in vitro*, je njihova sposobnost diferencijacije u osteoblaste, hondroците i adipocyte. Naime, kada se *in vitro* ekspanzirana, nediferencirana populacija MMC izloži dejstvu određenih biološki aktivnih jedjenja, u vremenskom periodu od dve do tri nedelje istovremeno dolazi do postepenog gubitka proliferativne aktivnosti i sticanja morfoloških i funkcionalnih karakteristika navedenih ćelijskih tipova.

Nediferencirane, *in vitro* ekspanzirane MMC, se diferenciraju u osteoblaste kada se tri nedelje inkubiraju u medijumu u koji je dodata askorbinska kiselina,  $\beta$ -glicerofosfat i deksametazon (Chamberlain i sar., 2007). Gen koji se smatra glavnim regulatorom osteogeneze je RUNX2 (eng. *Runt-related transcription factor 2*). Stimulacija njegove ekspresije pokreće ekspresiju ostalih gena koji omogućavaju definitivnu osteogenu diferencijaciju (Ducy i sar., 1997). Osteogeneza *in vitro* se odvija u tri faze koje se donekle preklapaju: proliferacija, sinteza i sekrecija matriksa, sazrevanje ili mineralizacija matriksa. Prva faza podrazumeva proliferaciju ćelija i inicijalno formiranje matriksa. Drugu fazu karakteriše ekspresija ranih osteogenih markera kao što su alkalna fosfataza, osteonektin i osteopontin. Finalno se odigrava sazrevanje matriksa u smislu ekspresije osteokalcina i koštanog sijaloproteina koji zajedno sa prethodno izraženom aktivnošću alkalne fosfataze omogućavaju mineralizaciju deponovanog ECM (Dragoo i sar., 2003). BMP2 (eng. *Bone Morphogenetic Protein 2*) je važan osteogeni signalni molekul koji posredstvom acetilovanja RUNX2 potencira njegovu sposobnost transaktivacije čime se stimuliše BMP2 zavisna diferencijacija osteoblasta (Jeon i sar., 2006). Wnt (eng. *Wingless-type MMTV integration site family member*) signalni molekuli imaju važnu modulatornu ulogu u procesu osteogene diferencijacije. Uticaj Wnt-liganada na procese osteogeneze zavisi od njihove koncentracije. Visoke doze endogenih Wnt-liganada promovišu osteogenu diferencijaciju, dok niske doze deluju inhibitory na diferencijaciju (Gaspar i sar., 2004). Na stimulaciju osteogene diferencijacije pozitivno utiču i članovi TGF superfamilije. Naime, TGF- $\beta$  (eng. *Transforming Growth Factor- $\beta$* ) i BMP-ligandi deluju sinergistički u pogledu transaktivacije gena koji potenciraju diferencijaciju MMC u osteoblaste (Kolf i sar., 2007)



Faktori koji *in vitro* stimulišu **adipogenu diferencijaciju** su deksametazon, insulin, izo-butil-metil-ksantin i indometacin. Uspešnu adipogenu diferencijaciju morfološki karakteriše nakupljanje masnih kapljica u ćelijama, dok se na molekularnom nivou javlja ekspresija gena koji kodiraju PPAR $\gamma$ 2 (eng. *Peroxisome Proliferator - Activated Receptor  $\gamma$ 2*), lipoprotein lipazu, i protein koji vezuje masne kiseline - aP2 (Pittenger i sar., 1999). Transkripcioni faktor PPAR $\gamma$  se smatra glavnim regulatorom adipogene diferencijacije. Pokazano je da bipotentni koregulator TAZ (eng. *Transcriptional Coactivator with PDZ Binding Motif*) funkcioniše kao koaktivator gena za RUNX2, odnosno korepresor gena za PPAR $\gamma$ , na taj način favorizuje osteogenezu na račun adipogeneze. Osim toga, identifikovan je i set transkripcionih regulatora - TIP proteina (eng. *Tension-Induced/-Inhibited Proteins*) sa ulogom u miogenoj, odnosno, adipogenoj diferencijaciji. Pokazano je da mehanostimulacija MMĆ aktivira specifične izoforme TIP proteina koji usmeravaju diferencijaciju MMĆ ka miogenezi (Kolf i sar., 2007). Sa aspekta adipogeneze, zanimljiv je TIP1 koji obezbeđuje potencijalni mehanistički osnov za citoplazmatsku indukciju adipogeneze posredstvom male GTP-aze RhoA (eng. *Ras Homolog Gene Family, Member A*). Naime, zaokrugljivanje ćelija je proces koji prethodi adipogenoj diferencijaciji MMĆ. TIP1 utiče na reorganizaciju citoskeleta u odsustvu mehanostimulacije, što dalje vodi do zaokrugljivanja ćelija, i indukcije RhoA signalizacije koja promovise adipogenu diferencijaciju (McBeath i sar., 2004).

Wnt-ligandi regulišu različite razvojne procese, pa su između ostalog uključeni i u regulaciju diferencijacije u smeru osteogeneze, odnosno adipogeneze. Grupa kanonskih Wnt signala (Wnt1, Wnt3a, Wnt5b, Wnt7a, Wnt10b, itd.) kao i druga grupa liganada koja je uključena u proces nekanonske signalizacije (Wnt11, Wnt4a i Wnt5a), učestvuje u formiranju kostiju tokom ontogeneze. Sa sigurnošću je pokazano da Wnt5a utiče na osteogenu diferencijaciju MMĆ, supresijom funkcije PPAR $\gamma$  (Takada i sar., 2012). Wnt10b takođe doprinosi inhibiciji adipogeneze. Preciznije, Wnt signali održavaju preadipocite u nediferenciranom stanju putem inhibicije adipogenih transkripcionih faktora C/EBP $\alpha$  i PPAR $\gamma$ . Zanimljivo je da inhibiranjem Wnt signala dolazi do transdiferencijacije mioblasta u adipocite, što doprinosi zaključku da ovaj put ima važnu ulogu u determinaciji sudbine ćelija poreklom od mezoderma (Ross i sar.,

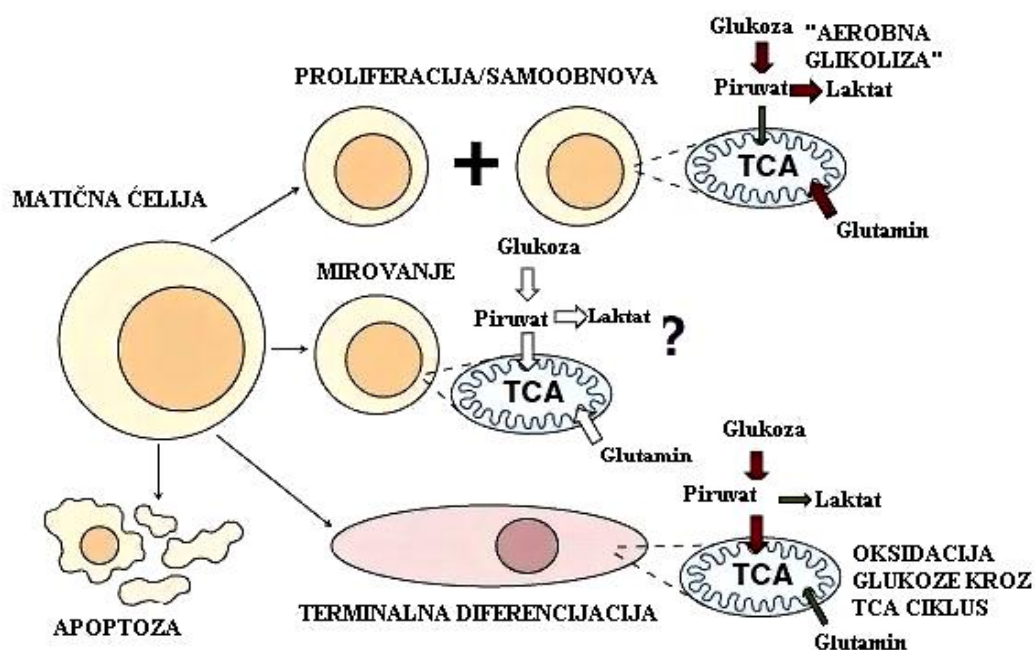
2000). Iz navedenih primera je jasno da brojni faktori mikrosredine, u skladu sa potrebama organizma, utiču na pravac diferencijacije multipotentnih MMC *in vivo*.

Kako bi se MMC uspešno **diferencirale u pravcu hondrocita**, potrebno je u kulturu zasejati ćelije u velikoj koncentraciji i to u prisustvu deksametazona, L-prolina i TGF- $\beta$ 1. Faktori rasta značajni za hondrogenzu su i TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 i TGF- $\beta$ 3, BMP-2, BMP-4 i BMP-7, kao i insulinu sličan faktor rasta-1 (IGF-1). Najznačajniji transkripcioni faktor za odvijanje hondrogeneze je SOX9. Prilikom hondrogene diferencijacije, ukoliko je u pitanju hijalina hrskavica, između ćelija se stvara ECM građen od kolagena tipa 2, sulfatisanih glikozaminoglikana i proteoglikana (Mackay i sar., 1998). FGF, Wnt i SHH (eng. *Sonic Hedgehog*) –su plejotropni medijatori proliferacije i diferencijacije MMC, koji su takođe uključeni u regulaciju hondrogeneze. Na mišjim C3H10T1/2 ćelijama je pokazano da Wnt3a pojačava hondrogenzu indukovanu sa BMP-2 (Fischer i sar., 2002), dok je na ATDC5-mišjoj hondrogenoj ćelijskoj liniji Wnt3a ligand delovao inhibitorno na hondrogenzu bilo putem negativne sekvestracije hondrostimulatora ili direktnom represijom ciljnih gena (Reinhold i sar., 2006).

Brojne studije su potvrdile da se MMC u adekvatnim uslovima *in vitro* uspešno diferenciraju i u tenocite, glatkomišićne ćelije, neurone kao i ćelije visceralnog mezoderma (endotelne ćelije) (rev: Chamberlain i sar., 2007).

**Metabolizam nediferenciranih MMC i diferenciranih ćelija:** Neke od promena koje se dešavaju tokom diferencijacije uključuju i promene vezane za metabolizam ćelija kao i promene na nivou sistema antioksidativne zaštite ćelija. Naime, analizom metaboličkih promena do kojih dolazi tokom diferencijacije MMC došlo se do nekoliko važnih zaključaka.

Metabolizam (sinteza ATP-a) nediferenciranih MMC se zasniva na glikolizi, na šta ukazuje viši nivo ekspresije gena koji su uključeni u glikolizu, kao i veća produkcija laktata (Chen i sar., 2008). U radu Pattappa i saradnika (2011) metabolizam MMC je označen kao „mešani“, u smislu da se za stvaranje ATP-a predominantno koristi glikoliza uz oko 30% energije koja proističe iz oksidativne fosforilacije (**šema 3**).



Šema 3. Metabolički fenotip matičnih ćelija, pretpostavljeni mehanizmi koji leže u osnovi proliferacije, mirovanja i diferencijacije matičnih ćelija (prezeto uz modifikacije iz Vacanti i Metallo, 2013). TCA-ciklus trikarbonskih kiselina; crvene strelice ukazuju na predominantni put biosinteze ATP-a, zelene strelice ukazuju na put koji je značajno manje aktivan tokom biosinteze ATP-a

Pretpostavlja se da matične ćelije stvaraju najviše energije procesom glikolize kako bi izbegle formiranje slobodnih kiseonikovih radikala (eng. *Reactive Oxygen Species* - ROS) i nastanak oštećenja koja prate oksidativni stres. To je još od ranije poznato i pokazano za proliferišuće somatske ćelije (timociti) u kulturi (Brand i Hermfisse, 1997). Nedavno je pokazano da MĆ poreklom iz dečije kostne srži i krvi pupčanika u skladu sa pojačanom ekspresijom gena uključenih u proces glikolize i samim intenziviranjem glikolize pokazuju i normoksičnu stabilizaciju HIF-1 $\alpha$  (Palomaki i sar., 2013). HIF-1 $\alpha$  je jedna od dve subjedinice hipoksija inducibilnog faktor-a 1 (HIF-1) koji je označen kao glavni regulator ćelijskog odgovora na hipoksiju (Semenza i Wang, 1992). HIF-1 transkripcioni faktor je heterodimer koga čine konstitutivno eksprimirana subjedinica HIF-1 $\beta$  i jedna od tri HIF- $\alpha$  izoforme, čija je stabilnost zavisna od unutarćelijske koncentracije kiseonika, ali i od nekih drugih faktora (Yee Koh i sar., 2008). U uslovima kada je koncentracija kiseonika u skladu sa potrebama ćelije dolazi do hidroksilacije HIF-1 $\alpha$  subjedinice od strane specifičnih protil-hidroksilaza (PHD) koje pripadaju familiji  $\alpha$ -ketoglutarat i Fe (II)-zavisnih

dioksidogena (Ivan i Kaelin, 2001). HIF-1 $\alpha$  hidroksilacija stimuliše vezivanje von Hippel Lindau (VHL) proteina koji formira multiproteinski kompleks koji funkcioniše kao ubikvitin-ligaza. Formirani kompleks ubikvitin-ligaza E3 vrši ubikvitinaciju HIF-1 $\alpha$ , nakon čega dolazi do njegove degradacije u proteozomu 26S (Ohh i sar., 2000).

Brojni faktori rasta (bFGF, EGF, IGF) kao i citokini stimulišu aktivnost HIF-1 nezavisno od koncentracije kiseonika (Zhou i Brune, 2006). U određenim okolnostima, povećanje sinteze HIF-1 $\alpha$  je stimulirano aktivacijom signalne transdukcije preko fosfatidil-inozitol 3-kinaze (PI3K), protein-kinaze B (PKB/AKT) i sisarskog targeta za rapamicin mTOR, i u ovom slučaju nezavisno od koncentracije kiseonika (Zhou i Brune, 2006).

Brojne *in vitro* studije su pokazale da je HIF-1 prevashodno uključen u regulaciju ekspresije glikolitičkih gena (Marín-Hernández i sar., 2009). HIF-1 stimuliše kako preuzimanje, tako i metabolizam glukoze kroz proces glikolize, putem stimulacije ekspresije transportera za glukozu i glikolitičkih enzima, na primeru kancerskih ćelijskih linija (Yee Koh i sar., 2008). Smatra se i da je ekspresija LDH-A gena pozitivno regulisana od strane HIF i Myc u ćelijama kancera (Fan i sar., 2011).

Koncentracija laktata, odnosno aktivnost enzima laktat-dehidrogenaze (LDH) se često koristi kao marker intenziteta glikolize *in vitro* i *in vivo*. U hipoksiji, piruvat se redukuje u laktat uz pomoć laktat-dehidrogenaze (LDH<sub>5</sub> izoforme), a NADH je donor H<sup>+</sup> jona. LDH postoji u pet izoenzimskih oblika koji imaju različite kombinacije H (*heart*) i M (*muscle*) subjedinica koje su kodirane različitim genima. M subjedinica je kodirana LDHA genom, a H subjedinica je kodirana LDHB genom. LDH<sub>1</sub> ima 4 H subjedinice i nalazi se u kardiomiocitima, dok LDH<sub>5</sub> ima 4 M subjedinice i nalazi se u mišićima i jetri. LDH<sub>2</sub> (3H i 1M subjedinica) je uglavnom koncentrisana u leukocitima, LDH<sub>3</sub> (2H i 2M subjedinice) je najviša u plućima, dok je aktivnost izoenzimske varijante LDH<sub>4</sub> (1H i 3M subjedinice) najizraženija u bubregu, placenti i pankreasu.

Takođe, izoforme LDH<sub>1</sub> i LDH<sub>2</sub> karakterišu dobro oksigenisana tkiva, dok su LDH<sub>3</sub>, LDH<sub>4</sub> i LDH<sub>5</sub> izoforme prisutne u uslovima slabije oksigenacije. Izoforma LDH<sub>5</sub> katališe prevođenje piruvata u laktat, dok izoforma LDH<sub>1</sub> katališe prevođenje laktata u piruvat. Izoenzimski oblici LDH se razlikuju na osnovu elektroforetske pokretljivosti, koja zavisi od kombinacije subjedinica koje ih čine. Pojačana ekspresija gena LDHA je često karakteristična za intenzivno proliferišuće kancerske ćelije *in vitro* i predstavlja

marker skretanja biosinteze ATP-a iz procesa oksidativne fosforilacije ka glikolizi, iako je prisutna visoka koncentracija kiseonika (21%) (Fan i sar., 2011). U homogenatima tkiva poreklom iz zubne pulpe mlečnih i stalnih zuba dominiraju izoforme LDH 3 i 4. Kombinovani metabolizam se u zubnoj pulpi objašnjava primitivnošću i niskom specijalizacijom ovog mezenhimalnog vezivnog tkiva (Linde i Ljunggren, 1970).

Rezultati dobijeni merenjem aktivnosti enzima uključenih u proces antioksidativne zaštite pre i posle diferencijacije MMĆ, ukazuju na značajno nižu aktivnost nekih enzima antioksidativne zaštite kod nediferenciranih ćelija (Chen i sar., 2008). Tokom osteogene diferencijacije dolazi do dramatičnog sniženja ROS u ćelijama uprkos intenziviranoj oksidativnoj fosforilaciji i povećanom obimu biogeneze mitohondrija. Pretpostavlja se da do sniženja ROS dolazi zahvaljujući pozitivnoj regulaciji nekih od enzima uključenih u proces antioksidativne zaštite (Chen i sar., 2008). Slično kao tokom osteogeneze, i tokom adipogene diferencijacije dolazi do pojačane biogeneze mitohondrija i intenziviranja oksidativne fosforilacije. Jedan od uzroka pojačanog stvaranja ROS je aktivacija NADPH-oksidade, izoforme 4 (NOX4) (Hofmann i sar., 2012). Velika gustina ćelija u kulturi, koja je neophodna da se postigne hondrogena diferencijacija, značajno utiče na dostupnost kiseonika pojedinačnim ćelijama, te je oksidativna fosforilacija suprimirana tokom hondrogeneze *in vitro* (Pattappa i sar., 2011). Kako hrskavica nema krvne sudove, hondrociti, *in vivo*, dobijaju ATP putem razlaganja glukoze (Shikhman i sar., 2004).

### **2.3. Starenje mezenhimalnih matičnih ćelija u kulturi**

MMĆ, poput somatskih ćelija, imaju ograničen životni vek. Nakon određenog broja deoba MMĆ podležu starenju koje odlikuju različite morfološke i funkcionalne specifičnosti. Glavna karakteristika ćelijskog starenja u kulturi je usporavanje ćelijskih deoba i na kraju njihov prekid. Ovaj fenomen je poznat još od 1960. godine i nazvan je Hajflikov limit, po *Leonardu Hayflick-u*, nemačkom istraživaču koji je zaslužan za njegovo definisanje (Hayflick, 1965). Preciznija definicija ćelijskog starenja podrazumeva ireverzibilno zaustavljanje ćelija u G1 fazi ćelijskog ciklusa, uz represiju gena uključenih u progresiju ćelijskog ciklusa i aktivaciju inhibitora ćelijskog ciklusa kao što su p53/p21 i Rb/p16 (Sethe i sar., 2006). MMĆ, tokom dugotrajne kultivacije *in vitro*, pokazuju ograničen replikativni i smanjen potencijal za diferencijaciju, kriva rasta

dobija oblik hiperbole, a same ćelije akumuliraju lizosomalni enzim SA- $\beta$ -gal (eng. *Senescence Associated  $\beta$ -galactosidase*) (Heo i sar., 2009). Takođe je evidentna i promenjena struktura hromatina u vidu pojave heterohromatinskih fokusa SAHF (eng. *Senescence-Associated Heterochromatic Foci*) (Kuilman i sar., 2010). Ostarele MMC karakteriše i zaokrugljena i zaravnjena/pločasta morfologija, hipertrofija i granulirana citoplazma kao posledica akumulacije ćelijskog debrisa. Nakon dugotrajne *in vitro* propagacije evidentno je smanjena adherencija za plastiku, kao i pojava aktinskih stres vlakana u višku i povećan nivo autofluorescencije usled akumulacije lipofuscina (Ksiazek, 2009).

Marker SA- $\beta$ -gal se odnosi na aktivnost enzima  $\beta$ -galaktozidaza koja se detektuje na pH 6.0 u ćelijama u kulturi koje podležu procesima starenja (Dimri i sar., 1995; Lee i sar., 2006). Aktivnost ovog enzima se detektuje i u organima i tkivima ostarelih jedinki, sugerišući da se stare ćelije sa godinama akumuliraju u tkivima tokom starenja *in vivo* (Dimri i sar., 1995; Melk i sar., 2003).

Postoje najmanje dve hipoteze koje objašnjavaju promene koje se dešavaju tokom starenja ćelija u kulturi i koje ne isključuju jedna drugu (Wagner i sar., 2008):

1. Starenje se odvija prema specifičnom, unapred definisanom programu, tokom koga dolazi do smanjenja ekspresije gena koji su uključeni u kontrolu ćelijskog ciklusa, DNK replikaciju i mitozu. Faktori koji u tome učestvuju još uvek nisu jasno definisani, ali je verovatno da promene na epigenetskom nivou mogu imati značajnu ulogu (Noer i Boquest, 2007). Ukoliko se ima na umu da matične ćelije imaju daleko veći proliferativni potencijal od zrelih ćelija pojedinih tkiva, ideja programiranog starenja bi mogla da se primeni na ovu populaciju ćelija.

2. Starenje se dešava pod dejstvom faktora mikrosredine što dovodi do akumulacije oštećenja svih ćelijskih struktura uključujući i DNK (Tower, 2012). Promene vezane za ovaj vid starenja se mogu primeniti i na ćelije u kulturi i na uslove *in vivo* prilikom različitih patoloških stanja.

Najverovatnije je, da su oba mehanizma uključena u ćelijsko starenje, s obzirom na to da je sasvim jasno da se radi o kompleksnom procesu sa gotovo potpuno nepoznatim redosledom molekularnih događaja (Wagner i sar., 2008).

Skraćivanje telomera je jedan od najbolje okarakterisanih mehanizama uključenih u proces starenja (Harley i sar., 1990). Telomere predstavljaju

specijalizovane strukture koje sadrže ponovljene DNK sekvence koje se nalaze na krajevima eukariotskih hromozoma. Telomere sprečavaju potencijalne nekompletne replikacije, i samim tim održavaju stabilnost krajeva linearne DNK (Harley i sar., 1990). Utvrđena je korelacija između replikativnog kapaciteta i inicijalne dužine telomera humanih fibroblasta (Allsopp i sar., 1992). Za proces održavanja dužine telomera odgovoran je enzim telomeraza. Humane MMC nemaju dovoljnu aktivnost telomeraze kako bi mogle da prevaziđu progresivno skraćivanje telomera, što rezultuje blokom u proliferaciji i starenjem tokom *in vitro* kultivacije. Važnost telomeraze u inhibiciji starenja potvrđuje činjenica da prekomerna ekspresija telomeraze sprečava replikativno starenje i produžava život humanih MMC u kulturi (Simonsen i sar., 2002).

#### **2.4. Imunomodulatorna uloga mezenhimalnih matičnih ćelija**

Smatra se da se imunomodulatorna svojstva MMC zasnivaju na direktnom međućelijskom kontaktu i na sintezi i sekreciji solubilnih medijatora. MMC ekspimiraju MHC molekule I klase, ali ne ekspimiraju kostimulatorne molekule niti MHC molekule II klase. Upravo iz tog razloga alogena transplantacija MMC ne zahteva imunosupresivnu terapiju. Naime, po transplantaciji, odgovarajuće T ćelije primaoca, po kontaktu sa MMC, usled nedostatka kostimulatornih signala, ostaju anergične (Javazon i sar., 2004). MMC deluju i imunosupresivno lučeći citokine koji inhibiraju proliferaciju T i B limfocita (Jiang i sar., 2005; Corcione i sar., 2006; Kode i sar., 2009). Osim studija *in vitro*, ograničene *in vivo* studije ukazuju da MMC po transplantaciji takođe luče citokine koji deluju u pravcu rezolucije inflamacije i reparacije ili regeneracije tkiva (Yagi i sar., 2010). MMC utiču na imunski sistem i tako što usporavaju sazrevanje i inhibišu funkciju dendritičnih ćelija (Jiang i sar., 2005). Od antinflatornih i imunosupresivnih solubilnih medijatora pokazano je da MMC luče TGF- $\beta$ , PGE2, IL10, kao i da aktiviraju na makrofagima enzim indoleamin-dioksigenu (IDO) koji je prvi enzim koji reguliše katabolizam triptofana. Aktivacija IDO smanjuje količinu triptofana čime se ograničava proliferacija limfocita (Yagi i sar., 2010). MMC takođe stimulišu sintezu inducibilne NO sintaze kao i hem oksigenaze-1 (Abdi i sar., 2008)

Navedeni mehanizmi verovatno nisu uzajamno isključivi i relativan doprinos svakog od njih tokom modulacije imunskog odgovora *in vivo* različit je u različitim eksperimentalnim modelima. Treba imati na umu da nedostatak standardizacije u

pogledu izolacije i gajenja MMC može dovesti do različitih, često kontradiktornih, podataka koji sa sobom kao posledicu nose i neadekvatne interpretacije rezultata (Ryan i sar., 2005)

Ipak, navedene specifične karakteristike MMC predstavljaju osnov za njihovu primenu u terapiji bolesti kao što su autoimunska oboljenja ili reakcija kalema protiv domaćina (eng. *graft versus host disease* - GVHD). Razumevanje mehanizama uključenih u procese imunosupresije predstavlja ključan element za bezopasnu i uspešnu primenu nediferenciranih MMC u terapiji pojedinih oboljenja.

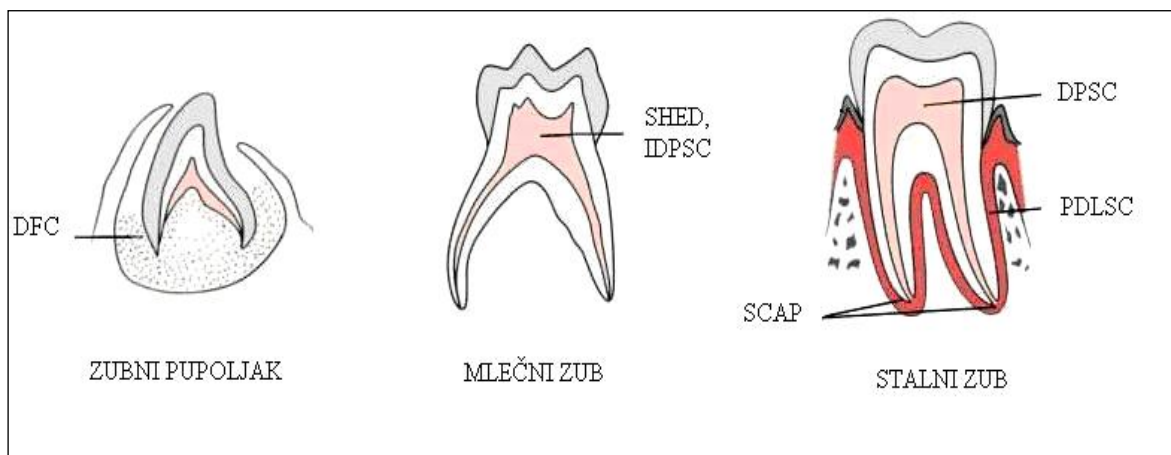
## **2.5. Matične ćelije poreklom iz zubne pulpe**

Matične ćelije poreklom iz zubne pulpe se razlikuju od drugih mezenhimalnih matičnih ćelija jer vode poreklo od ektomezenhima, odnosno nastaju od populacije ćelija nervnog grebena koja tokom embriogeneze prolazi kroz fazu ektomezenhimalne transformacije. Ektomezenhimalne ćelije učestvuju u građi mnogih delova kraniofacijalne regije, što se odražava na specifičnosti patogeneze različitih patoloških stanja te regije, kao i mogućnosti njihove terapije (Akintoye i sar., 2006). Do sada su matične ćelije u vezi sa razvojem zuba, a poreklom od ektomezenhima izolovane iz:

1. zubne pulpe stalnih zuba (Gronthos i sar., 2000); uobičajen naziv u literaturi je DPSC (eng. *Dental Pulp Stem Cells*),
2. zubne pulpe mlečnih zuba posle enzimske digestije pulpe (Miura i sar., 2003); uobičajen naziv u literaturi je SHED (eng. *Stem Cells From Human Exfoliated Deciduous Teeth*)
3. zubne pulpe mlečnih zuba metodom tkivnog eksplanta (Kerkis i sar., 2006); uobičajen naziv u literaturi je IDPSC (eng. *Immature Dental Pulp Stem Cells*),
4. periodontalnog ligamenta (Seo i sar., 2004); uobičajen naziv u literaturi je PDLSCs (eng. *Periodontal Ligament Stem Cells*),
5. zubnog folikula (Morsczeck i sar., 2005); uobičajen naziv u literaturi je DFC (eng. *Dental Follicle Cells*),



6. apikalne papile zuba (Sonoyama i sar., 2008); uobičajen naziv u literaturi je SCAP (eng. *Stem Cells from Apical Papilla*).



Slika 1. Populacije matičnih ćelija zuba u zavisnosti od stadijuma razvića zuba (preuzeto uz modifikacije iz Karamzadeh i Eslaminejad, 2013) DFC-dentalne folikularne ćelije; SHED, IDPSC-matične ćelije poreklom iz zubne pulpe mlečnih zuba; DPSC- matične ćelije poreklom iz zubne pulpe stalnih zuba; PDLSC- matične ćelije poreklom iz periodontalnog ligamenta; SCAP- matične ćelije poreklom iz apikalne papile.

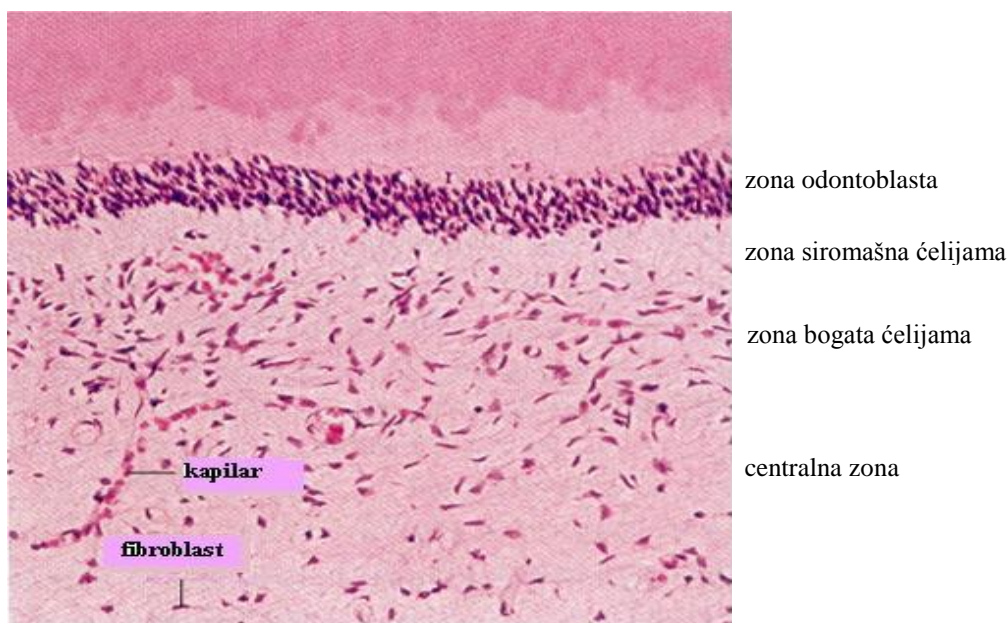
Za razliku od prethodno navednih populacija, matične ćelije zubnog epitela potiču od ektoderma. Kod glodara, ove ćelije su aktivne tokom čitavog života i obezbeđuju kontinuiran rast sekutića (Harada i sar., 1999). Terapijski potencijal svih navedenih matičnih ćelija zuba leži, pre svega, u njihovoj sposobnosti da formiraju dentin, tkiva periodoncijuma i alveolarnu kost (Morsceck i sar., 2008).

### 2.5.1. Formiranje zubne pulpe tokom embriogeneze kod ljudi

Tokom četvrte nedelje embriogeneze, ektodermalne ćelije poreklom od nervnog grebena migriraju ka primitivnoj usnoj duplji. Tokom šeste nedelje embriogeneze, nakon migracije ćelija poreklom od nervnog grebena u mezenhim glave i vrata, ektoderm koji se nalazi preko stomodeuma počinje da proliferiše formirajući primarne epitelne trake (*lamina dentalis*). Od njih će nastati gleđni organi mlečnih, a značajno kasnije (od 20-e nedelje gestacije do 10-og meseca života) i stalnih zuba. Kao rezultat kontakta ćelija *lamina-e dentalis* i ektomezenhima (mezenhim koji vodi poreklo od

ćelija nervnog grebena), dolazi do proliferacije i kondenzacije ćelija ektomezenhima. Ove ćelije potom formiraju zubnu papilu od koje tokom daljeg razvoja nastaje zubna pulpa i zubna kesica. Zubna kesica se kasnije transformiše u folikul zuba. Tokom nekoliko faza razvoja zuba, koje se definišu kao **faza pupoljka, faza kape, faza zvona i faza razvoja krunice i korena zuba**, formira se histološki prepoznatljiva struktura mlečnih i stalnih zuba.

Zubnu pulpu čini rastresito vezivno tkivo krunice i korena zuba, smešteno u zubnoj duplji oivičenoj dentinom. Posmatrajući od sloja dentina ka središtu duplje, pulpu krunice zuba čine četiri zone: 1. zona odontoblasta; 2. zona siromašna ćelijama (Vejlova bezćelijska zona) koja je građena od kapilara, nervnih vlakana i ECM; 3. zona bogata ćelijama (Heklova multiceularna zona) i 4. centralna zona kroz koju se prostire centralni neurovaskularni snop (slika 2).



Slika 2. Histološka građa pulpe krunice zuba. (Preuzeto iz Lačković i sar., 2012)

Zonu bogatu ćelijama čine fibroblasti, odontoblasti, makrofagi, granulociti, limfociti, plazmociti, dendritične ćelije, antigen-prezentujuće ćelije, mastociti kao i nediferencirane mezenhimalne ćelije. Ta zona je takođe bogato vaskularizovana. U ekstraćelijskom matriksu dominiraju kolagen tipa I i III, proteoglikani i glikozaminoglikani. Iako je postojanje matičnih ćelija u zubnoj pulpi pokazano pre 13 godina (Gronthos i sar., 2000), njihova lokalizacija je još uvek predmet polemika.

Pojedini autori navode da su matične ćelije smeštene uz krvne sudove i da imaju karakteristike pericita, jer eksprimiraju Stro-1 i CD146 (Shi i Gronthos, 2003; Miura i sar., 2003). Značajno je naglasiti da se smatra da su i periciti u zubnoj pulpi ektomezenhimalnog porekla (Shi i Gronthos, 2003). Drugi autori smatraju da se matične ćelije nalaze u zoni bogatoj ćelijama, kao i zoni koja sadrži odontoblaste (Jo i sar., 2007). Moguće je pretpostaviti da su matične ćelije zubne pulpe smeštene u različitim zonama i da pulpa sadrži različite subpopulacije matičnih ćelija, jer je pokazano da postoje fenotipske razlike između pojedinih CFU-F izolovanih iz jedne pulpe (Gronthos i sar., 2000, Lizier i sar., 2012). Relativno skoro je nedvosmisleno pokazano, posebnim načinom izolacije i kultivacije, prisustvo malog broja epitelnih matičnih ćelija u zubnoj pulpi (Nam i Lee, 2009).

### **2.5.2. Karakteristike DPSC, SHED i IDPSC in vitro**

Matične ćelije poreklom iz zubne pulpe su po prvi put izolovane iz pulpe stalnih zuba (DPSC) i to posle ekstrakcije umnjaka mlađim osobama iz ortodontskih razloga (Gronthos i sar., 2000). DPSC imaju karakteristike slične MMC izolovanim iz koštane srži, mada je koncentracija CFU-F posle izolacije ćelija zubne pulpe veća nego posle izolacije ćelija iz koštane srži, proliferativni potencijal veći, a vreme udvajanja ćelijske populacije u kulturi kraće (Gronthos i sar., 2000). Takođe je pokazano da DPSC, *in vitro*, imaju kapacitet za osteogenu/odontogenu diferencijaciju (Gronthos i sar., 2000).

Metodom enzimske digestije iz zubne pulpe mlečnih zuba izolovane su SHED (Miura i sar., 2003), a metodom tkivnog eksplanta izolovane su IDPSC (Kerkis i sar., 2006). Iako su početna ispitivanja ukazivala da se radi o različitim ćelijskim populacijama, danas je jasno da su njihove *in vitro* karakteristike veoma slične i da se najverovatnije radi o istoj populaciji ćelija čije se karakteristike donekle razlikuju zbog različitih uslova kultivacije (Kerkis i Caplan, 2012). Sve populacije matičnih ćelija izolovane iz mlečnih zuba imaju veći proliferativni potencijal i veću plastičnost u odnosu na DPSC, a odlikuje ih ekspresija markera embrionalnih matičnih ćelija: Oct-4, Nanog, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 i TRA-1-81 (Kerkis i sar., 2006, Huang i sar., 2008). SHED su se uspešno diferencirale u odontoblaste, osteoblaste, adipocite, nervne ćelije (Miura i sar., 2003, Nourbakhsh i sar., 2011) i hondrocite (Koyama i sar., 2009). Uz dodatak VEGF (eng. *vascular endothelial growth factor*), SHED su se diferencirale

u ćelije koje eksprimiraju VEGFR2 (eng. *vascular endothelial growth factor receptor 2*) i CD31, odnosno ćelije koje morfološki i fenotipski odgovaraju endotelnim ćelijama (Bento i sar., 2013). Nakon kultivacije u specifično definisanom medijumu SHED su se uspešno diferencirale u ćelije koje imaju karakteristike hepatocita (Ishkitiev i sar., 2012). IDPSC su se diferencirale u odontoblaste, osteoblaste, adipocite, nervne ćelije i ćelije glatkih i skeletnih mišića (Kerkis i sar., 2006). Posle navedenih obimnih istraživanja, zaključeno je da se ćelije koje pripadaju SHED i IDPSC populaciji mogu obuhvatiti terminom DTSC (eng. *dental tissue derived stem cells*) (Kerkis i Caplan, 2012).

Fenotipske karakteristike DPSC, SHED i IDPSC u odnosu na matične ćelije poreklom iz koštane srži su date u tabeli 3.

Tabela 3. Fenotipske karakteristike MMĆ poreklom iz pulpe zuba i koštane srži.

| <i>Antigen</i>    | <i>DPSC</i> | <i>IDPSC</i> | <i>SHED</i> | <i>BMSC</i> |
|-------------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| CD14              | -           | -            | -           | -           |
| CD29              | ++          | ++           | na/++       | ++          |
| CD34              | -           | -            | -           | -           |
| CD44              | ++          | ++           | ++          | ++          |
| CD45              | -           | -            | -           | -           |
| CD73              | ++          | ++           | ++          | ++          |
| CD105             | ++          | ++           | ++/+        | ++          |
| CD106             | +           | -            | +/-         | ++          |
| CD146             | ++/+        | +            | ++/+        | ++/+        |
| 3G5               | +/-         | /            | +/-         | +/-         |
| Stro-1            | ++/+        | +            | ++/+        | ++/+        |
| A-SMA             | ++/-        | /            | ++/-        | ++/+        |
| Kolagen tip 1     | ++          | ++           | ++          | ++          |
| Kolagen tip 3     | +++         | /            | ++/+        | +++         |
| Alkalna fosfataza | ++/+        | ++           | ++/+        | ++/+        |
| Osteonektin       | +++         | +            | +++         | +++         |
| Osteopontin       | +/-         | /            | +/-         | +/-         |

### 2.5.3. Potencijal za diferencijaciju DPSC, SHED i IDPSC posle transplantacije

Najveći broj *in vivo* ispitivanja matičnih ćelija zubne pulpe usmeren je na mogućnosti primene njihovog potencijala za diferencijaciju u cilju formiranja same pulpe, odnosno dentina, u formiranju koštanog i nervnog tkiva.

Subkutana transplantacija pet miliona nediferenciranih humanih DPSC pomešanih sa hidroksiapatit/trikalcijum-fosfatom (HA/TCP) imunokompromitovanim miševima (*beige mice*), posle šest nedelja, dovela je do formiranja vaskularizovane strukture slične pulpi zuba, sa zonom odontoblasta koji imaju citoplazmatske procesuse projektovane u dobro organizovane tubule dentina (Gronthos i sar., 2000). Kontrolne životinje kojima su u istim uslovima transplantirane MMĆ izolovane iz koštane srži su na mestu aplikacije formirale koštano tkivo (Gronthos i sar., 2000). Posle ovog početnog rada Gronthosa i saradnika (2000), ova grupa autora, kao i nekoliko drugih grupa objavila je više radova koji se odnose na potencijal za diferencijaciju nakon transplantacije ćelija poreklom iz zubne pulpe. Tako je odgovarajućem soju miševa, pod kapsulu bubrega, transplantirana pulpa GFP (eng. *green fluorescent protein*) miševa koja je sadržala sve delove pulpe osim samih odontoblasta. Nakon 14 dana ćelije pulpe su se diferencirale u odontoblaste koji sekretuju reparativni dentin i osteocite koji formiraju atubularni mineralizovani matriks nalik onom u kostima (Braut i sar., 2003).

Slično DPSC, nakon subkutane transplantacije imunokompromitovanim miševima, SHED su pokazale sposobnost diferencijacije u odontoblaste, ali nisu stvarale kompleks dentin - pulpa poput DPSC. Pokazale su i sposobnost osteoindukcije, ali ne i diferencijacije u osteoblaste (Miura i sar., 2003). Dalji eksperimenti, koji su uključivali implantaciju kombinacije biodegradabilnih nosača u kombinaciji sa SHED, potkožno, imunokompromitovanim miševima, pokazali su da dolazi do formiranja kompleksnog tkiva koje se karakterisalo postojanjem mineralizovanog matriksa i tubula oivičenih odontoblastima, kao i nastankom vezivnog tkiva sa krvnim sudovima. Nakon ultrastrukturnih analiza i tipizacije markera došlo se do zaključka da su se SHED diferencirale u odontoblaste i endotelne ćelije (Cordeiro i sar., 2008; Sakai i sar., 2010).

Drugi važan pravac istraživanja je potencijal matičnih ćelija zubne pulpe da se *in vivo*, uz odgovarajuće nosače diferenciraju u osteoblaste. Naime, neki radovi ukazuju da je za rekonstrukciju kostiju lica i glave bolje koristiti nosače sa ćelijama koje su istog

embrionalnog porekla kao i tkivo koje se rekonstruiše (Akintoye i sar., 2006). Tako, SHED predstavljaju odličan izvor ćelija za korekciju velikih kraniofacijalnih defekata kod miša (Seo i sar., 2008), pacova (de Mendonça Costa i sar., 2008) i svinje (Zheng i sar., 2009). Naime, 6 meseci nakon transplantacije SHED u defekte kalvarije imunokompromitovanih miševa, došlo je do potpune reparacije kosti. SHED su osim osteoinduktivnog delovanja, kako je pokazano od strane Miure i saradnika (2003), aktivno doprinose formiranju kosti (Seo i sar., 2008).

Jedan od pravaca istraživanja je mogućnost *in vivo* diferencijacije IDPSC u neurone i glija ćelije. Transplantacija nediferenciranih IDPSC, u kičmenu moždinu miša, na mesto ozlede, nakon sedam i 28 dana dovodi do poboljšanja lokomotornih sposobnosti životinja. Histološkim analizama je utvrđeno da je kod transplantiranih životinja nivo ekspresije trofičkih faktora u tkivu bio veći, dok je defekt bele mase bio manji uz prisustvo brojnih mijelinizovanih aksona i pojavu zdravih intaktnih neurona sa novoformiranim sinapsama (de Almeida i sar., 2011).

Tri meseca nakon intraperitonealne aplikacije ekspanziranih IDPSC imunokompromitovanim miševima, poliklonskim antitelima (na IDPSC) je njihovo prisustvo pokazano u jetri, slezini, mozgu, bubrezima i drugim tkivima (Kerkis i sar., 2006). Ova konstatacija navodi na zaključak da su se IDPSC po transplantaciji uspešno ugradile u odgovarajuće niše, u kojima su možda proliferisale i diferencirale se, stvarajući ćelije sposobne za održavanje homeostaze navedenih organa.

#### **2.5.4. Regulacija proliferacije i diferencijacije matičnih ćelija poreklom iz zubne pulpe**

Nekoliko faktora rasta je važno za potpuno ispoljavanje potencijala za proliferaciju i diferencijaciju DTSC.

**Samoobnova:** Jedan od najvažnijih faktora je bFGF (eng. *Basic Fibroblast Growth Factor*) koji stimuliše proliferaciju i samoobnovu DTSC (Morito i sar., 2009). U kulturama DPSC, bFGF je stimulisao formiranje CFU-F, kao i ekspresiju embrionalnih markera: Oct4, Rex-1 i Nanog. Tokom kultivacije u medijumu za osteogenu diferencijaciju, stimulacija bFGF-om je dovela do snižavanja aktivnosti alkalne fosfataze, odnosno inhibicije mineralizacije (Osathanon i sar., 2011). Pokazano je da bFGF inhibira osteogenu diferencijaciju DTSC aktivirajući ERK1/2 put, odnosno

inhibirajući /utišavajući kanonski Wnt/ $\beta$ -catenin put (Li i sar., 2012). Kanonski Wnt1 protein inhibira odontogenu diferencijaciju DPSC, omogućavajući očuvanje matičnih ćelija u nediferenciranom stanju (Scheller i sar., 2008). Ovakvi rezultati delom koreliraju sa zaključkom da signalizacija putem kanonskih Wnt proteina promovira proliferaciju i samoobnovu MMĆ, nasuprot nekanonskoj Wnt signalizaciji koja stimuliše osteogenu diferencijaciju (Boland i sar., 2004). Takođe, niske doze kanonskih Wnt proteina stimulišu proliferaciju MMĆ, dok su efekti visokih doza potpuno suprotni (de Boer i sar., 2004). Za samoobnovu DTSC je važna i Notch signalizacija (Zhang i sar., 2008). Naime, pokazano je da Notch-ligand, Jagged-1, negativno reguliše diferencijaciju DPSC u odontoblaste *in vitro* (Zhang i sar., 2008). Delta-1 je Notch-ligand koji stimuliše proliferaciju DPSC (povećava procenat BrdU-pozitivnih ćelija, kao i procenat ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa) (He i sar., 2009). Inhibicija ekspresije Delta-1 liganda, dovela je do značajnog smanjenja proliferacije tokom ekspanzije DPSC, odnosno stimulacije odontogeneze tokom gajenja u medijumu za odontogenu diferencijaciju (Wang i sar., 2011).

Novija istraživanja ukazuju da su niske koncentracije O<sub>2</sub> u kulturi jedan od ključnih faktora koji utiče na održavanje nediferenciranog stanja i plastičnost MMĆ (Sakdee i sar., 2009, Iida i sar., 2010, Basciano i sar., 2011).

Sa druge strane, brojni članovi familije TGF- $\beta$ , sinergistički sa drugim autokrinim i parakrinim faktorima rasta stimulišu diferencijaciju DTSC ka odontoblastima i to putem aktivacije ALK/Smad2/3 (Tai i sar., 2008, He i sar., 2008). U tom smislu, tokom diferencijacije DTSC, TGF- $\beta$ 1 povećava aktivnost alkalne fosfataze, ekspresiju sialoproteina dentina (DSP), osteopontina (OPN) i kolagena tip I, utičući na adekvatnu mineralizaciju ECM (Li i sar., 2011). Osim toga, nakon oštećenja dentina i zubne pulpe, odontoblasti, pod dejstvom TGF- $\beta$ 1 i 3 pojačano stvaraju pojedine komponente ECM. Takođe, TGF- $\beta$ 1 i 3 deluju mitogeno na ćelije pulpe, dok TGF- $\beta$ 3 deluje induktivno na diferencijaciju ćelija pulpe u pravcu odontoblasta (Sloan i sar., 1999).

Pokazano je i da humane DTSC *in vitro* sintetišu nekoliko neurotrofičkih faktora kao što su NGF, BDNF, GDNF, NT-3 i NT-4/5 čime bi se delimično mogao objasniti njihov potencijal za diferencijaciju u ćelije nervnog tkiva (Almeida i sar., 2011).

### 2.5.5. Pretkliničke i kliničke studije

Preduslov za bioinženjering zuba je identifikacija odgovarajuće ćelijske populacije, kreiranje biodegradabilnih nosača i identifikacija specifičnih signala koji doprinose indukciji ćelija koja vodi regeneraciji izgubljenih tkiva (Telles i sar., 2011). Zub kreiran bioinženjeringom bi trebalo da ima sve karakteristike pravog zuba i koren koji bi putem periodontalnog ligamenta bio vezan za alveolarnu kost što bi sprečilo preranu resorpciju alveolarne kosti i obezbedilo adekvatno uzglobljavanje zuba. Za sada se ispitivanja koja imaju za cilj regeneraciju dela zuba ili celog zuba sprovode na modelu miša (Yamamoto i sar., 2003; Oshima i sar., 2011) i na modelu pacova (Duailibi i sar., 2004). Na modelu miša je pokazano da kada se epitelne i mezenhimalne ćelije izolovane iz zametka zuba u fazi zvona (embrion miša star 14,5 dana) ekspandiraju *in vitro* i potom sjedine u odgovarajućim kalupima, tokom narednih 60 dana, transplantirane pod kapsulu bubrega, mogu da formiraju kompletan zub (Oshima i sar., 2011). Takođe, tako formiran zub je uspešno transplantiran u alveolarnu kost miša (Oshima i sar., 2011). Korak dalje je napravljen u studiji u kojoj je pokazano da se kompletan zub može formirati i kada se zajedno kultivišu ekspandirane epitelne ćelije gingive ljudi i mezenhimalne ćelije zametka zuba miša (Angelova Volponi i sar., 2013). Na taj način je bioinženjering zuba približen mogućnostima rutinske kliničke primene, jer najmanje jedna populacija ćelija koja je korišćena za formiranje „biozuba“ nije bila embrionalnog porekla.

**Klinička studija:** U februaru 2013. godine u Kini je prijavljena klinička studija pod nazivom „Revitalizacija nezrelih stalnih zuba sa nekrotičnom pulpom uz pomoć SHED peleta“. Planirano je da u studiju budu uključena deca od 7 do 12 godina koja još uvek imaju mlečne zube čija pulpa bi se mogla iskoristiti kao izvor SHED, a istovremeno imaju stalne zube koji nemaju u potpunosti formiran koren zuba, a imaju nekrozu pulpe zuba. Posle primene SHED peleta, uz pomoć kompjuterizovane tomografije bi se pratila eventualna revaskularizacija pulpe i brzina rasta korena zuba ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Pretpostavka je da će se u bliskoj budućnosti pojaviti veći broj kliničkih studija koje će imati za cilj stvaranje „biozuba“ kod ljudi.



## 2.6. Oksidativni stres i antioksidativna zaštita

### 2.6.1. Oksidativni stres

Terapijski potencijal MMĆ izolovanih iz postnatalnih tkiva (bez obzira na tkivo iz kog su izolovane) je ograničen njihovim malim brojem i činjenicom da tokom *ex vivo* ekspanzije dolazi do promena koje mogu negativno uticati na njihov potencijal za diferencijaciju, a posle primene *in vivo*, regeneraciju tkiva. U te promene se ubraja gubitak multipotentnih (primitivnih) klonova ćelija i starenje ćelija. Poznato je da DTSC imaju značajno veći proliferativni potencijal i kraće vreme udvajanja u kulturi u odnosu na MMĆ poreklom iz koštane srži (Huang i sar., 2009), ali, kao i ostale MMĆ imaju ograničen replikativni potencijal tokom dugotrajne kultivacije *in vitro*.

Kultivacija ćelija se najčešće izvodi u atmosferi koja sadrži fiziološku koncentraciju CO<sub>2</sub> (5%) i izuzetno visoku koncentraciju kiseonika koja ne postoji u tkivima, već odgovara atmosferskim uslovima (20%). Pretpostavlja se da fiziološki relevantna mikrosredina MMĆ ima procenat kiseonika između 2% i 7%. To znači da 20% O<sub>2</sub> čini mikrosredinu prezasićenu kiseonikom. Kiseonik kao dvoatomski molekul nije previše reaktivan, ali je supstrat za stvaranje slobodnih kiseonikovih radikala (ROS) koji mogu biti izvor oštećenja različitih ćelijskih struktura. U ROS spadaju reaktivni molekuli (vodonik- peroksid) i slobodni radikali sa jednim ili više nesparenih elektrona u poslednjoj orbitali (npr. superoksid-anjon-radikal, hidroksil-radikal, peroksil-radikal). Tri glavna mesta stvaranja ROS unutar ćelija su transportni lanac elektrona na nivou mitohondrija, multienzimski sistem NADPH-oksidade vezan za membrane ćelija, kao i endoplazmatski retikulum. Veća koncentracija O<sub>2</sub> u medijumu u kome se gaje ćelije, odražava se i na koncentraciju O<sub>2</sub> u mitohondrijama u kojima se višak kiseonika redukuje u superoksid- anjon-radikal (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). U zavisnosti od tipa slobodnih kiseonikovih radikala koji se stvaraju, u ćeliji nastaju različite promene koje uključuju oštećenja na nivou DNK u vidu dvostrukih DNK prekida, i/ili oštećenja na proteinskim, lipidnim i ugljeno-hidratnim komponentama u ćelijama (Ksiazek, 2009).

Oksidativno oštećenje proteinskih molekula koje izazivaju slobodni radikali podrazumeva seriju promena među kojima važno mesto ima razvoj „karbonilnog stresa". Oksidativnim razlaganjem proteina obrazuju se peptidi čije su N-terminalne amino-kiseline blokirane α-ketoacilnim proizvodima. U sastavu proteina se, između

ostalnih aminokiselina, nalaze lizin, arginin, prolin i treonin, čijom oksidacijom mogu nastati karbonilni derivati (Baynes, 1991; Levine i sar., 1994). Pored toga *karbonilne grupe* mogu da nastanu reakcijom sa aldehidima (malondialdehid), koji nastaju tokom lipidne peroksidacije ili sa reaktivnim karbonilnim derivatima kao što su ketoamini i ketoaldehidi (jedinjenja se stvaraju u reakciji redukujućih šećera kao što je glukoza) ili njihovih oksidacionih proizvoda sa lizinskim ostacima u proteinima. Između redukujućih šećera i proteina dolazi do reakcija glikozilovanja i oksidacije (Baynes, 1991). Iz tog razloga se prisustvo karbonilnih grupa u proteinima koristi kao marker proteinskog oštećenja uzrokovanog ROS. Ovi proizvodi imaju kao posledicu promenu konformacije proteina, što se neminovno odražava i na njihove funkcije. Utvrđeno je da je oksidacija proteina, koju između ostalog, procenjujemo na osnovu prisustva karbonilnih grupa, povezana sa starenjem i brojnim bolestima među kojima se često spominje i kancer (Imbesi i sar., 2013).

Lipidi su estri masnih kiselina i alkohola - glicerola i sfingozina, kao i estri masnih kiselina i holesterola. Masne kiseline (MK) su karboksilne kiseline koje imaju dug, ugljovodonični lanac. Lipidi predstavljaju izvor energije, strukturni su, ali i funkcionalni elementi ćelijskih membrana i imaju važnu ulogu u procesima ćelijske signalizacije. Fosfolipidi su glavna komponenta ćelijskih membrana, a dužina ugljovodoničnih lanaca MK koje ulaze u njihov sastav, kao i stepen nezasićenosti, značajno utiču na fluidnost i funkcionalnost samih membrana. U zavisnosti od prisustva dvogubih veza, MK se dele na zasićene (SFA) i nezasićene. Nezasićene MK se u zavisnosti od broja dvogubih veza dele na mononezasićene (MUFA) i polinezasićene (PUFA) MK. Poznato je da su PUFA, za razliku od SFA i MUFA, izuzetno osetljive na oksidaciju, kao i da stepen oksidacije zavisi od broja dvogubih veza u lancu viših masnih kiselina (Cosgrove i sar, 1987).

Tokom oksidativnog stresa, procesom interakcije ROS sa lipidima dolazi do lipidne peroksidacije-LPO (Marnett, 2000), odnosno formiranja lipidnih peroksilradikala i lipidnih hidroperoksida. Reakcija lipidne peroksidacije je lančana reakcija koja počinje formiranjem alkil, peroksil i alkoksil radikala PUFA tokom koje kao krajnji (sekundarni) proizvodi nastaju dugoživeći aldehidi kao što su 4-hidroksi nonenal – HNE i malondialdehid - MDA (Marnett, 1999). 4-HNE je potentan alkilujući agens koji reaguje sa DNK i proteinima formirajući adukte (Kong i Kotraiah, 2012). MDA

može da reaguje sa slobodnim amino-grupama proteina, dovodeći do nastanka oštećenja na proteinima. Pokazano je da i MDA formira DNK adukte, ispoljavajući tako mutageni efekat na nivou bakterija i sisarskih ćelija (Marnett, 1999).

Pretpostavlja se da je lipidna peroksidacija (LPO) jedan od glavnih uzroka nastanka DNK oštećenja koja značajno doprinose pojavi kancera i drugih humanih oboljenja (Marnett i sar., 2002). S obzirom na to da su lipidi glavne komponente ćelijskih membrana, lipidna peroksidacija dovodi do značajnih promena na nivou bioloških membrana. LPO indukuje promene u pogledu fluidnosti i funkcionisanja ćelijskih membrana, inaktivaciju proteina i enzima koji su vezani za ćelijsku membranu kao i pojačanu nespecifičnu propustljivost membrane za jone kao što je jon kalcijuma (Halliwell i Chirico, 1993). Stepem lipidne peroksidacije se može određivati na osnovu masno-kiselinskog profila putem gubitka nezasićenih masnih kiselina, putem detekcije primarnih (hidroperoksidi) ili sekundarnih proizvoda lipidne peroksidacije (MDA i 4-HNE) (Halliwell i Chirico, 1993).

Slobodni kiseonikovi radikali su za ćeliju važni i kao signalni molekuli uključeni u procese proliferacije, diferencijacije, regulacije energetskog metabolizma i odgovora ćelije na stres (Finkel, 2011). U slučaju matičnih ćelija je pokazano da ROS imaju važnu ulogu kako tokom procesa proliferacije tako i tokom diferencijacije (Carriere i sar., 2003).

## 2.6.2. Mehanizmi antioksidativne zaštite na nivou ćelije

Fina ravnoteža između oksidanasa i antioksidanasa obezbeđuje očuvanje strukture i funkcije ćelijskih makromolekula (DNK, proteina i lipida), i do izvesne mere štiti ćelije od daljih oštećenja. Sistem antioksidativne zaštite na nivou ćelije čine enzimske (superoksid-dismutaza, katalaza, glutation-peroksidaza, glutation-reduktaza) i neenzimske komponente (vitamini C i E, GSH (glutation), TRX (tioeredoksin) i redoks senzitivni molekuli npr. APE1/Ref-1 – eng. *apurinic/apyrimidinic endonuclease/redox effector factor-1*, NFE2L2 (Nrf2) – eng. *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*).

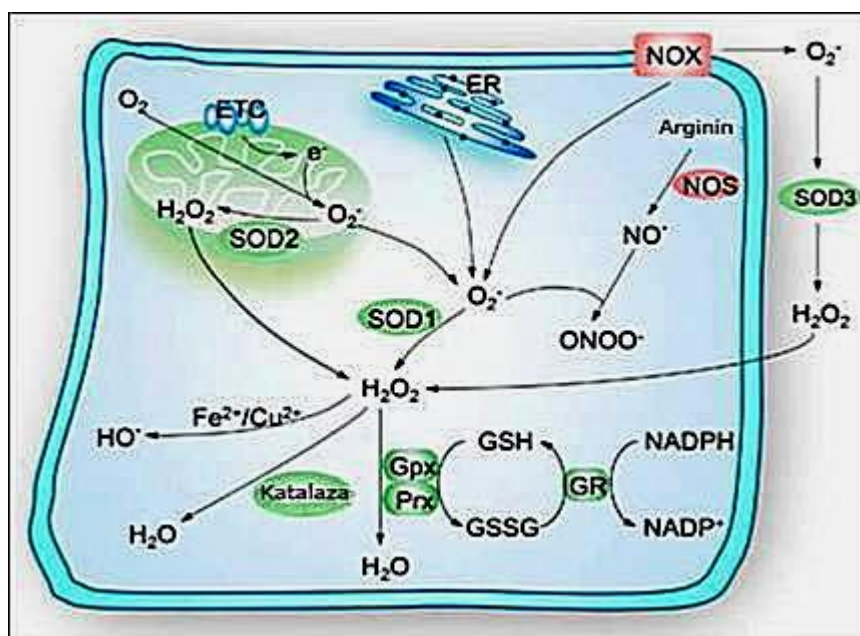
Unutarćelijska koncentracija ROS zavisi od aktivnosti sistema antioksidativne zaštite. Ćelije imaju veliki broj antioksidanasa čiji je cilj prevencija nastanka i uklanjanje već nastalih oštećenja uzrokovanih ROS, ali i učestvovanje u procesu regulacije redoks senzitivnih signalnih puteva. Smatra se da su tri enzima veoma važna za sve ćelije koje žive pod aerobnim uslovima: superoksid-dismutaza (SOD), katalaza i supstrat specifična peroksidaza, odnosno glutation-peroksidaza (GPx). Superoksid-dismutaze (SOD) su široko rasprostranjeni činiooci sistema antioksidativne odbrane, koje su McCord i Fridovich definisali kao proteine koji katalizuju višak superoksid-anjon-radikala u vodonik-peroksid, te na taj način štite redoks senzitivne ćelijske makromolekule od oštećenja (McCord i Fridovich, 1969). Do sada su na nivou sisarskih ćelija identifikovane tri izoforme ovog enzima: bakar,cink-superoksid-dismutaza (Cu,Zn-SOD), mangan-superoksid-dismutaza (Mn-SOD) i ekstracelularna superoksid-dismutaza (EcSOD) (Zelko i sar., 2002). MnSOD izoforma je jedina neophodna za opstanak aerobnih organizama, što je potvrđeno korišćenjem Mn-SOD-knockout miševa, za koje je pokazano da uginu ubrzo nakon rođenja sa izraženim poremećajima na nivou nervnog sistema i srca (Lebovitz i sar., 1996, Zhang i sar., 1996). Zanimljivi su rezultati Shi i sardnika iz 2013. godine, koji su pokazali da dugoživeće miševe (*Peromyscus leucopus*) u odnosu na obične laboratorijske miševe (*Mus musculus*) odlikuje povećanje aktivnosti Cu,Zn-SOD i katalaze dok su mladi, kao i manje oksidativno oštećenje ćelijskih makromolekula u starosti.

Katalaza i peroksidaza prevode nascentni vodonik-peroksid u vodu (u slučaju katalaze kiseonik i vodu). Krajnji rezultat delovanja svih pomenutih enzimskih komponenti sistema antioksidativne zaštite je uklanjanje dve vrste radikala i njihova

konverzija u vodu (**slika 3**) (Weydert i Cullen, 2010). Schriener i saradnici (2005) su pokazali da miševi sa povećanom ekspresijom katalaze imaju životni vek duži za 20%, kao i smanjeno oštećenje mitohondrija.

Pokazano je da ekspresija katalaze koja sadrži sekvencu koja omogućuje efikasniji import u peroksizome, na modelu ostarelih fibroblasta u kulturi, ponovno uspostavlja narušenu redoks ravnotežu i obnavlja integritet mitohondrija u ćelijama uz značajno smanjenje broja ostarelih ćelija u populaciji (Koepke i sar., 2007).

SOD i katalaza ne zahtevaju kofaktore kako bi funkcionisale, dok GPx ne samo da zahteva kofaktore, već ima i 5 izoenzimskih formi. Glutation-reduktaza i glukozo-6-fosfat dehidrogenaza nemaju direktnu ulogu u uklanjanju ROS, ali su neophodne u cilju regeneracije kofaktora (GSH i NADPH) koji omogućuju funkcionisanje GPx (Liu i sar., 2004).



Slika 3. Ilustracija održavanja redoks homeostaze u ćeliji (preuzeto iz Wang i sar., 2013) ETC (elektron transportni lanac), SOD1 (Cu,Zn-SOD), SOD2 (Mn-SOD), SOD3 (EcSOD), NOS (NO-sintaza), NOX (NADPH-oksidaža), ER (endoplazmatični retikulum), Gpx (glutation-peroksidaža), GR (glutation-reduktaza), Prx (peroksiredoksin)

Za enzime koji su uključeni u sistem antioksidativne zaštite je karakteristična njihova lokalizacija u pojedinim ćelijskim odeljcima. Tako je katalaza uglavnom koncentrisana u peroksizomima, Mn-SOD se nalazi u mitohondrijama, Cu,Zn-SOD

(koja čini 90% SOD aktivnosti u eukariotskoj ćeliji) u citoplazmi i nukleusu, dok se ekstraćelijska SOD nalazi van ćelija u nekim tkivima. Izoforme GPx mogu da se nađu u nekoliko subćelijskih odeljaka, na primer u mitohondrijama ili nukleusu. Na taj način ovi enzimi regulišu redoks status u različitim delovima ćelija (Weydert i Cullen, 2010; Liu i sar., 2004).

Tokom *in vitro* kultivacije, disbalans između oksidanasa i antioksidanasa u samim ćelijama može izazvati ireverzibilna oštećenja čija je posledica starenje, apoptoza pa čak i neoplastična transformacija ćelija (Kirkwood i Austad, 2000). Dugotrajna *in vitro* kultivacija za posledicu ima promenjenu morfologiju mitohondrija, smanjen antioksidativni kapacitet koji prati povećanje koncentracije ROS i smanjenje koncentracije ATP-a. Disfunkcionalne mitohondrije na taj način utiču na starenje matičnih ćelija *in vitro*, poreklom i od mladih i od starih donora (Geißler i sar., 2012). Rezultati dobijeni na MMC poreklom iz koštane srži pacova su pokazali da tokom starenja, posredstvom Wnt/ $\beta$ -katenin signalnog puta, dolazi do indukcije stvaranja ROS, povećanja stepena lipidne peroksidacije i inhibicije aktivnosti SOD (Hao i sar., 2013, Zhang i sar., 2013). U skladu sa svim prethodno navedenim efektima su i uočene korelacije u pogledu povećane aktivnosti nekih od enzima koji su uključeni u sistem antioksidativne zaštite sa produženjem života jedinke (Sun i Tower, 1999; Schriener i sar., 2005). Zbog toga, istraživanja koja se sprovode na matičnim ćelijama i različitim ćelijskim linijama kao krajnji cilj imaju definisanje onih *ex vivo* uslova koji će uz minimalno oštećenje ćelija obezbediti brzo umnožavanje i dobijanje velikog broja vijabilnih ćelija čiji potencijal za diferencijaciju neće biti ugrožen.

Važno je naglasiti postojanje tendencija koje ukazuju na to da ćelije koje *in vitro* intenzivno proliferišu svoj metabolizam skreću sa procesa oksidativne fosforilacije u smeru glikolize (*Warburg-ov efekat*). Ovaj fenomen je izgleda primenljiv i na pluripotentne ćelije u kulturi koje odlikuje intenzivna proliferacija. Najnovija istraživanja pokazuju da i ćelije koje se smatraju pluripotentnim (*in vitro*), odlikuje niska koncentracija slobodnih kiseonikovih radikala, kao i mali broj slabo razvijenih mitohondrija, što ukazuje na mogućnost da je sniženje ROS posledica smanjene aktivnosti mitohondrija u nediferenciranim ćelijama (Vacanti i Metallo, 2013).

Jedan od mogućih načina prevazilaženja negativnih efekata ROS *in vitro* je kultivacija ćelija na niskim koncentracijama O<sub>2</sub> ili primena različitih antioksidanasa. N-

acetil-L-cistein (NAC) je antioksidant koji se već koristi kao terapijski molekul u medicini, ali se često primenjuje i u *in vitro* biološkim sistemima.

## 2.7. Dejstvo N-acetil-L-cistein-a

NAC je acetilovana forma L-cisteina koja je ćelijama važna kao prekursor u sintezi glutationa (Kelly, 1998). NAC može da bude važan izvor sulfhidrilnih (-SH) grupa tokom kultivacije ćelija, ali je važan i kao acetilovani prekursor redukovano glutationa i kao agens koji direktno neutrališe ROS i slobodne radikale azota (Zafarullah i sar., 2003). Efekat NAC-a je opsežno ispitivan *in vitro*, na različitim primarnim ćelijskim kulturama ili imortalizovanim ćelijskim linijama i u ograničenoj meri na MMĆ. Osnovni pravci istraživanja kada se radi o ćelijskoj kulturi su usmereni na uticaj ovog molekula na proliferaciju i starenje ćelija, dok su njegovi efekti na diferencijaciju ćelija posebno važni prilikom ekspanzije MMĆ.

**Efekat NAC na proliferaciju ćelija:** Efekat NAC-a na proliferaciju različitih ćelijskih tipova je zanimljiv u smislu da su u literaturi zabeleženi i pozitivni i negativni efekti. Primeri negativnog efekta NAC-a na proliferaciju ćelija u kulturi su dozno zavisna inhibicija proliferacije epitelnih ćelija sluznice usne duplje (Sato i sar., 2009) kao i inhibicija proliferacije fibroblasta. Pretpostavlja se da se inhibicija proliferacije zasniva na snižavanju koncentracije ciklina D1, kao i povećanju aktivnosti Mn-SOD (Menon i sar., 2007).

Sa druge strane, dodatak NAC-a u kulture MMĆ poreklom iz masnog tkiva ljudi i nekih životinja, povećava njihov proliferativni potencijal, bez znakova starenja ćelija, uz očuvanje sposobnosti diferencijacije (Lin i sar., 2005, Wang i sar., 2008). Takođe, NAC dozno zavisno povećava preživljavanje i broj pacovskih L6 mioblasta *in vitro* (Kim i sar., 2006). NAC takođe poboljšava preživljavanje MMĆ iz kostne srži pacova po transplantaciji (Song i sar., 2010).

Objašnjenje stimulacije proliferacije može biti u vezi sa činjenicom da dodavanje NAC-a u medijum za kultivaciju, na 20% O<sub>2</sub> značajno smanjuje starenje MMĆ iz koštane srži pacova uzrokovano prekomernom aktivacijom Wnt-β katenin signalne kaskade, što je pokazano smanjenim procentom SA-β-gal pozitivnih ćelija (Zhang i sar., 2013). Dodavanje NAC je takođe smanjilo oštećenje DNK molekula i

ekspresiju p16, p53 i p21 (Zhang i sar., 2013). Još jedna studija je ukazala na pozitivno delovanje NAC-a na matične ćelije. Prisustvo NAC-a *in vitro* poboljšava adheziju i migraciju DPSC na MTA (eng. *mineral trioxide aggregate*) nosačima. Ovaj biološki efekat je povezan sa poboljšanjem redoks statusa u ćelijama nakon tretmana NAC-om (Minamikawa i sar., 2011). Takođe, NAC sprečava apoptozu, a stimuliše proliferaciju DPSC nakon korišćenja kompozitnih materijala sa smolama (Kojima i sar., 2008). Pretretman humanih embrionalnih MMĆ NAC-om je značajno poboljšao njihov antioksidativni kapacitet u smislu povećanja nivoa glutaciona u ćelijama, kao i sposobnost ćelijske adhezije i širenja nakon izlaganja oksidativnom stresu *in vitro*. Administracija NAC-om pretretiranih ćelija imunokompromitovanim miševima kod kojih je izazvana povreda pluća primenom bleomicina, je dovela do značajno poboljšane retencije, ali i proliferacije, injektovanih MMĆ u povređenom tkivu, pa samim tim i preživljavanja u odnosu na NAC-om netretirane miševе (Wang i sar., 2013).

**Efekat NAC na diferencijaciju ćelija:** Osim radova koji govore o efektu NAC-a na proliferaciju ćelija, u literaturi postoje podaci koji opisuju uticaj NAC-a na diferencijaciju ćelija. HEMA (2-hidroksietil-metakrilat) je jedan od materijala koji se koristi u dentalnoj medicini i koji ima izraženo citotoksično dejstvo. Dodavanje NAC-a u kulturu DPSC / HEMA, štiti DPSC od apoptoze, indukujući njihovu diferencijaciju u odontoblaste (Paranjpe i sar., 2007). Protektivni efekat NAC-a se zasniva na aktivaciji gena uključenih u proces odontogene diferencijacije. NAC promoviše diferencijaciju DPSC putem aktivacije NFκB (eng. *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) i inhibicijom JNK (eng. *c-Jun N-terminal kinase*) (Paranjpe i sar., 2007). Dodavanje NAC u medijum za diferencijaciju značajno je povećavalo osteogenu diferencijaciju, kako tokom rane induktivne faze, tako i tokom faze mineralizacije i to stimulacijom Wnt5a ekspresije (Ji i sar., 2011). NAC takođe stimuliše osteoblastnu diferencijaciju ćelija poreklom iz kalvarije miša, mehanizmom koji najverovatnije uključuje pojačanu sintezu glutaciona (Jun i sar., 2008). NAC stimuliše i neurogenu diferencijaciju DPSC putem aktivacije serin/treonin protein-kinaze PKB/Akt (Noh i sar., 2012).

S druge strane, dodavanje NAC-a u medijum za diferencijaciju inhibira adipogenezu MMĆ izolovanih iz kostne srži (Ji i sar., 2011). Navedeni rezultati se



mogu povezati sa činjenicom da su u proces adipogene diferencijacije uključeni ROS, čiji se nivo smanjuje dodavanjem NAC (Kanda i sar., 2011).

Rezultati dobijeni na embrionalnim matičnim ćelijama ukazuju na to da suplementacija NAC-om inhibira diferencijaciju u pravcu kardiomiocita. Prooksidativna sredina predstavlja važan preduslov tokom diferencijacije u pravcu kardiomiocita embrioidnih tela jer je pokazano da je tretman embrioidnih tela sa antioksidansima značajno smanjio proces kardiomiogeneze (Sauer i sar., 2000).

NAC je antioksidant koji ima potencijalno značajan uticaj na terapijsku primenu MMC. Podaci navedeni u literaturi pokazuju da efekat NAC, u zavisnosti od doze i tipa ćelije na koju deluje, može biti potpuno različit, uključujući efekte od smanjenog vijabiliteta ćelija do stimulacije proliferacije. U literaturi nema podataka o dejstvu različitih koncentracija NAC-a na osnovne funkcionalne osobine matičnih ćelija zubne pulpe mlečnih zuba dece, niti o njegovom dejstvu na mehanizme antioksidativne zaštite ovih ćelija u kulturama na 20% O<sub>2</sub>.

### 3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Istraživanja vezana za matične ćelije poreklom iz zubne pulpe su važna s obzirom na mogućnost njihove kliničke primene. Ekspanzija ćelija pre njihove kliničke primene se najčešće izvodi u prisustvu nefiziološki visoke koncentracije kiseonika, a njihovo preživljavanje po transplantaciji zavisi od uslova u kojima su kultivisane. NAC je antioksidans koji može da spreči nastanak oksidativnih oštećenja, ali i da utiče na proliferaciju i diferencijaciju ćelija *in vitro*. Još uvek nije ispitano koja koncentracija NAC efikasno sprečava oksidativno oštećenje matičnih ćelija zubne pulpe, i kakav efekat ta koncentracija ima na proliferaciju i/ili diferencijaciju ovih ćelija. Cilj ove disertacije je bio da se tokom višenedeljne kultivacije ćelija izolovanih iz zubne pulpe mlečnih zuba dece ispita njihov proliferativni potencijal kao i potencijal za diferencijaciju u osteoblaste, hondroците i adipocite. Drugi cilj je bio da se utvrdi uticaj različitih koncentracija NAC na oksidativni status i proliferaciju i/ili diferencijaciju matičnih ćelija zubne pulpe. Zbog toga su postavljeni zadaci da se bez i sa različitim koncentracijama NAC (0,1 mM, 1 mM i 2 mM) odredi:

1. proliferativni potencijal ćelija i njihovo vreme udvajanja u kulturi,
2. vijabilitet i procenat apoptotičnih ćelija,
3. relativna brzina ulaska ćelija u aktivan ćelijski ciklus,
4. ekspresija pozitivnih i negativnih markera MMĆ (CD34, CD29, CD44, CD73, CD106, CD90, CD146, Col1A, STRO-1),
5. prisustvo SA- $\beta$ -galaktozidaze,
6. aktivnost enzima ALDH,
7. ekspresija HIF-1 $\alpha$ ,
8. zastupljenost pojedinih izoformi LDH tokom kultivacije,
9. očuvanje multipotentnosti, odnosno mogućnost diferencijacije u ćelije koštanog, hrskavičavog i masnog tkiva,
10. aktivnost enzima antioksidativne zaštite (SOD i katalaze) i stepen oksidativnog oštećenja intracelularnih proteina i lipida.

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. Izolacija ćelija

U ovom radu su korišćene ćelije zubne pulpe zdravih mlečnih zuba dece starosti od 6 do 8 godina. Za korišćenje ćelija zubne pulpe u cilju uspostavljanja ćelijskih kultura i izvođenja *in vitro* eksperimenata dobijen je pristanak roditelja. Neposredno pre ekstrakcije, krunica zuba je premazivana sa 0.3% hlorheksidin gelom. Svi zubi su bili u trećoj i četvrtoj fazi resorpcije korena i vađeni su zbog regularne smene mlečnih zuba. Zubi su vađeni u lokalnoj anesteziji uobičajenom stomatološkom metodom. U svim etapama rada pre uspostavljanja ćelijske kulture, manipulacija sa zubima i zubnom pulpom se odvijala u rastvoru antibiotika i antimikotika (Antibiotic-Antimycotic solution, Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY 14072, USA) u koncentraciji od 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml streptomicina i 0.25 µg/ml amfotericina B (AA rastvor) u fosfatnom puferu (PBS, Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY 14072, USA). Najkasnije 6 sati nakon ekstrakcije zuba, zubna pulpa je izdvajana pomoću dentalnog ekskavatora, zatim isprana 2 puta u PBS-u i prenetu u Petri šolju (BD Biosciences, San Jose, CA 9513, USA) u kojoj je usitnjena na delove manje od 1 mm. Ćelije zubne pulpe su dobijene metodom tkivnog eksplanta (Kerkis i sar., 2006) u DMEM/F12 (Advanced DMEM/F-12, Gibco) medijumu sa 10% FBS (MSC-Qualified FBS, Gibco) i AA rastvorom.

Ćelije su gajene u ovim uslovima 10 do 15 dana (nulta pasaža – P0), nakon čega su tripsinizovane i subkultivisane u sledeće pasaže u dvogasnom CO<sub>2</sub> inkubatoru na 5% CO<sub>2</sub> i 21% O<sub>2</sub> (Thermo Electron Corporation, Valtham, MA, USA). Tripsinizacija je vršena sa TrypLE™ Express (Gibco) kada su kulture dostizale 70 do 80% konfluencije. Ćelije su zasejavane u gustini od 5000 ćelija po cm<sup>2</sup> u T-25 flaskovima (Primaria, BD Biosciences). Medijum je menjan svakog trećeg dana, a ćelije su analizirane u pasažama 4, 6 i 8.

## 4.2. Određivanje CFU-F

Za procenu broja CFU-F, ćelije su u prvu pasažu zasejavane u koncentraciji od 400 ćelija / cm<sup>2</sup> u flaskove T-25 (Primaria, BD Biosciences). Nakon sedam dana ćelije su isprane PBS-om, fiksirane metanolom i obojene 0,5% kristal-violetom. Agregati sa više od 50 ćelija su brojeni kao kolonije.

## 4.3. Analiza efekta NAC na populaciju ekspanziranih ćelija poreklom iz zubne pulpe

Da bi se utvrdilo dejstvo različitih koncentracija NAC (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) na proliferaciju ćelija, 24 sata posle sađenja ćelija u kulture je dodat NAC u finalnoj koncentraciji od 0,1 mmol/L, 1 mmol/L i 2 mmol/L. Efekat NAC na diferencijaciju je ispitivan tako što su ćelije gajene u uslovima sa NAC-om tokom 72 sata, nakon čega je regularni medijum zamenjen medijumom za diferencijaciju (osteogenu, hondrogenu i adipogenu).

### 4.3.1. Vreme udvajanja broja ćelija u kulturi

Vreme udvajanja broja ćelija u kulturi (eng. *Population Doubling Time* – PDT) određeno je na osnovu broja zasađenih ćelija i broja ćelija koje su dobijene po tripsinizaciji kultura u momentu kada su ćelije dostigle oko 80% konfluencije. Žive ćelije su brojane manuelnom metodom uz pomoć hemocitometra i uz korišćenje boje tripan plavo. Ćelije su zasejavane u triplikatu. PDT je dobijen primenom formule:

$$PDT = t \log 2 / \log N_t - \log N_0$$

**N<sub>t</sub>** je broj ćelija u po tripsinizaciji, **N<sub>0</sub>** je zasađeni broj ćelija, a **t** je dužina kultivacije u danima.

Broj živih ćelija u suspenziji je određen uz pomoć tripan plavog. Metoda je zasnovana na principu da žive ćelije ne apsorbuju boju, dok se mrtve oboje plavo u 0,2 % rastvoru tripan plavog, jer boja prodire u ćeliju kroz oštećenu ćelijsku membranu. Podjednake količine komercijalne boje (Gibco) i ćelijske suspenzije se pomešaju, a broj živih ćelija se prebroji u komorici. Primenom odgovarajuće formule, broj ćelija se izrazi na mililitar suspenzije.

Sve analize su urađene bez i sa različitim koncentracijama NAC-a.

#### 4.3.2. Određivanje fenotipa ekspandiranih ćelija

Imunofenotipizacija *ex vivo* umnoženih ćelija, od četvrte do osme pasaže, je izvršena sa sledećim mišjim antihumanim antitelima CD34 (PE konjugovano), CD29 (PECy5 konjugovano), CD73 (PE konjugovano), CD90 (PE konjugovano), CD146 (PE konjugovano) i CD106 (FITC konjugovano). Sva antitela su proizvedena u BD Biosciences (San Jose, CA, SAD). Nakon tripsinizacije i ispiranja u hladnom PBS / 0.5% FCS, ćelije ( $2 \times 10^5$ ) su inkubirane sa odgovarajućim monoklonskim antitelima 30 minuta na 4 °C, potom su tri puta isprane (1500 o/min (400 g), 5 minuta) i resuspendovane za konačnu analizu. U cilju određivanja stepena nespecifičnog vezivanja antitela, korišćene su odgovarajuće izotipske kontrole (BD Biosciences, San Jose, CA, SAD). Sve analize su rađene na protočnom citometru CyFlow CL (Partec, Münster, Germany).

Osim protočnom citometrijom, ekspresija površinskih markera je određena i primenom imunocitohemije. Ćelije u četvrtoj pasaži su posađene u komorice za ćelijsku kulturu (eng. *Multiwell Glass Chamber Slides, BD Biosciences*) i nakon postizanja semikonfluente, fiksirane su metanolom i formaldehidom u odnosu 1: 9 (10 minuta, sobna t) i dva puta ispirane u PBS-u. Aktivnost endogene peroksidaze je blokirana sa 0,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 minuta, sobna t). Nakon svakog sledećeg koraka inkubacije, ćelije su ispirane sa TBS / 0,5% goveđi serum albumin (BSA, Sigma) / 0.05 % Tween-20 (Sigma), 5 min. Uzorci su zatim inkubirani sa kozjim serumom (20 minuta, sobna t) i isprani PBS-om. Zatim su uzorci inkubirani sa primarnim monoklonskim antitelima 60 minuta na sobnoj t. Za analize su korišćena sledeća antitela: anti-CD73 (Santa Cruz), anti-STRO-1 (Millipore Chemicon), anti-CD29 (Millipore Chemicon), anti-CD44 (Santa Cruz), anti-collagen I (Millipore Chemicon), anti-VCAM1/CD106 (Millipore Chemicon), anti-osteonektin (Santa Cruz Biotech), anti-CD34 (Millipore Chemicon). Primarna antitela su vizelizovana korišćenjem senzitivnog EnVision+ kita (Dako), na način kako je preporučio proizvođač. DAB ili AEC (Dako) su korišćeni kao hromogen. Kontrole su podrazumevale isključivanje primarnog antitela ili korišćenje nespecifičnog antitela. Preparati su kontrastirani hematoksilinom, montirani *Keiser*-ovim gelom i analizirani na svetlosnom mikroskopu. Na isti način je detektovano prisustvo HIF-1 $\alpha$  u ćelijama, korišćenjem anti-HIF-1 $\alpha$  antitela (Millipore Chemicon).

### 4.3.3. Određivanje aktivnosti aldehid-dehidrogenaze

Aktivnost aldehid dehidrogenaze (ALDH) je određena korišćenjem Aldefluor kita (Stem Cell Technologies Inc, Vancouver, Canada) u skladu sa uputstvima proizvođača. Nakon tripsinizacije ćelija i ispiranja u PBS-u, ćelije ( $2 \times 10^6$ ) su resuspendovane u odgovarajućem puferu koji se nalazi u sastavu kita. U ćelijske suspenzije je dodavano jedinjenje bodipi-aminoacetaldehid (BAAA) koje predstavlja substrat za ALDH i koje nije fluorohrom. BAAA je dodavan u koncentraciji od 1,5  $\mu\text{M}/\text{mL}$ . Princip testa se bazira na činjenici da ALDH, prisutan u ćelijama, konvertuje BAAA u bodipi-aminoacetate (BAA), koji fuorescira i koji se zadržava u unutrašnjosti ćelija zbog ukupnog negativnog naelektrisanja. Posle inkubacije od 45 minuta na 37 °C, kao rezultat reakcije, ćelije sa viskom aktivnošću ALDH, su intenzivno fluorescirale. Reakcija je zaustavljena dodavanjem odgovarajuće količine ALDH inhibitora, dietilamino-benzaldehid (DEAB). Sve analize su rađene na protočnom citometru CyFlow CL (Partec, Münster, Germany).

Sve analize su urađene bez i sa 0,1 mmol/L NAC.

### 4.3.4. Analiza ćelijskog ciklusa propidijum-jodidom

U cilju određivanja brzine ulaska ćelija u sintetsku (S) fazu ćelijskog ciklusa, ćelije u kulturi su prvo sinhronizovane (usklađena im je faza ćelijskog ciklusa u kojoj se nalaze) kultivacijom u 0,5% FBS u DMEM/F12 tokom 24 sata. Ćelije su potom tretirane različitim koncentracijama NAC-a, tokom 12 sati. Ćelije su po isteku tretmana tripsinizovane, isprane dva puta u PBS-u i fiksirane u 80% etanolu (ohlađen na -20 °C) preko noći na -20 °C. Pre bojenja propidijum-jodidom (PI) ćelije su isprane u PBS-u (1500 o/min (400 g), 10 minuta) i resuspendovane u 500  $\mu\text{L}$  rastvora: 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PI/PBS (Sigma-Aldrich), 0,1 mg/mL Ribonukleaze A (Sigma-Aldrich) i 0,05% Igepala (Sigma-Aldrich). Potom su ćelije inkubirane 40 minuta na 37 °C, isprane (1500 o/min (400g), 5 minuta), resuspendovane u 500  $\mu\text{L}$  PBS-a i analizirane protočnom citometrijom.

Sve analize su urađene bez i sa različitim koncentracijama NAC.

#### 4.3.5. Određivanje broja deoba testom sa karboksifluoresceinom

U cilju određivanja broja ćelijskih deoba sa i bez tretmana NAC-om, korišćena je intraćelijska fluorescentna boja CFDA-SE (eng. *carboxyfluorescein succinimidyl ester* - CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, Invitrogen). Princip testa se zasniva na činjenici da CFDA-SE difunduje u ćelije, u kojima se, pod dejstvom esteraza, konvertuje u CFSE koji ima intenzivnu fluorescirajuću aktivnost. Po deobi ćelije, količina boje se podjednako raspodeljuje na obe ćerke ćelije, što omogućuje detekciju do osam ćelijskih ciklusa protočnom citometrijom. Posle tripsinizacije i ispiranja (PBS / 2% FCS, 1500 o/min, 5 minuta), u ćelijsku suspenziju ( $5 \times 10^5$  ćelija) dodat je CFDA-SE u finalnoj koncentraciji od 2,5 mM, 10 minuta, sobna t, u mraku (Lyons i Parish, 1994). Reakcija je zaustavljena dodavanjem ohlađenog medijuma (DMEM / F12 / 10% FCS) i inkubacijom na +4 °C u trajanju od 5 minuta. Nakon dvostrukog ispiranja u kompletnom medijumu (DMEM / F12 / 10% FCS), uzorak ćelija je analiziran protočnom citometrijom, dok su ostale ćelije zasejane u T-25 flaskove, i nakon 24 sata tretirane različitim koncentracijama NAC-a. Nakon 72 sata tretmana, ćelije su tripsinizovane, isprane i analizirane na protočnom citometru.

Sve analize su urađene bez i sa različitim koncentracijama NAC.

#### 4.3.6. Procena ćelijske proliferacije pomoću BrdU eseja

Analog timidina BrdU 5-bromo-2-deoksiuridin je reagens koji se često koristi u cilju procene ćelijske proliferacije. BrdU je analog timidina, pa se tokom tretmana ugrađuje u DNK tokom S faze ćelijskog ciklusa, pa na taj način služi kao marker proliferacije. Ćelije obeležene BrdU-om mogu se na različite načine detektovati, u našem sistemu je korišćeno specifično antitelo koje je detektovano imunocitohemijski (BrdU In-Situ Detection Kit II, BD Pharmingen™). Nakon tripsinizacije ćelije su zasejavane u predmetna stakalca za tkivnu kulturu s komoricama (eng. Culture glass chamber slides, BD Falcon™). Rastvor za bojenje je pripremljen tako što je stok solucija u koncentraciji od 1 mM BrdU u  $1 \times$  PBS puferu) 100 puta razblažena u kompletnom medijumu koji je korišćen za uzgajanje ćelija. Nakon što su se ćelije preko noći zalepile, medijum u kome su se nalazile zamenjen je rastvorom za bojenje. Ćelije

su inkubirane 12 sati, dva puta isprane u PBS-u i fiksirane u 4% puferovanom formaldehidu (pH 7.4). BrdU inkorporacija je vizualizovana korišćenjem anti-BrdU antitela, streptavidin HRP i DAB-a kao hromogena. U cilju određivanja procenta ćelija koje su inkorporirale BrdU, ukupno je brojano 300 ćelija, pa je procenat BrdU pozitivnih ćelija preračunavan.

#### **4.3.7. Određivanje broja živih ćelija „Trypan Blue” testom**

Broj živih ćelija u suspenziji je određen „Trypan Blue” testom, brojanjem vijabilnih ćelija u hemocitometru. Metoda je zasnovana na principu da žive ćelije ne apsorbuju boju, dok se mrtve oboje plavo u 0.2% rastvoru tripan plavog, jer boja prodire u ćeliju kroz oštećenu ćelijsku membranu. Postupak je sledeći: pomešano je 50  $\mu$ L 0,4 % tripan plavog i 50  $\mu$ L suspenzije ćelija dobijene tripsinizacijom adherentnih ćelija, stavljeno u komoru, nakon nekoliko minuta pauze žive ćelije su izbrojane u hemocitometru. Brojanje je vršeno u poljima za brojanje leukocita i po istoj proceduri. Broj ćelija je određivan pomoću sledeće formule:

$$\text{Br. } \acute{C}/\text{ml} = \text{Br. } \acute{C} / \text{kvadratu} \times R \times 10000$$

$\acute{C}$ - žive ćelije, R razblaženje suspenzije ćelija

#### **4.3.8. Određivanje broja apoptotičnih ćelija**

Za određivanje broja apoptotičnih ćelija korišćen je komercijalni kit za detekciju apoptoze (Beckman Coulter, Fullerton, California). Sve procedure su izvedene u skladu sa uputstvom proizvođača. Ukratko, ćelije su nakon tripsinizacije dva puta isprane u ohlađenom PBS-u (1500 o/min, 5 minuta) i resuspendovane u ohlađenom odgovarajućem puferu u koncentraciji od  $1 \times 10^6$  ćelija / mL. U 100 mikrolitara ćelijske suspenzije je dodat 1  $\mu$ L aneksin-FITC i propidijum-jodid (PI) u finalnoj koncentraciji od 50  $\mu$ g/mL. Ćelijska suspenzija je inkubirana 15 minuta na ledu u mraku. Potom su ćelije isprane dva puta (1500 o/min, 5 minuta) i analizirane na protočnom citometru.

Opisani test se bazira na činjenici da u početnoj fazi apoptoze dolazi do premeštanja fosfatidil-serina iz unutrašnjosti lipidnog dvosloja na spoljašnju stranu ćelijske membrane. *In vivo*, ta strukturna transformacija omogućava fagocitima prepoznavanje apoptotičnih ćelija i njihovo uklanjanje bez izazivanja upalnog procesa.



Aneksin V je protein koji se specifično vezuje za fosfatidil-serin. Kada se za aneksin V veže fluorescentna boja, broj apoptotičnih ćelija za koje se veže ovaj konjugovani molekul se može odrediti pomoću protočne citometrije. Aneksin V se vezuje i za fosfatidil-serin s unutrašnje strane ćelijske membrane ukoliko je membrana oštećena, kao u slučaju nekroze ćelija. Kako bi se mogle razlikovati nekrotične, žive i ćelije u apoptozi, ćelije se dodatno boje sa PI koji zbog velike molekulske mase ne prolazi kroz ćelijsku membranu živih ćelija. Ako je ćelijska membrana oštećena PI ulazi u ćeliju i vezuje se za jedarni materijal zbog specifičnog afiniteta prema nukleinskim kiselinama. Zato je moguće istovremenim bojenjem ćelija aneksin V - FITC (zelena fluorescenca) i PI (crvena fluorescenca) razlikovati žive ćelije (FITC negativne, PI negativne), apoptotične ćelije (FITC pozitivne, PI negativne) i ćelije u kasnoj apoptozi (nekrozi) (FITC pozitivne, PI pozitivne).

Sve analize su urađene bez i sa različitim koncentracijama NAC.

#### **4.3.9. Određivanje aktivnosti $\beta$ -galaktozidaze**

Aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze (eng. *Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase* - SA- $\beta$ -Gal) za koju se smatra da je marker starenja ćelija, određena je korišćenjem komercijalnog kita Senescence Cells Histochemical Staining kit (Sigma-Aldrich) prema instrukcijama proizvođača. Ćelije ( $2 \times 10^3$ ) su kultivisane u komoricama (eng. *Multiwell Glass Chamber Slides, BD Biosciences*) bez i sa različitim koncentracijama NAC-a tokom 72 sata. Nakon ispiranja u PBS-u ćelije su fiksirane komercijalnim fiksativom 5 minuta na sobnoj temperaturi, inkubirane na 37 °C tokom noći u sveže pripremljenom rastvoru za bojenje koji je sadržao X-Gal (5-brom-4-hlor-3-indolil P3-D-galaktozidu) u rastvoru čiji je pH 6.0. Ćelije su potom isprane u PBS-u i kontrastirane bojom Neutral Red (Merck). Citoplazma ćelija koje sadrže SA- $\beta$ -Gal se bojila zeleno. Procenat obojenih ćelija je određivan na uzorku od 300 ćelija. Prema nivou aktivnosti  $\beta$ -galaktozidaze, sve pozitivne ćelije su označene kao slabo (+), umereno (++) ili visoko pozitivne (+++).

Sve analize su urađene bez i sa različitim koncentracijama NAC.

#### 4.3.10. Diferencijacija ćelija in vitro

Diferencijacija ekspanziranih ćelija u smeru osteogeneze, hondrogeneze i adipogeneze izvedena je korišćenjem komercijalnih medijuma (Stem PRO Osteogenesis Kit, Stem PRO chondrogenesis Kit, Stem PRO Adipogenesis Kit Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

**Osteogeneza:** nakon prvih 48 sati po sađenju ćelija ( $5 \times 10^3$ ) u komorice, kompletan medijum za ekspanziju je zamenjen sa Stem PRO Osteogenesis medijumom (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Medijum je menjan dva puta nedeljno tokom trajanja osteogene diferencijacije. Pojedine kulture su prekidane posle 5 i 10 dana da bi se utvrdila aktivnost alkalne fosfataze (detaljan opis metode naveden u daljem tekstu materijala i metoda). Preostale kulture su nakon tri nedelje prekinute, ćelije oprane PBS-om i obojene Alizarin red S (Sigma-Aldrich). Detaljan opis bojenja se nalazi u daljem tekstu materijala i metoda.

**Adipogeneza:** prvih 48 sati po sađenju ćelija ( $5 \times 10^3$ ) u komorice, kompletan medijum za ekspanziju je zamenjen sa Stem PRO Adipogenesis medijumom (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Medijum je menjan dva puta nedeljno tokom trajanja adipogene diferencijacije. Posle tri nedelje kultivacije ćelije su obojene Oil red O bojom (Sigma-Aldrich) kojom se dokazuje prisustvo masnih kapljica u ćelijama (detaljan opis metode naveden u daljem tekstu materijala i metoda).

**Hondrogeneza:** posle tripsinizacije, ćelije su isprane i resuspendovane u Stem PRO Hondrogenesis medijumu (Invitrogen) i kultivisane na dva načina. Prvi način je podrazumevao kultivaciju ćelija ( $2 \times 10^5$ ) u polipropilenskim epruvetama posle centrifugiranja na 1000 o/min 5 minuta da bi se dobio takozvani ćelijski "pellet". Tokom dve nedelje kultivacije i menjanja medijuma dva puta nedeljno, došlo je do stvaranja trodimenzionalne strukture loptastog oblika veličine 1,5 mm. Formirane pelete su potom fiksirane, ukalupljne i dalje procesuirane klasičnim histološkim tehnikama kojima je pokazana građa ovih tvorevina.

Drugi način je podrazumevao kultivaciju ćelija u hondrogenom medijumu u već opisanim komoricama. Posle dve nedelje ćelije su lizirane i određena je koncentracija glikozaminoglikana, proteina i DNK. Istovremeno su za kontrolu svih navedenih uslova, ćelije gajene u medijumu za ekspanziju.

#### **4.3.11. Alizarin Red S bojenje**

Nakon tri nedelje osteogene diferencijacije, ćelije su isprane u PBS-u, fiksirane u formaldehidu (30 minuta) i dva puta isprane destilovanom vodom. Ćelije su potom obojene sa 2% rastvorom Alizarin Red S, pH 4,2 (Sigma Aldrich), 20 minuta na sobnoj t i nekoliko puta isprane destilovanom vodom. Crvena boja ECM je ukazivala na prisustvo deponovanih soli kalcijuma. Pet reprezentativnih polja iz svakog uslova je slikano na invertnom mikroskopu LEICA (LEICA DMIL LED, Leica Microsystems, Wetzlar, Nemačka).

#### **4.3.12. Oil Red O-bojenje i kvantifikacija adipogene diferencijacije**

Posle tri nedelje adipogene diferencijacije, ćelije su isprane u PBS-u, fiksirane formaldehidom (30 minuta) i dva puta isprane destilovanom vodom. Zatim je na ćelije dodat 60% izopropanol u trajanju od 5 minuta. Nakon toga su ćelije obojene 5% rastvorom Oil red O boje (Sigma-Aldrich) u 60% izopropanolu. Nakon 10 minuta kulture su detaljno isprane vodom iz česme, pa destilovanom vodom i slikane na invertnom mikroskopu Leica (LEICA DMIL LED, Leica Microsystems, Wetzlar, Nemačka). Potom su preparati slikani na svetlosnom mikroskopu pod imerzijom.

Za kvantifikovanje stepena diferencijacije ekspandiranih ćelija u adipocite, Oil-red O je eluiran rastvorom 10% Igepala (Sigma-Aldrich) u izopropanolu (Baker J.T.) tokom 10 minuta na 37 °C. Dobijeni supernatant je centrifugiran 5 minuta na 12000 o/min (15000g) kako bi se uklonile ćelije. Optička gustina rastvora je određena na 490 nm spektrofotometrijski. Upoređivanjem optičkih gustina rastvora diferenciranih i nediferenciranih ćelija dobijen je odnos koji je dalje analiziran.

#### 4.3.13. Histoemijska i imunohistoemijska analiza hondrogenih peleta

Pelete su fiksirane 24h u 10% neutralnom formalinu, dehidratacija je urađena kroz seriju alkohola (50%, 70%, 96% etanol i 100% izopropanol) i ksilol. Tkivo je uklapano u parafin sa tačkom topljenja 42 °C, a isečci debljine 5 µm bojeni su alcian-plavim da bi se utvrdilo prisustvo glikozaminoglikana (GAG). Procedura bojenja alcian-plavim: Nakon deparafinizacije isečaka u ksilolu i hidratacije kroz alkohole različitog razblaženja (100%, 96% etanol) i destilovanu vodu, isečci su bojeni vodenim rastvorom alcian-plavog (0,1%). Kao medijum za montiranje pokrovnog stakla korišćen je DPX (DPX mounting medium, Fisher scientific®).

Sinteza kolagena tip 2 u peletama je potvrđena imunocitoemijski, korišćenjem antitela na kolagen tip 2 (Abcam).

#### 4.3.14. Kolorimetrijsko određivanje aktivnosti enzima alkalna fosfataza u ćelijskom lizatu

Da bi se uporedila sposobnost osteogene diferencijacije između različitih uslova kultivacije, merena je aktivnost alkalne fosfataze (AP) u ćelijskom lizatu 5 i 10 dana nakon dodatka osteogenog medijuma. Aktivnost AP je neophodna za hidrolizu β-glicerofosfata čime *in vitro* započinje proces mineralizacije. Kolorimetrijska metoda za određivanje aktivnosti AP kao hromogeni supstrat koristi p-nitrofenil-fosfat (pNPP, eng. *p-nitrophenylphosphate*, (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Pod dejstvom AP, pNPP prelazi u p-nitrofenol, rastvorljiv, žuto obojeni proizvod, čiji je intenzitet boje proporcionalan aktivnosti enzima.

U navedenim vremenima, ćelije su tri puta isprane u PBS-u, a potom je u svaku komoricu dodato po 200 µL pufera za lizu ćelija (1% Igepal, pH 7,5, Sigma-Aldrich). Posle inkubacije od 12 časova (4 °C), sadržaj je prenešen u ependorfice i na 4 °C centrifugiran 10 minuta na 10000 g (10000 o/min). Izdvojeni supernatant je korišćen za analizu. Aktivnost AP je određivana u mikrotitarskim pločama po sledećem postupku. U svaki bunarčić je dodato po 5 µL uzorka, 15 µL pufera za lizu ćelija i 180 µl p-NPP rastvora u puferu za supstrat (5 mM p-nitrofenil-fosfat u 50 mM glicinu, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 10,5). Uzorci su inkubirani 15 minuta na 37 °C i reakcija je prekidana dodavanjem 1

M NaOH. Potom su apsorbance očitavane na optičkom čitaču (Labsystems Multiskan PLUS, Finska) na talasnoj dužini od 405 nm. Aktivnost AP je izračunataa korišćenjem jednačine izvedene iz standardne krive i izražena je kao  $\mu\text{g}$  p-nitrofenola/mg proteina/minuti.

#### **4.3.15. In situ hibridizacija**

*In situ* hibridizacija (*In situ hybridization* - ISH) je sprovedena u cilju detekcije ćelija koje sintetišu kolagen tip I u hondrogenim peletama. Na isečcima hondrogenih peleta debljine 5  $\mu\text{m}$  sprovedene su Riboprobe (RNK probe) označene digoksinom (DIG) za kolagen tip I. Za pozitivnu kontrolu, prilikom izvođenja ISH za kolagen tip I, korišćeno je koštano tkivo mišijih embriona. Hibridizacija sa sintetisanim RNK probama vršena je preko noći na 60 °C u vlažnoj sredini. Nakon inkubacije preparati su oprani da bi se odstranili nevezani molekuli i slabo vezane sekvence i reakcija je blokirana sa 10% FBS u 1% blokirajućem puferu u PBS-Tween-u. Da bi se vizuelizovali DIG-om označeni oligonukleotidi, nakon hibridizacije je dodato, anti-DIG antitelo konjugovano sa AP u blokirajućem puferu. Reakcija se odvijala preko noći na temperaturi od 4 °C. Posle inkubacije, dodat je supstrat za vizuelizaciju AP aktivnosti, NBT / BCIP (Nitroblue tetrazolium soli / 1,5-dibrom-4 hlor-3-fosfat-indolil) koji formira tamno plavi ili braon u vodi nerastvorljiv talog na mestima gde postoji aktivnost AP nakon inkubiranja na 37 °C. Preparati su potom slikani optičkim mikroskopom.

#### **4.3.16. Određivanje koncentracije glikozaminoglikana**

Za određivanje koncentracije glikozaminoglikana korišćen je Blyscan kit (Biocolor, UK) po uputstvima proizvođača. Nakon papainske digestije po 100  $\mu\text{l}$  uzorka je kombinovano sa reagensom koji sadrži *blyscan* boju, inkubirano pola sata i centrifugirano na 12000 o/min (15000 g) 10 minuta kako bi se istaložio kompleks boje i glikozaminoglikana. Nakon resuspendovanja kompleksa u reagensu za disocijaciju u mikrotitarskim pločama određivana je apsorbance na 650 nm. Rezultati su izraženi kao  $\mu\text{g}$  GAG/ $\mu\text{g}$  DNK.

#### **4.3.17. Kvantifikacija DNK**

Ukupna DNK u uzorcima ćelijskih lizata je kvantifikovana fluorimetrijskim testom (FluoReporter<sup>®</sup> Blue Fluorometric dsDNA Quantitation Kit, Invitrogen, Molecular Probes). Ovaj kit sadrži DNK-specifičnu bisbenzimidazol boju Hoechst 33258. U 100 µl papainske suspenzije je dodato 100 µL rastvora Hoechst 33258 boje u TNE (10 mM Tris, 2 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) puferu. Finalna koncentracija je Hoechst 33258 je bila 0.35 µg/mL. Fluorimetrijsko merenje DNK standarda i uzoraka je urađeno u triplikatu. Standardi i uzorci su ekscitirani na 355 nm na spektrofluorimetru (1420-040 VICTOR3V multilabel counter, Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Singapore), dok je emisija merena na 460 nm. DNK koncentracija je izračunata na osnovu standardne krive i izražena kao µg DNK/ml papainske suspenzije.

#### **4.4. Određivanje stepena oksidativnog oštećenja i aktivnosti enzima antioksidativne odbrane**

##### **4.4.1. Liziranje ćelija i odvajanje ćelijskih proteina**

Nakon inkubacije bez i sa različitim koncentracijama NAC-a, ćelije isprane sa PBS-om i lizirane dodavanjem 1 mL pufera u T-25 flasku. Nakon inkubacije u trajanju od 30 minuta na ledu, lizirane ćelije su centrifugirane na 10000g (10000 o/min) 15 minuta na +4 °C. Supernatant je čuvan na -80 °C do izvođenja analiza koje su imale za cilj da pokažu stepen oksidativnog oštećenja i nivo antioksidativne zaštite.

Pufer za lizu (pH 7,5) je sadržao 1% nejonskog deterdženta Igepal-a, 50 mM Tris-a (tris(hidroksimetil)aminometan), 150 mM NaCl, 1 mM Na-ortovanadata (inhibitor tirozinskih proteinskih fosfataza), 10 mM NaF (inhibitora serinskih i treoninskih proteinskih fosfataza), i koktel inhibitora proteaza (1 mM PMSF fenilmetilsulfonilfluorid), 10 mM ε-aminokapronske kiseline, 2 µg/ml aprotinina A, 40 µg/ml leupeptina i 1 µM pepstatina A). Sve komponente pufera su nabavljene od Sigma-Aldrich kompanije.

#### 4.4.2. Koncentracija proteina u ćelijskom lizatu

Koncentracija proteina u citosolnoj frakciji liziranih ćelija je određena upotrebom komercijalnog BCA testa (SERVA BCA Protein Assay Macro Kit, Heidelberg, Germany) uz modifikacije. Princip testa se zasniva na sposobnosti proteina da uz prisustvo BCA (eng. *Bicinchoninic Acid*) redukuje dvovalentne jone bakra stvarajući proizvod ljubičaste boje (Smith, 1985). U mikrotitarskim pločama (96 bunarića sa ravnim dnom) pomešano je 200  $\mu$ l radnog rastvora BCA reagensa sa 10  $\mu$ l ćelijskog lizata. Nakon 30 sekundi intenzivnog mešanja, rastvor je inkubiran 30 minuta na 37 °C. Posle hlađenja na sobnoj temperaturi određivana je apsorbanca na 540 nm na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (Labsystems Multiskan PLUS, Finska). Koncentracija proteina je određena na osnovu standardne krive za goveđi serum albumin (BSA, *Bovine Serum Albumine*). Senzitivnost ovog testa omogućuje detekciju proteina u opsegu koncentracija od 25 – 1000  $\mu$ g proteina / mL.

#### 4.4.3. Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze (CAT) u ćelijskom lizatu je određena na osnovu funkcije ovog enzima da katalizuje razgradnju vodonik-peroksida do vode i molekuskog kiseonika. Smanjenje koncentracije vodonik-peroksida praćeno je merenjem apsorbanca na 240 nm, kinetičkom metodom analize. Jedinica aktivnosti CAT izražena je brojem  $\mu$ mol-a vodonik-peroksida koji se razlaže u jednom minutu po miligramu proteina u ćelijskom lizatu ( $\mu$ mol/mg/min). (Aebi, 1984)

#### 4.4.4. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze

Za određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD) korišćena je „adrenalinska metoda“ koja pripada grupi metoda negativnog tipa, koja prati smanjenje brzine autooksidacije adrenalina u alkalnoj sredini, koji je zavistan od superoksid-anjon-radikala. Brzina autooksidacije adrenalina prati se spektrofotometrijski (CECIL CE 2021UV/VIS) preko promene apsorbanca na 480 nm. Porast apsorbanca na 480 nm je posledica akumulacije adrenohroma. SOD aktivnost je izražena kao U/mg proteina u

ćelijskom lizatu (supernatantu). Jedinica SOD aktivnosti je definisana kao zapremina, odnosno količina proteina koja uzrokuje 50% inhibicije brzine autooksidacije adrenalina u linearnom delu porasta apsorbance. Mn-SOD je određivana nakon preinkubacije ćelijskog lizata sa 5 mM KCN. Aktivnost Cu,Zn-SOD je izračunavana na osnovu razlike između aktivnosti ukupne SOD i Mn-SOD. (Misra i Fridovich, 1972)

#### **4.4.5. Određivanje količine malondialdehida (MDA)**

Koncentracija malondialdehida je određena reakcijom sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA), pri čemu se formira obojeni proizvod. Intenzitet boje nastalog proizvoda određuje se spektrofotometrijski (CECIL CE 2021UV/VIS) merenjem apsorbance na 535 nm. Koncentracija MDA je izračunata na osnovu molarnog ekstinkcionog koeficijenta bojenog proizvoda ( $a=1.56 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) i izražena u nM na miligram proteina u ćelijskom lizatu (nm MDA / mg proteina). (Cynamon i sar., 1985)

#### **4.4.6. Određivanje ukupnih tiolnih (-SH) grupa**

Broj ukupnih tiolnih grupa u ćelijskom lizatu (proteinskih i neproteinskih) određen je spektrofotometrijski sa 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoevom kiselinom i merenjem apsorbance na talasnoj dužini od 412 nm na spektrofotometru (CECIL CE 2021UV/VIS), korišćenjem apsorpcionog koeficijenta  $a=14150 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Dobijeni rezultati su izraženi u  $\mu\text{mol/mL}$ . (Ellman, 1959)

#### **4.4.7. Određivanje relativne zastupljenosti LDH izoenzimskih oblika u supernatantu**

Izoenzimski oblici laktat-dehidrogenaze (LDH<sub>1</sub>, LDH<sub>2</sub>, LDH<sub>3</sub>, LDH<sub>4</sub> i LDH<sub>5</sub>) su određivani vertikalnom elektroforezom na 7,5% PAGE-gelu (HOEFFER MINI VE, Amersham, LKB, 2117, Bromma, Uppsala Sweden), uz primenu TRIS-glicinskog pufera, po metodi Yoshida i Takakuwa (1997). Trake su vizualizovane u prisustvu litijum-laktata kao supstrata, NADH kao kofaktora i tetrazolijum plavog. Intenziteti traka LDH izozima mereni su denzitometrijski korišćenjem Scion Image Beta 4.02



software (scion corp., 2007). Koncentracija ukupne LDH je izražena kao P (površina na gelu) normalizovana na koncentraciju proteina. Intenzitet svake trake koja predstavlja određenu izoenzimsku varijantu je izražen kao procenat u odnosu na ukupnu površinu. Kako su Rf vrednosti LDH<sub>4</sub> i LDH<sub>5</sub> izoformi tokom elektroforeze bile približne, u analizama je prikazana zbirna vrednost obe izoforme.

#### **4.4.8. Određivanje sadržaja karbonilnih grupa u oksidovanim proteinima u supernatantu**

Karbonilni derivati proteina određivani su reakcijom sa 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) (Levine i sar., 1990). Kao proizvod reakcije nastaju 2,4-dinitrofenilhidrazoni koji se detektuju spektrofotometrijski na 370 nm. Korišćenjem 30% trihlorsirćetne kiseline nastao je talog koji je pomešan sa 10 mM DNPH (2,4-dinitrophenilhidrazin) u 2 M HCl. Uzorci su inkubirani 1 h na sobnoj temperaturi, isprani tri puta sa rastvorom etanol-butilacetata (1:1 v/v), rastvoreni u 6 M gvanidin-HCl na 37 °C 15 minuta uz mešanje na vorteksu. Količina karbonilnih grupa je izmerena spektrofotometrijski i određena iz absorbance na 370 nm uz upotrebu molarnog ekstinkcijskog koeficijenta  $a=22 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Vrednosti su izražene u nM karbonilnih derivata po miligramu proteina.

#### **4.5. Analiza masno-kiselinskog profila ukupnih ćelijskih lipida gasno-tečnom hromatografijom**

##### **4.5.1. Ekstrakcija ukupnih lipida iz ćelija**

Ukupni lipidi iz ćelija su izolovani smešom organskih rastvarača. Svi korišćeni rastvarači u postupku ekstrakcije lipida su bili J.T. Baker p.a. kvaliteta. Nakon metilovanja, metil-estri masnih kiselina su razdvajeni gasno-tečnom-hromatografijom (GLC).

**Princip metode:** Ukupni lipidi iz ćelija su izolovani uz primenu izopropil-alkohola i hloroforma u koji je dodat 0.005% BHT (antioksidant) (Sigma-Aldrich) po metodi Rose i Oklander (1965). Ćelijska suspenzija u PBS-u (100  $\mu\text{L}$ ) je intenzivno

mešana 60 minuta sa 2,2 mL izopropanola. Zatim je dodato 1,7 mL hloroforma i uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi uz povremeno mešanje tokom narednih sat vremena. Dobijeni lipidni ekstrakt je propušten kroz disk natrijum-sulfata i uparen u struji azota.

**Priprema uzoraka za gasno-tečnu-hromatografiju:** Suvi prečišćeni ekstrakti su rastvoreni u 300 µl smeše hloroform-methanol 2:1 (v/v) upareni do suva u struji azota, resuspendovani u 1,5ml n-heksana i intenzivno mešani. Masne kiseline su esterifikovane po modifikovanoj metodi transesterifikacije Christopherson i Glass-a (Christopherson i Glass, 1969). Naime, u prečišćeni ekstrakt, resuspendovan u 1,5 ml n-heksana, je dodavano 0.2 ml 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> u metanolu i inkubirani 2 sata na 85 °C. Nakon hlađenja smeša je centrifugirana na 3000 o/min (1600 g) i odvojeni heksanski sloj uparen do suva u struji azota.

#### 4.5.2. Ekstrakcija ukupnih lipida iz FBS

**Princip metode:** Ukupni lipidi fetalnog goveđeg seruma su ekstrahovani smešom organskih rastvarača hloroform - metanol 2:1 (v/v). U 0,5 ml seruma je dodato 3 puta po 1,5 ml smeše organskih rastvarača hloroform - metanol 2:1 (v/v) i 50 mg% BHT. Između dodavanja porcija hloroform – metanol, ekstrakt je snažno vorteksovan oko 1 minut. Dobijeni lipidni ekstrakt je propušten kroz disk natrijum sulfata, pa uparen do suva. Suvi prečišćen ekstrakt rastvoren je u 0,2 ml hloroform - metanola 2:1 (v/v), uparen do suva i korišćen za metilovanje.

Masne kiseline se direktno esterifikuju po modifikovanoj metodi transesterifikacije (Christopherson i Glass, 1969).

#### 4.5.3. Gasno-tečna hromatografija

Uzorci pripremljenih metil-estara rastvoreni su u oko 10 µL n-heksana (u zavisnosti od količine suvog ostatka) neposredno pre analize, a od toga je injektovano 0,5 µL uzorka. Masne kiseline su identifikovane na osnovu retencionih vremena standarda masnih kiselina (Sigma, Chemical Co, st.Louis, MO, USA) i/ili Supelco Inc., Belleforte, PA, USA) dobijenim pri istim uslovima. Sadržaji pojedinačnih masnih

kiselina izraženi su u procentima od ukupno detektovanih masnih kiselina, na osnovu površine njihovih pikova.

Masne kiseline ukupnih lipida su analizirane gasno-tečnom hromatografijom na aparatu Shimadzu GC 2014 sa jonizacionim detektorom. Korišćena je semikapilarna kolona DB-23. Debljina filma stacionarne faze je bila 0,25 mm. Protok nosećeg gasa (helijuma) je bio 5 mL/min, protok vazduha 320 mL/min, a vodonika 30 mL/min. Temperatura detektora je bila podešena na 250 °C, a injektora na 220 °C. Temperaturni profil kolone je izgledao na sledeći način: 5 minuta na 140 °C, zatim je temperatura postepeno povećavana za 3 °C/minuti do 190 °C, odnosno 1 °C/minuti do 220 °C, i na kraju 15 minuta na 220 °C.

#### **4.6. Statistička analiza**

Rezultati su obrađeni i prikazani kao srednja vrednost ( $\bar{X}$ ), medijana (MD), standardna devijacija (SD), interkvartilni raspon (IR), minimum (Min), maksimum (Max). Za poređenje rezultata dobijenih posle kultivacije ćelija u različitim uslovima korišćeni su Šapiro-Vilk (eng. *Shapiro-Wilk*) za ispitivanje normalne distribucije podataka; Studentov t-test za ispitivanje razlika između dve grupe podataka (za parametre koji pokazuju normalnu distribuciju); Vilkinsonov test označenih rangova (eng. *Wilcoxon signed ranks test*) za analizu dve grupe podataka koji su rezultat ponovljenih merenja (ne-parametarska analiza). Minimalni nivo statističke značajnosti bio je  $p < 0,05$ . Statistička obrada podataka je urađena korišćenjem softverskog paketa Prisma 5.0. Neke od analiza su urađene u Excell-u.

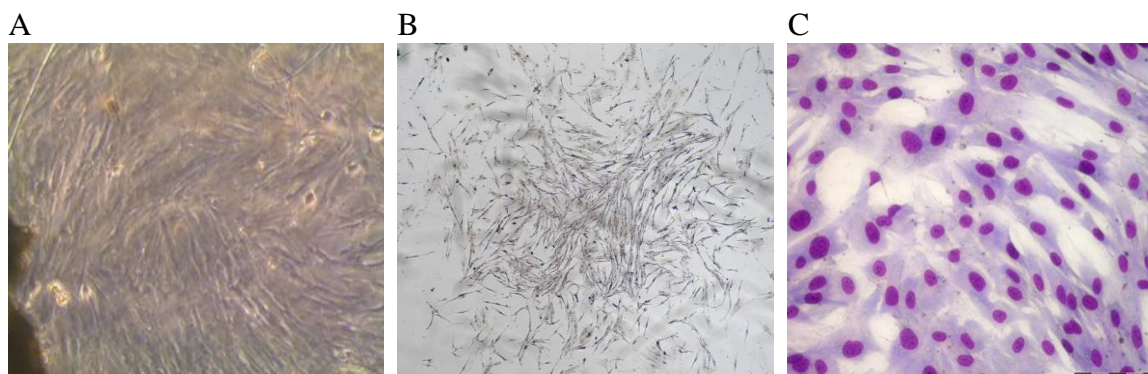
## 5. REZULTATI

### 5.1. Izolacija početne populacije ćelija

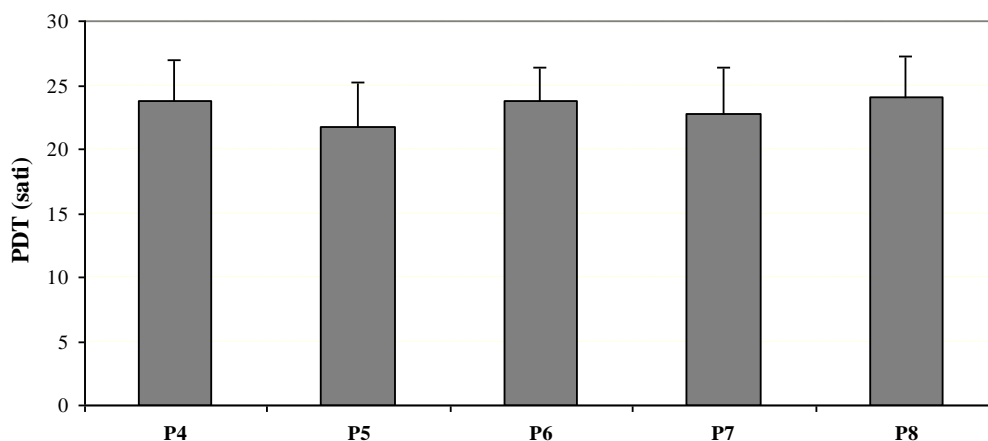
U ovom radu su metodom tkivnog eksplanta izolovane ćelije poreklom iz zubne pulpe eksfoliranih zuba dece stare od 6 do 8 godina. Nakon 2 do 3 dana iz eksplanta su počinjale da migriraju ćelije koje su istovremeno i proliferisale stvarajući ostrvca bogata ćelijama (**slika 1A**). Nakon deset do četrnaest dana, ćelije su tripsinizovane, prebrojane i presejane u nove plastične posude. Vreme kultivacije posle prve tripsinizacije je označeno kao prva pasaža (P1). Broj presejanih ćelija se kretao od 30000 do 300000 ćelija. U P1 broj CFU-F je iznosio  $470 \pm 52$  na 10000 zasejanih ćelija (**slika 1B**). Ćelije su uzgajane do osme pasaže nakon čega je kultivacija prekidana. PDT kao i ostale funkcionalne karakteristike izolovanih ćelija (proliferacija, diferencijacija, starenje, apoptoza) su evaluirane u P4, P6 i P8.

### 5.2. Proliferacija ćelija tokom dugotrajne kultivacije

Vreme duplikacije ćelija je u proseku bilo 23,23 sata i tokom čitavog perioda kultivacije koje je od prve do osme pasaže izosilo 31 dan, se nije značajno razlikovalo (**grafikon 1**). Ukupan broj deoba tokom kultivacije (ne računajući nultu pasažu) je bio  $30,67 \pm 2,42$ . Dominirale su ćelije fibroblastoidne morfologije, dok su pljosnate, velike ćelije, bile retke (**slika 1C**).



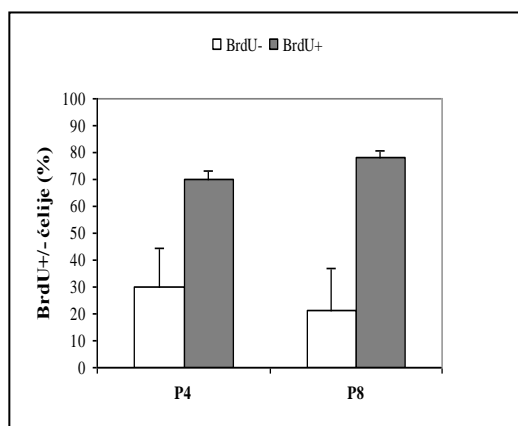
Slika 1. Nediferencirane ćelije zubne pulpe u kulturi. A) Rast ćelija iz eksplanta. U uglu dole levo se vidi tkivo zubne pulpe, a celo polje je prekriveno ćelijama koje migriraju i proliferišu (invertni mikroskop, uveličanje objektiva  $\times 20$ ). B) *Colony forming unit – fibroblast* obojene kristal violet bojom, sedmi dan kultivacije u P1 (uveličanje objektiva  $\times 10$ ). C) Fibroblastoidne ćelije u kulturi (P2), obojene May-Grünwald Giemsa bojom (uveličanje objektiva  $\times 100$ ).



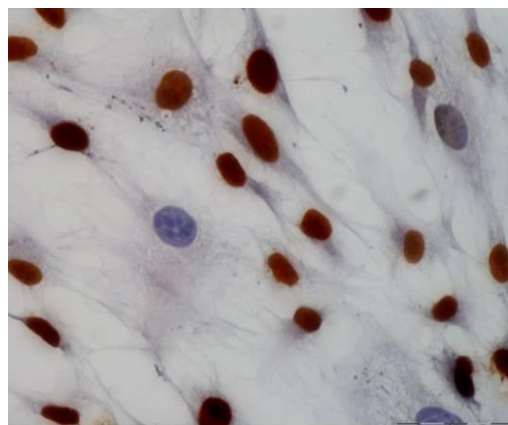
Grafikon 1. Vreme duplikacije broja ćelija u kulturi (PDT) kroz pasaže, izraženo u satima. Na grafikonu su prikazane  $\bar{X} \pm SD$  (n=6)

BrDU test je pokazao da je tokom 12 sati kultivacije u P4, kroz S fazu ćelijskog ciklusa, u proseku prošlo  $70 \pm 15\%$  ćelija. U P8, je za isti vremenski period kroz S fazu prošao nešto veći broj ćelija ( $78 \pm 33\%$ ).

A



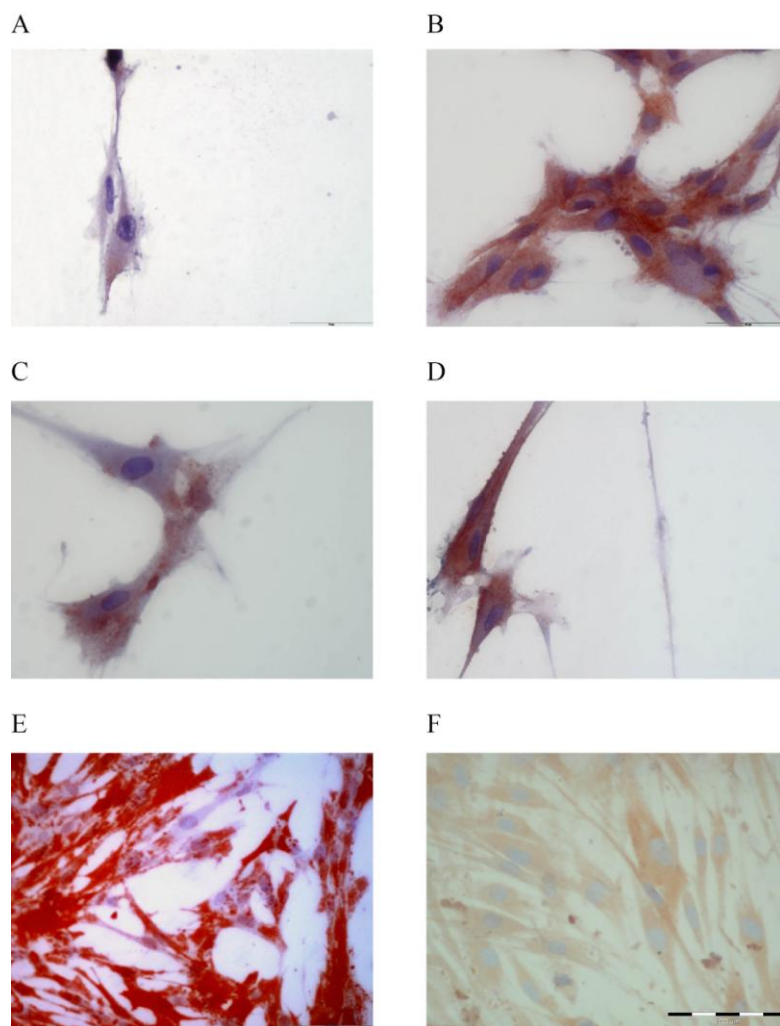
B



Grafikon 2. A) Procenat ćelija (P4 i P8) koje nakon 12 sati kultivacije prolaze kroz S fazu ćelijskog ciklusa. Na grafikonu su prikazane  $\bar{X} \pm SD$  (n=3). B) Reprezentativno polje na kome se vide BrDU pozitivne (braon jedro) i BrDU negativne ćelije (plavo jedro). Uveličanje objektiva  $\times 40$ .

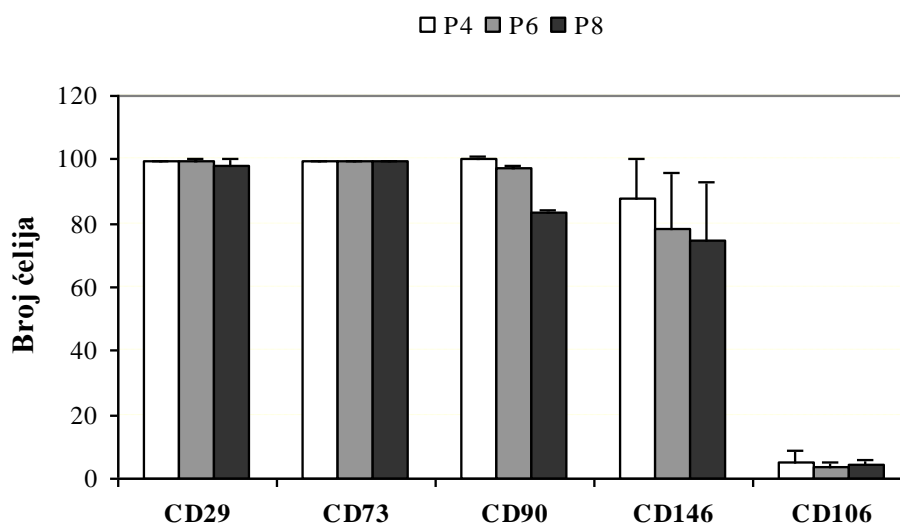
### 5.3. Ekspresija površinskih antigena tokom kultivacije

Ekspresija površinskih antigena tokom kultivacije ćelija izvedena je primenom imunocitohemije i protočne citometrije. Primenom imunocitohemije je pokazano da je oko 10% ćelija u pasaži četiri ekspimiralo STRO-1 (slika 2A). Gotovo sve ćelije su u pasaži četiri ekspimirale CD44, CD73, kolagen tip I, CD29 i osteonektin (slika 2B, 2C, 2D, 2E i 2F).



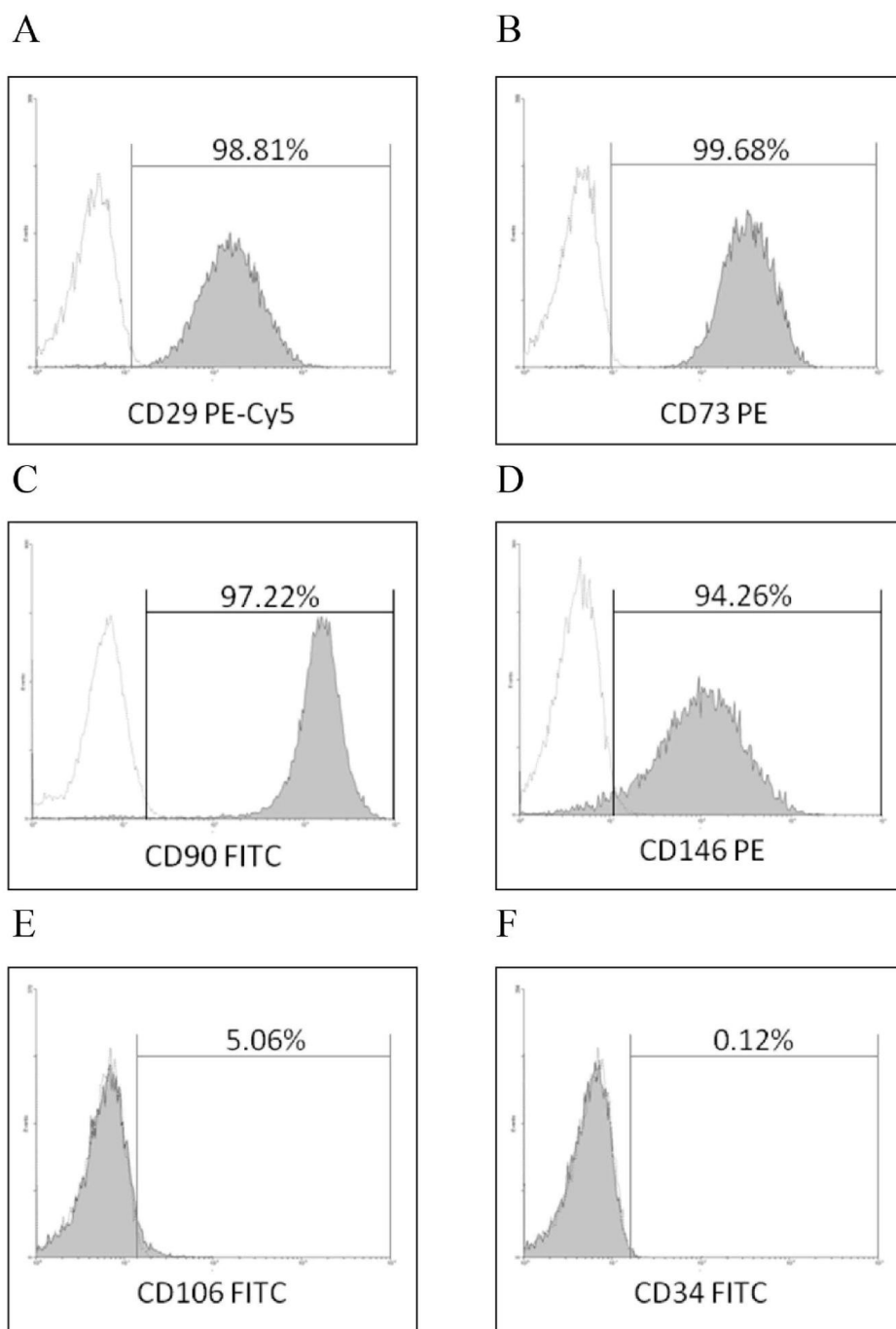
Slika 2. Reprezentativne slike ekspresije pojedinih markera karakterističnih za fenotip ćelija poreklom od mezoderma, P4. A) ekspresija STRO-1; B) ekspresija CD29; C) ekspresija CD73; D) ekspresija kolagena 1; E) ekspresija CD44; F) ekspresija SPARC (osteonektin) markera (uveličanje objektiva  $\times 40$ ).

Kada su ćelije u P4, P6 i P8 analizirane protočnom citometrijom, pokazano je da su antigeni CD29 i CD73 zastupljeni podjednako tokom čitavog perioda kultivacije. Istovremeno, populacija ćelija koja eksprimira antigene CD90, CD106 i CD146 imala je trend opadanja tokom ispitivanog vremena (**grafikon 3**).



Grafikon 3. Procenat ćelija koje ekspimiraju navedene markere tokom kultivacije u P4, P6 i P8. Na grafikonu su prikazane  $\bar{X} \pm SD$  (n=6).

Na grafikonu 4 su prikazani reprezentativni histogrami ekspresije CD29, CD73, CD90, CD146, CD106 i CD34 molekula iz pasaže 4.

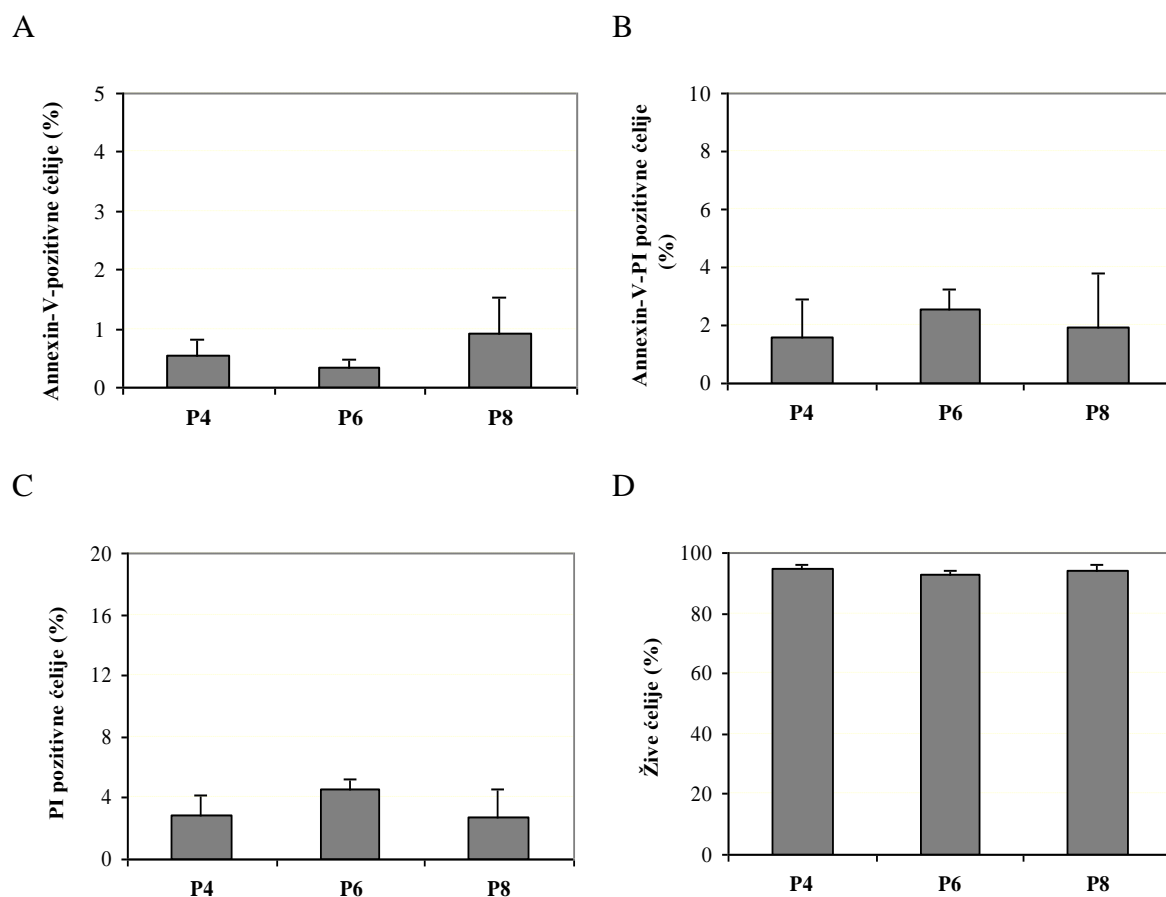


Grafikon 4 A-E. Reprezentativni histogrami ekspresije pojedinih površinskih antigena na ekspanziranoj populaciji ćelija. Izotipske kontrole su prikazane kao nebojene površine ispod pune linije, dok je intenzitet fluorescence ćelija prikazan sivo obojenim površinama.



#### 5.4. Određivanje apoptoze tokom kultivacije ćelija

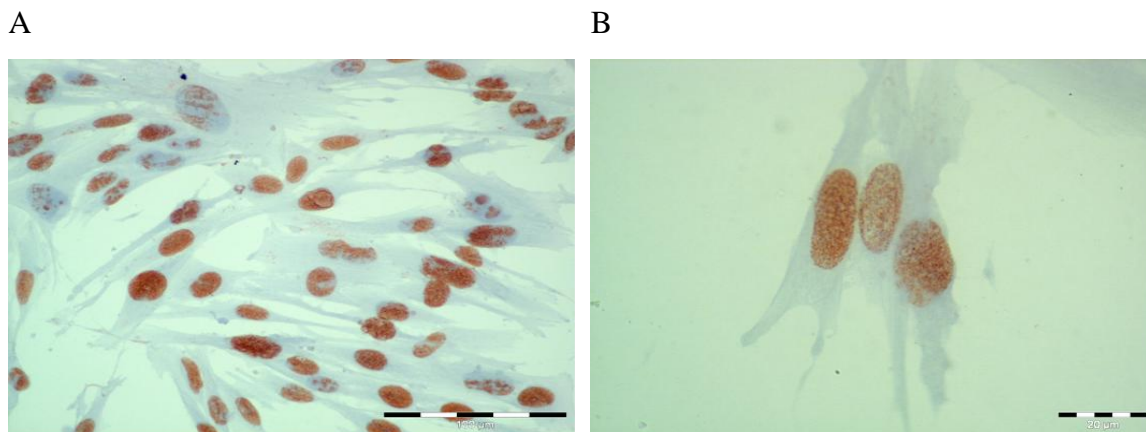
Tokom kultivacije ćelija u P4, P6 i P8 je pokazano da posle tripsinizacije nema značajnih razlika između broja ćelija u ranoj apoptozi, kasnoj apoptozi i potpuno razgrađenih ćelija (**grafikon 4A, B i C**). Takođe, broj živih ćelija je bio podjednak tokom čitavog perioda kultivacije (**grafikon 4D**).



Grafikon 5. Procenat ćelija u različitim fazama apoptoze i procenat živih ćelija tokom dugotrajne kultivacije ćelija. A) Procenat ćelija u ranoj apoptozi. B) Procenat ćelija u kasnoj apoptozi) Procenat nekrotičnih ćelija i D) Procenat živih ćelija. Na grafikonu su prikazane  $\bar{X} \pm SD$  (n=6). (PI – propidijum-jodid)

## 5.5. Detekcija HIF-1 $\alpha$ tokom kultivacije ćelija

Tokom kultivacije ćelija u svim navedenim pasažama, pokazano je da veoma visok procenat ekspandiranih ćelija ( $95,6 \pm 2,3\%$ ) pokazuje imunoreaktivnost na HIF-1 $\alpha$  u jedru (**slika 3A i B**).

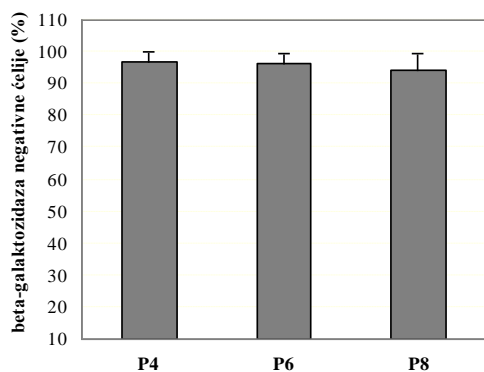


Slika 3 A, B. Kultivisane ćelije, P4, 80% konfluencije. Braon obojena jedra su pozitivna na anti-humano HIF-1 $\alpha$  antitelo A) uveličanje  $\times 20$ . B) uveličanje  $\times 40$ .

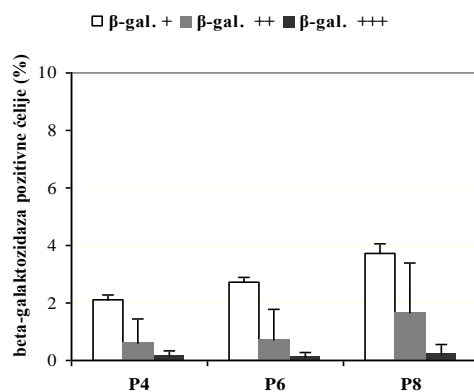
## 5.6. Određivanje aktivnosti $\beta$ -galaktozidaze tokom kultivacije ćelija

Rezultati koji su dobijeni ispitivanjem aktivnosti SA- $\beta$ -Gal u ćelijama tokom P4, P6 i P8 pokazuju da se tokom dugotrajne kultivacije ćelija izolovanih iz zubne pulpe mlečnih zuba dece aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze ne menja značajno, odnosno kod većine ćelija aktivnost ovog enzima nije prisutna (**grafikon 6A, slika 4**). Ipak, prisutan je uočljiv trend porasta ćelija koje imaju najniži i srednji stepen aktivnosti ovog enzima, dok procenat visoko pozitivnih ćelija blago raste (**grafikon 6B**).

A

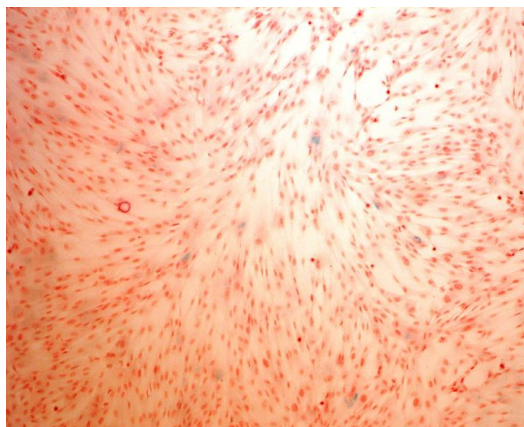


B

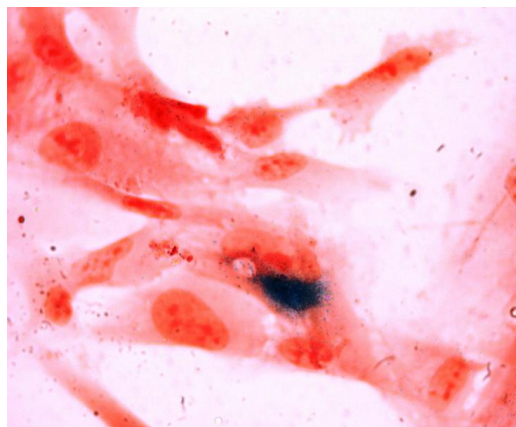


Grafikon 6. A) Procenat ćelija kod kojih se ne može utvrditi aktivnost SA- $\beta$ -Gal tokom dugotrajne kultivacije ćelija. B) Procenat ćelija koje imaju slabu, umerenu i visoku aktivnost SA- $\beta$ -Gal tokom dugotrajne kultivacije ćelija. Na grafikonu su prikazane  $\bar{X} \pm SD$  (n=6).

A



B



Slika 4 – Ćelije obojene na SA- $\beta$ -Gal. Zeleno obojena citoplazma ukazuje da ćelije imaju povišenu aktivnost SA- $\beta$ -Gal. A) uveličanje  $\times 10$ . B) uveličanje  $\times 40$

## 5.7. Diferencijacija

Tokom dugotrajne kultivacije ćelija, u P4, P6 i P8 izvedeni su testovi koji su imali za cilj da pokažu sposobnost diferencijacije nediferenciranih, ekspandiranih ćelija u osteoblaste, adipocite i hondrocite. Osim toga, različitim testovima su kvantifikovane pojedine funkcionalne karakteristike diferenciranih ćelija i rezultati su međusobno upoređivani da bi se utvrdilo da li se sposobnost diferencijacije menja tokom ekspanzije ćelija.

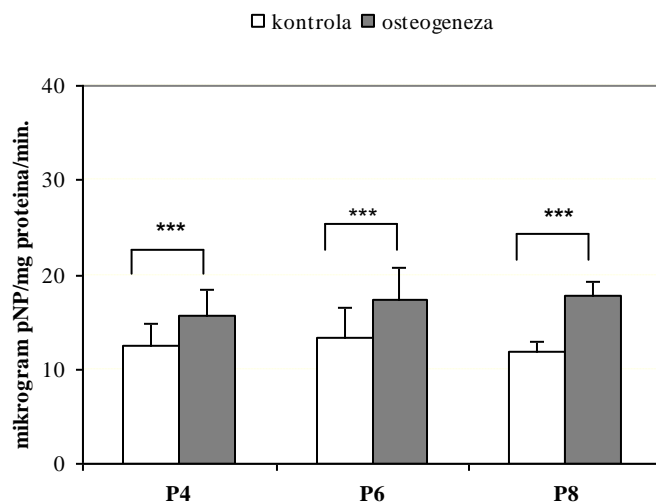
### 5.7.1. Osteogena diferencijacija

Kultivacijom ekspandiranih ćelija u osteogenom medijumu pokazano je da se one u P4, P6 i P8 diferenciraju u pravcu osteoblasta. U samom toku osteogene diferencijacije, već posle pet dana dolazi do porasta aktivnosti alkalne fosfataze (**grafikon 7A**), a ona ostaje povišena i desetog dana kultivacije (**grafikon 7B**).

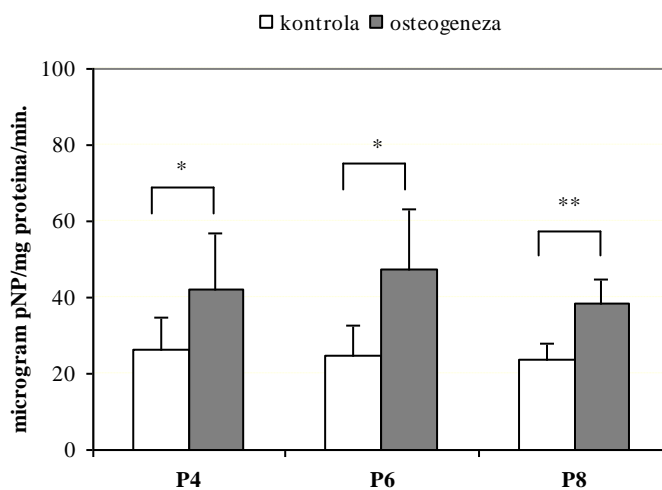
Takođe je pokazano da je nakon dve nedelje kultivacije u osteogenom medijumu, osim povećane aktivnosti alkalne fosfataze, pojačana i sinteza osteokalcina (**slika 5C**).

Nakon tri nedelje kultivacije ćelija u kontrolnom i osteogenom medijumu, bojenjem Alizarin crvenim pokazano je da se u kontrolnom medijumu nisu formirali kristali kalcijum-fosfata u ECM, dok su se u osteogenom medijumu formirali (**slike 5B i D**).

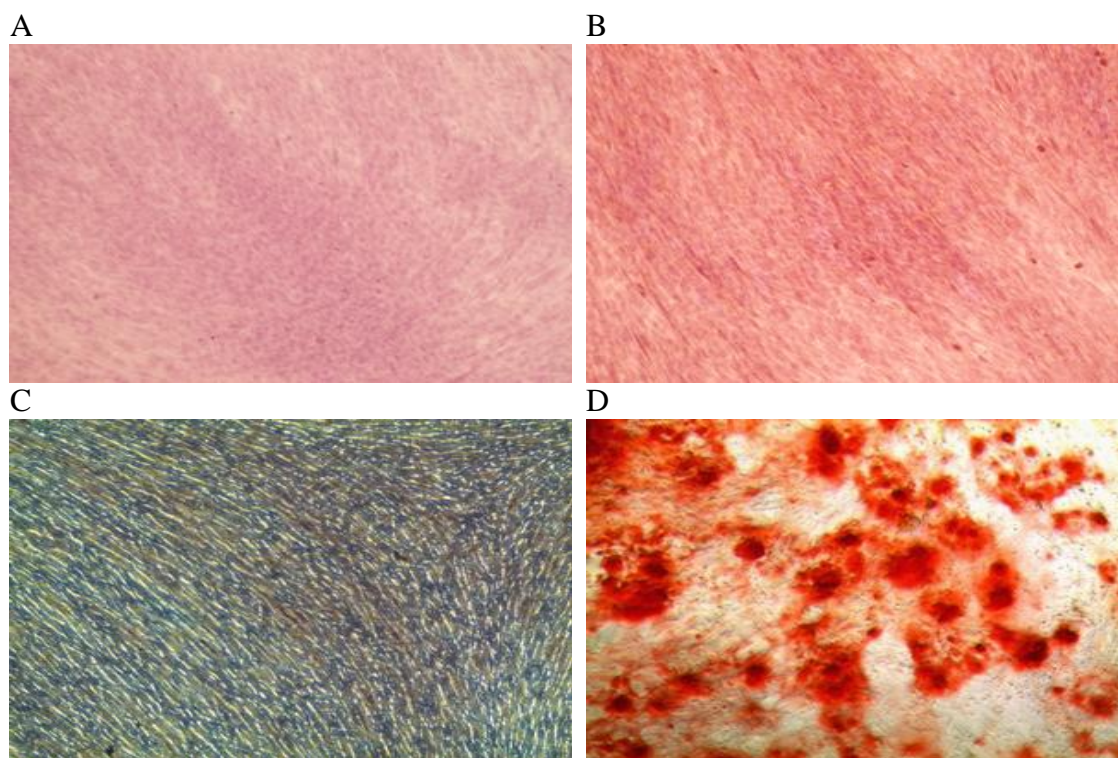
A



B



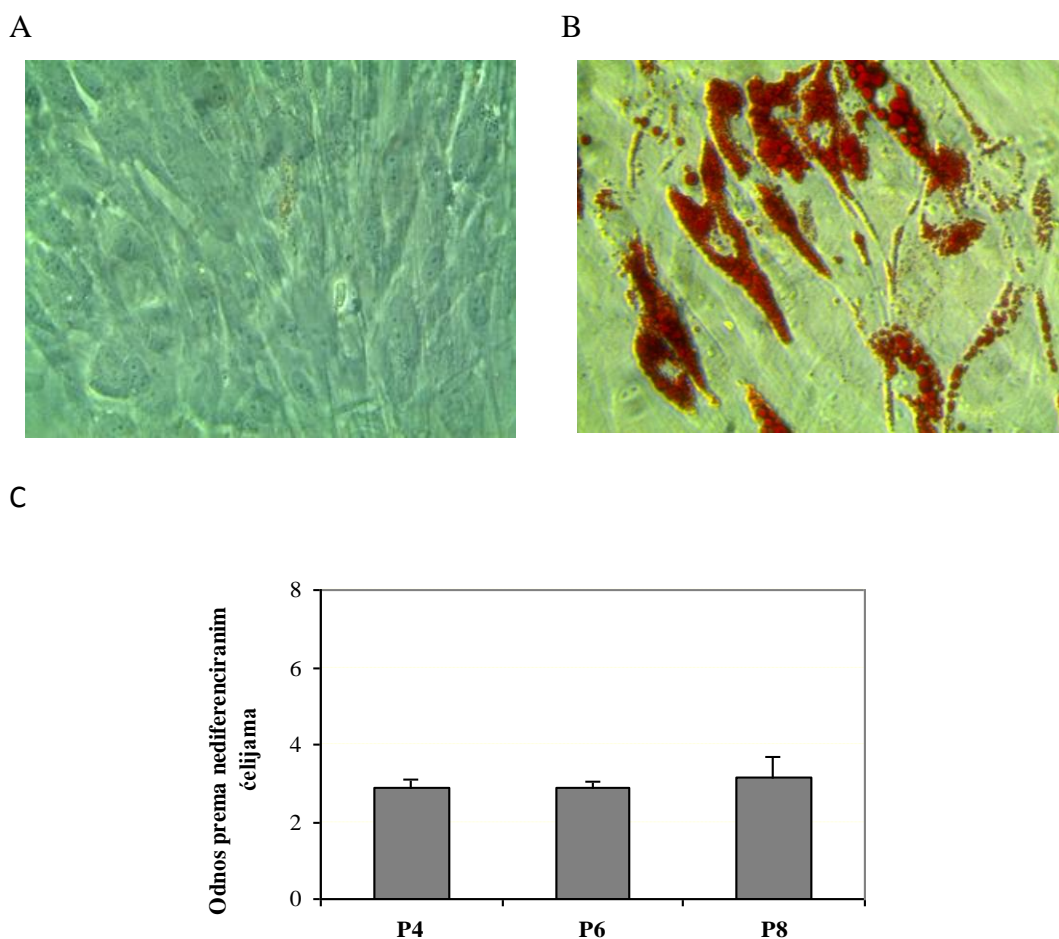
Grafikon 7. Aktivnost alkalne fosfataze u nediferenciranim i diferenciranim ćelijama nakon perioda inkubacije od A) pet i B) deset dana. Vrednosti su prikazane kao  $\bar{X} \pm SD$  (n=6). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.



Slika 5. Osteogena diferencijacija A) Konfluentne ćelije posle dve nedelje kultivacije u kontrolnom medijumu, negativne na osteokalcin. Ljubičasta boja potiče od hematoksilina (uveličanje objektiva  $\times 10$ ). B) Konfluentne ćelije posle dve nedelje kultivacije u osteogenom medijumu, pozitivne na osteokalcin. Ljubičasta boja potiče od hematoksilina, dok braon nijansa potiče od pozitivnog bojenja sa anti-humanim osteokalcin antitelima (uveličanje objektiva  $\times 10$ ). C) Konfluentne ćelije posle tri nedelje kultivacije u kontrolnom medijumu. Posle bojenja Alizarin crvenim, ekstracelularni matriks je ostao nebojen (uveličanje objektiva  $\times 10$ , invertni mikroskop) D) Konfluentne ćelije posle tri nedelje kultivacije u osteogenom medijumu. Posle bojenja Alizarin crvenim, ekstracelularni matriks je intenzivno crven zbog depozita kalcijum fosfata (uveličanje objektiva  $\times 10$ , invertni mikroskop).

### 5.7.2 Adipogena diferencijacija

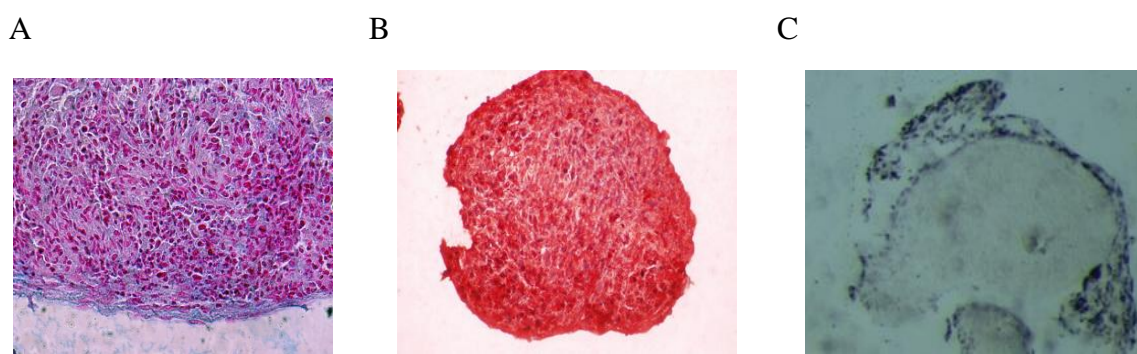
Kultivacijom ekspandiranih ćelija u adipogenom medijumu tokom tri nedelje, pokazano je da se jedan broj ćelija u P4, P6 i P8 diferencira u pravcu adipocita. Nediferencirane ćelije nisu imale uočljive masne kapljice (**grafikon 8A**). Na grafikonu **8B** se može videti da se aproksimativno jedna petina ćelija diferencirala i da ima u sebi masne kaljice. Posle eluiranja boje i merenja optičke gustine rastvora utvrđeno je da između pasaža nema značajne razlike u broju ćelija koji se diferencirao u adipocite (**grafikon 8C**).



Grafikon 8. Adipogena diferencijacija ekspandiranih ćelija. A) Oil Red O bojenje nedirenciranih ćelija. B) Oil Red O bojenje diferenciranih ćelija. C) Normalizovane vrednosti intenziteta Oil Red O boje (450 nm) prikazane kao  $\bar{X} \pm SD$  (n=6) posle tri nedelje adipogene diferencijacije u različitim pasažama.

### 5.7.3. Hondrogena diferencijacija

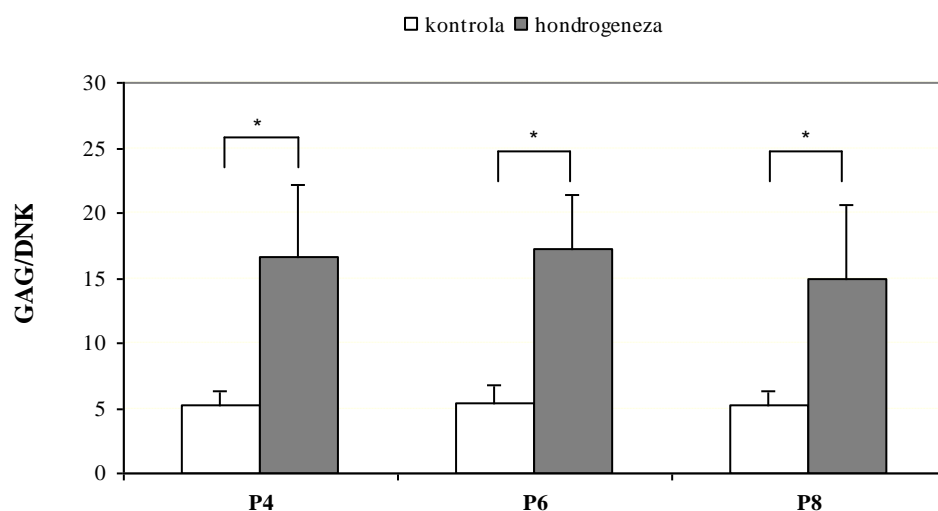
Kultivacijom ekspanziranih ćelija u hondrogenom medijumu u uslovima u kojima je gustina ćelija bila veoma visoka, već nakon dva do tri dana su se formirale trodimenzionalne pelete u kojima su se ćelije diferencirale stvarajući karakterističan ECM. Posle dve nedelje kultivacije u hondrogenom medijumu, u ECM su bili prisutni GAG (**slika 6A**) i kolagen tip 2 karakterističan za hijalinu hrskavicu (**slika 6B**). Osim toga, po obodu peleta, *in situ* hibridizacijom je pokazana ekspresija gena za kolagen tip 1 (**slika 6C**).



Slika 6. Reprezentativne pelete dobijene posle dve nedelje kultivacije  $2 \times 10^5$  ćelija (P4) u hondrogenom medijumu. A) Bojenje Alcian plavim. Glikozaminoglikani u ekstracelularnom matriksu se boje svetlo plavo. Jasno se uočavaju obojena jedra ćelija u peleti (uveličanje  $\times 20$ ). B) Crvena boja pokazuje homogenu distribuciju kolagena tip 2 u ekstracelularnom matriksu pelete (uveličanje  $\times 10$ ). C) Crna boja po obodu pelete predstavlja vizuelizovanu RNK za kolagen tip 1 (uveličanje  $\times 10$ ).

Određivanjem količine glikozaminoglikana posle digestije peleta kroz sve tri pasaže, pokazano je da postoji značajna razlika u pogledu njihove biosinteze u odnosu na ćelije gajene u kontrolnom medijumu, ali da između pasaža nema razlika (**grafikon 9**).



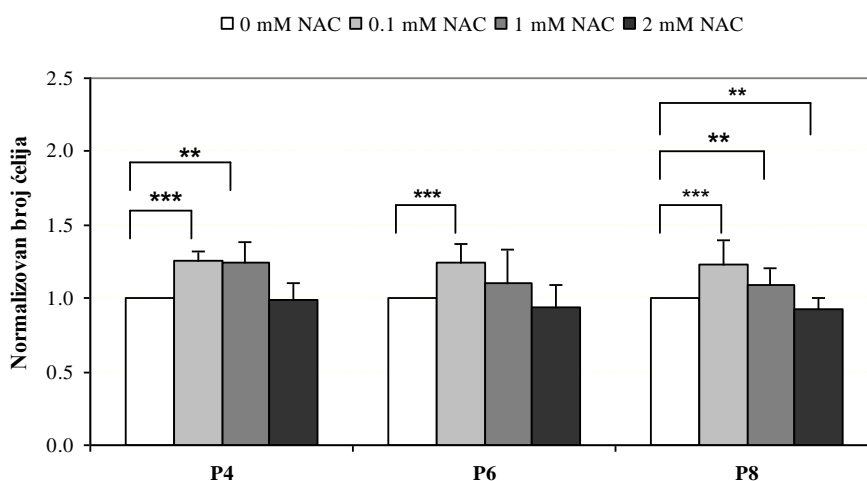


Grafikon 9. Količina glikozaminoglikana (GAG) u ekstracelularnom matriksu posle dve nedelje hondrogene diferencijacija. Količina GAG je izražena na količinu DNK. Vrednosti su prikazane kao  $\bar{X} \pm SD$  (n=6) \*p<0,05

### 5.8. Uticaj N-acetil-L-cisteina na proliferaciju ćelija u kulturi

Da bi se odredilo koja koncentracija NAC-a ima pozitivan ili negativan uticaj na proliferaciju ćelija, kulture su tretirane sledećim koncentracijama ovog molekula: 0,1 mM, 1 mM i 2 mM. Uvek je zasejavana i kontrolna kultura bez NAC-a. Efekat NAC-a na broj ćelija u kulturi je ispitivan posle 72 sata od njegovog dodavanja, dok su različiti testovi kojima je ispitivan mehanizam njegovog dejstva rađeni u različitim, kraćim, periodima po njegovom dodavanju.

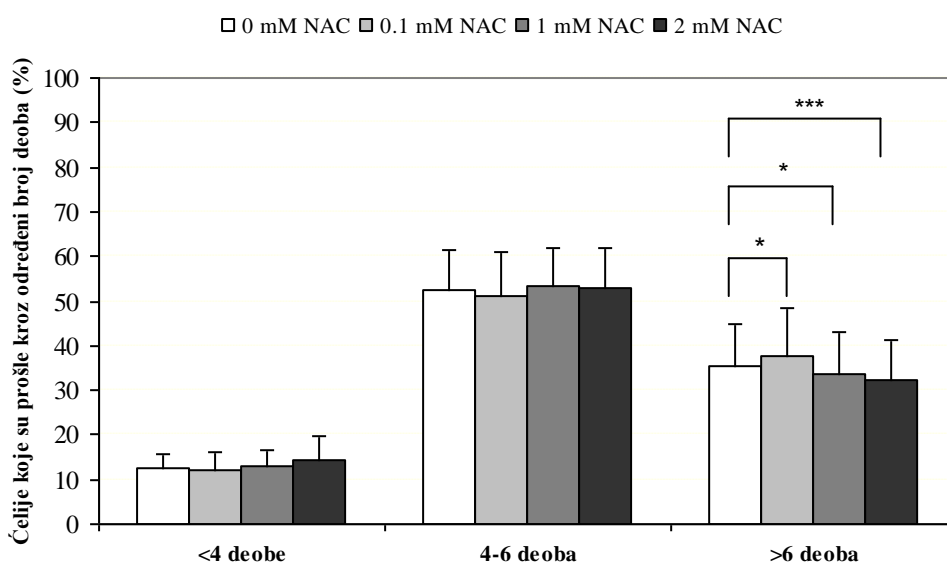
Pokazano je da 0,1 mM i 1 mM NAC značajno povećava broj ćelija u kulturi i to na istovetan način u svim ispitivanim pasažama, odnosno tokom celokupnog ispitivanog perioda (**grafikon 10**). Takođe, pokazano je da 2 mM NAC smanjuje broj ćelija u kulturi u P8 (**grafikon 10**).



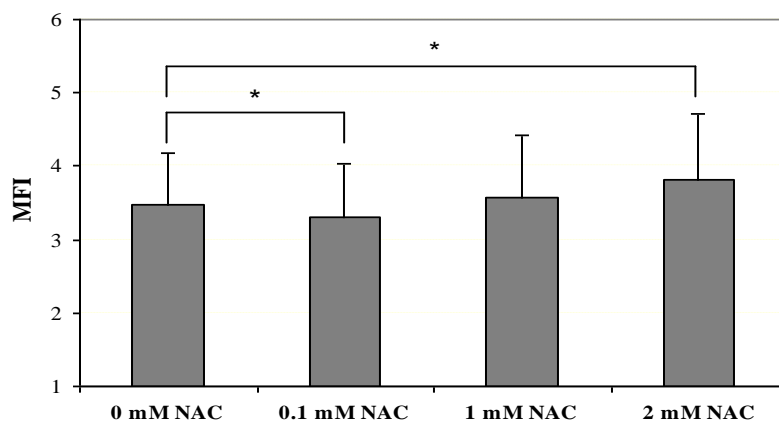
Grafikon 10. Uticaj NAC-a na broj ekspaniranih ćelija, izolovanih iz zubne pulpe, u različitim pasażama. Broj ćelija posle 72 sata kultivacije sa NAC-om je izražen kao jedinična vrednost u odnosu na zasađeni broj ćelija i prikazane kao  $\bar{X} \pm SD$  (n=6) \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

Direktan uticaj NAC-a na broj ćelijskih deoba je određivan korišćenjem CFSE-a, kao i određivanjem brzine ulaska ćelija u S fazu ćelijskog ciklusa, nakon 24 sata deprivacije seruma (gajenjem ćelija u 0.5% FCS).

CFSE bojenjem je pokazano da 0,1 mM i 1 mM NAC, u P6, značajno povećavaju broj ćelija koje su se podelile više od 6 puta, dok 2 mM značajno smanjuje njihov broj (**grafikon 11**).



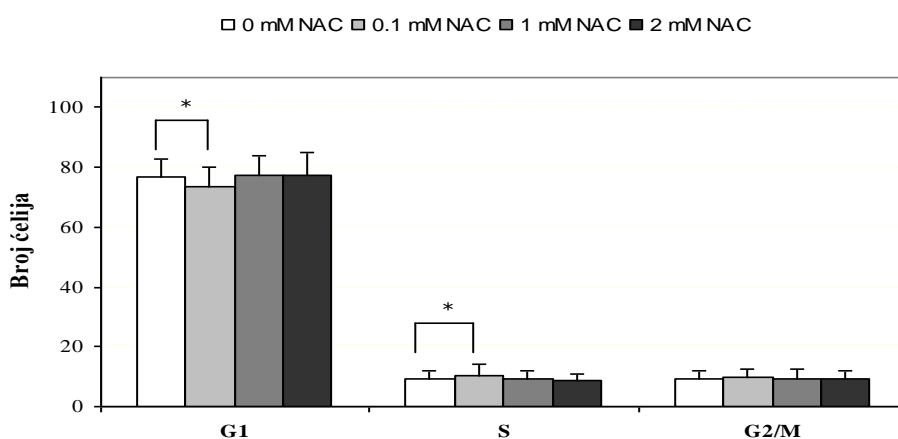
Grafikon 11. Procenat ćelija (P6) koje su prošle kroz određeni broj deoba tokom 72h. Vrednosti su prikazane kao  $\bar{X} \pm SD$  (n=12) \*p<0,05, \*\*\*p<0,001.



Grafikon 12. Srednji intenzitet fluorescence (MFI) nakon 72 sata kultivacije ćelija obojenih sa CFSE (P6), uz tretman različitim koncentracijama NAC. Vrednosti su prikazane kao  $\bar{X} \pm SD$  (n=12). \*p<0,05

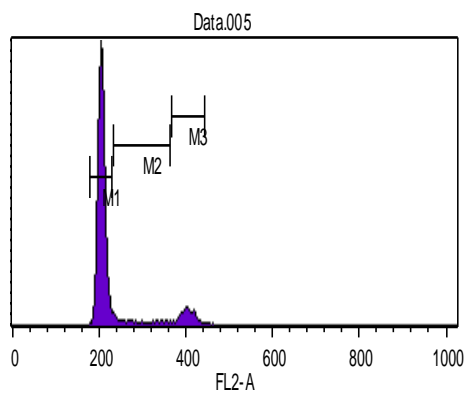
Takođe, posle 72h nakon tretmana 0,1 mM NAC-om, došlo je do značajnog smanjenja srednjeg intenziteta fluorescence (MFI) ćelija, dok je nakon tretmana 2 mM NAC-om MFI bio značajno veći u odnosu na ćelije bez NAC-a.

Analiza procenta ćelija u pojedinim fazama ćelijskog ciklusa, 12 sati posle dodavanja različitih koncentracija NAC-a, je pokazala da u kulturama sa 0,1 mM koncentracijom NAC-a, ima manje ćelija u G1 fazi, a više ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa, u odnosu na netretirane ćelije (**grafikoni 13 i 14**).

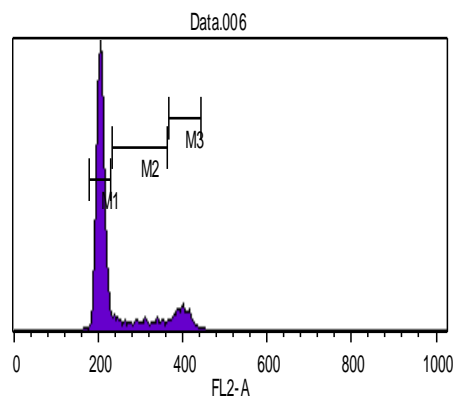


Grafikon 13. Procenat ćelija u G1, S i G2/M fazi ćelijskog ciklusa 12 sati nakon dodavanja 0,1 mM, 1 mM i 2 mM NAC. Ćelije su prethodno sinhronizovane kultivacijom u medijumu sa 0,5 % FCS tokom 24 sata. Vrednosti su prikazane kao  $\bar{X} \pm SD$  (n=12).\* p<0,05.

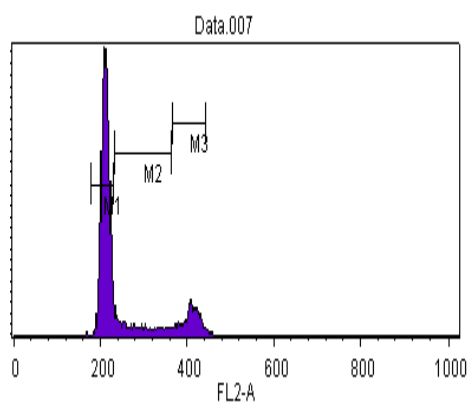
A



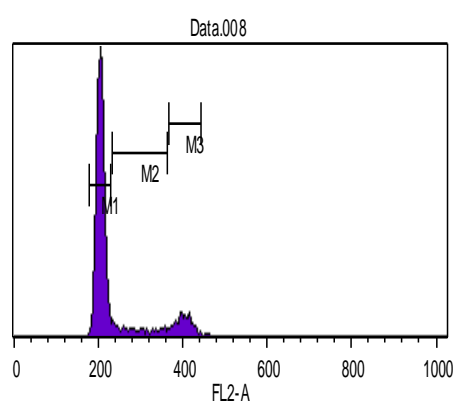
B



C



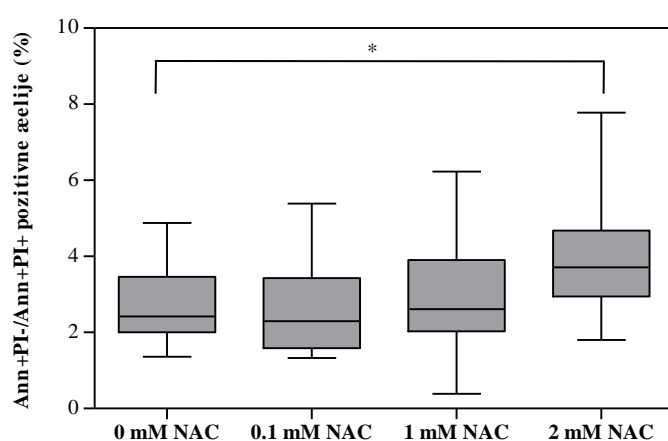
D



Grafikon 14. Reprezentativni histogrami koji prikazuju ćelije u pojedinim fazama ćelijskog ciklusa. A) Bez NAC-a. B) 0,1 mM NAC, C) 1 mM NAC, D) 2 mM NAC. Uočiti da je površina zone obeležene kao M2, koja predstavlja broj ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa, najmanja u uslovu bez NAC-a.

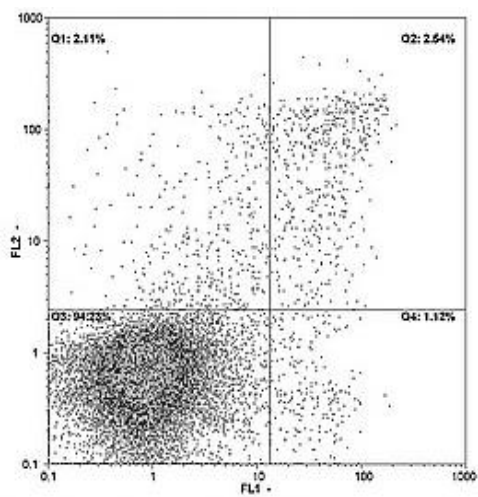
## 5.9. Uticaj N-acetil-L-cisteina na procenat ćelija u apoptozi

Analiza vijabiliteta i apoptoze u ekspandiranoj ćelijskoj populaciji pokazuje da je, posle tripsinizacije ćelija, od P4 do P8, njihov vijabilitet bio preko 95%, odnosno, pokazuje da se jako mali procenat ćelija nalazio u ranoj i kasnoj apoptozi. Prikazani rezultati predstavljaju zbirne rezultate dobijene između P4 i P8. Može se uočiti da između kultura sa i bez NAC-a nema razlike, osim što je u kulturama sa 2 mM procenat ćelija u apoptozi značajno veći (**grafikoni 15 i 16**).

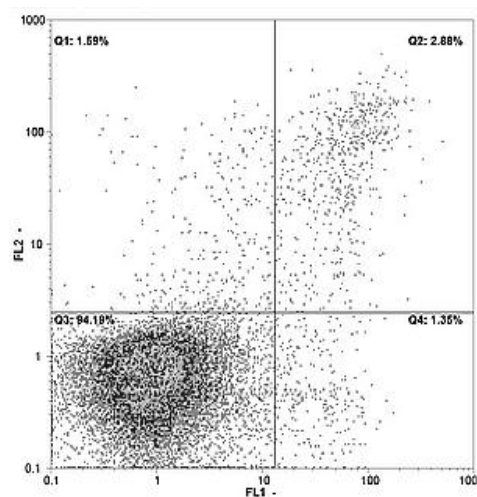


Grafikon 15. Uticaj različitih koncentracija NAC-a (nakon 24 h inkubacije) na procenat ćelija u apoptozi (ranoj i kasnoj). Vrednosti su prikazane Tukijevim (eng. Tukey) „box and whisker“ dijagramima na kojima je horizontalnom linijom prikazana medijana, pravougaonikom interkvartilni raspon, vertikalnim linijama minimum i maksimum. (n=12). \* p<0,05

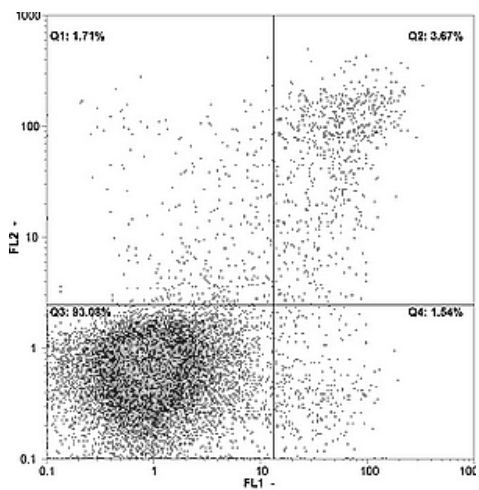
A



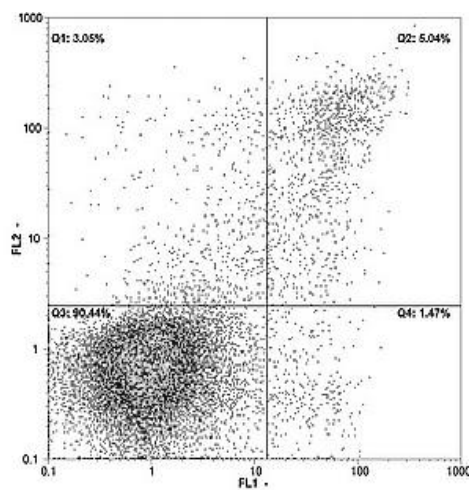
B



C



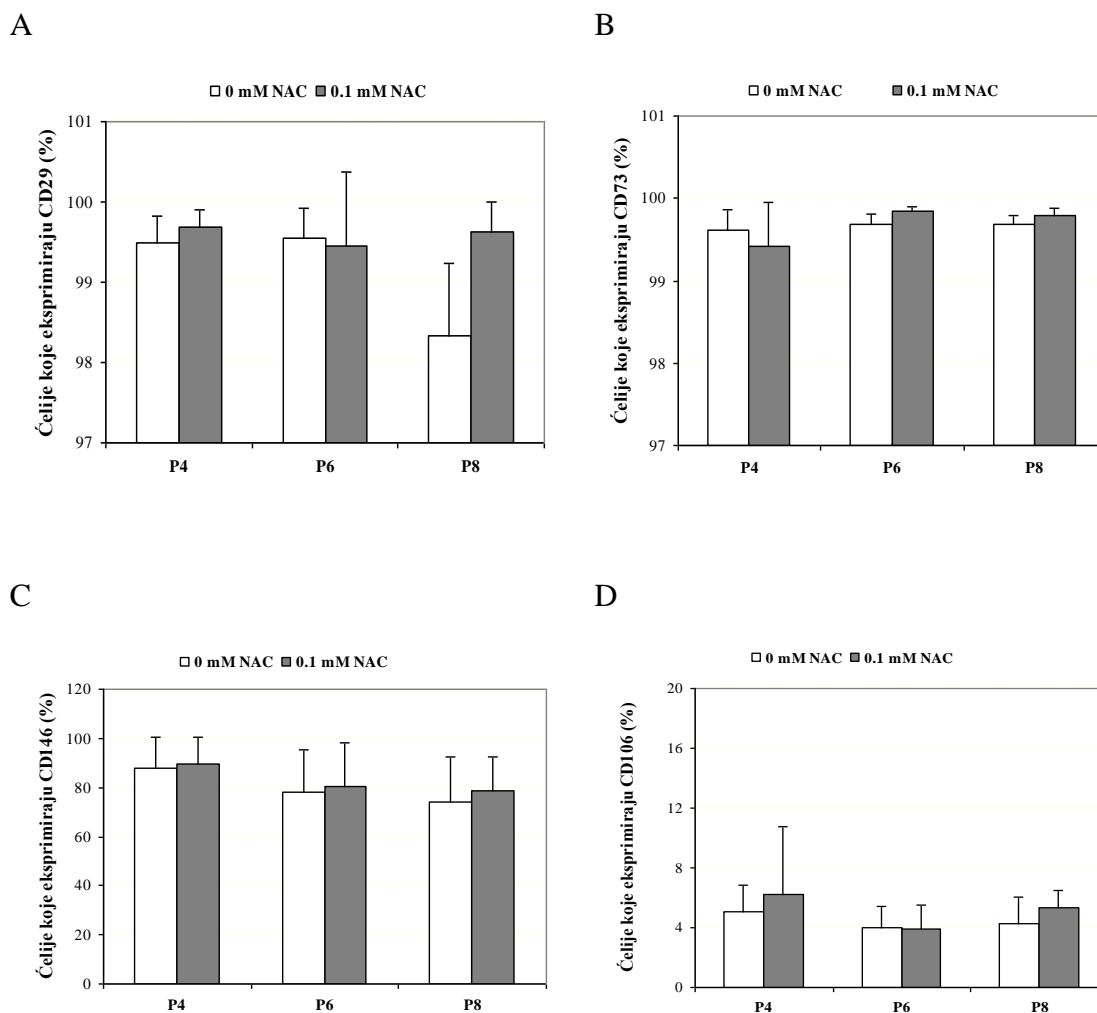
D



Grafikon 16. Reprezentativni dot-blotovi koji prikazuju uticaj različitih koncentracija NAC-a (nakon 24 h inkubacije) na procenat ćelija u apoptozi A) Bez NAC-a, B) 0,1 mM NAC, C) 1 mM NAC, D) 2 mM NAC. Uočiti da je efekat 2 mM NAC-a na procenat ćelija u apoptozi najizrazitiji

## 5.10. Uticaj N-acetil-L-cisteina na ekspresiju antigena na površini ćelija

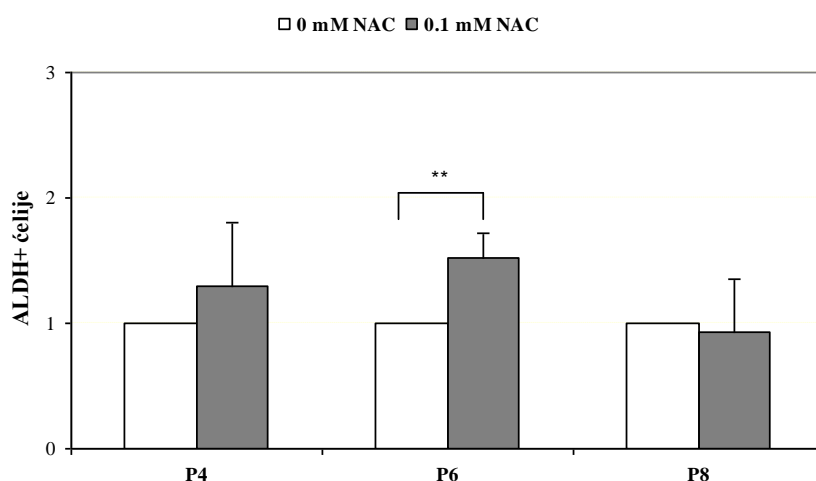
Analiza ekspresije antigena na površini ćelija je urađena samo sa 0,1 mM NAC-om. Nije utvrđena statistički značajna razlika u pogledu ekspresije ispitivanih markera (grafikon 17).



Grafikon 17. Ekspresija pojedinih površinskih antigena bez i sa 0,1 mM NAC-om. A) CD29, B) CD73, C) CD146, D) CD106. Vrednosti su prikazane kao  $\bar{X} \pm SD$  (n=6).

### 5.11. Uticaj N-acetil-L-cisteina na broj ćelija koje eksprimiraju ALDH

Naši rezultati su pokazali da je 0,1 mM NAC, nakon 72 sata kultivacije ćelija, u P6 povećavao procenat ćelija koje eksprimiraju ALDH. Opseg u kome se kretao procenat ćelija koje pokazuju povišenu aktivnost ALDH (ukupno, sa ili bez NAC-a) je bio veoma različit između pojedinih zuba i iznosio od 4,01 do 24,1 bez NAC-a, odnosno 3,15 do 34,5 sa NAC-om. Tokom P4 i P6, NAC je uticao na povećanje broja ćelija koje pokazuju pozitivnu ALDH aktivnost (ALDH+ ćelije). Značajno povećana vrednost za ALDH je pokazana u P6 (**grafikon 18**).



Grafikon 18. Odnos procenta ALDH+ ćelija između kontrole i tretmana 0,1 mM NAC-om. Vrednosti su prikazane kao  $\bar{X} \pm SD$  (n=6). \*\*p<0,01

Uzorci populacije ćelija koje su imale veći procenat ALDH+ ćelija pokazivali su kraće vreme duplikacije (**tabela 1**).

Tabela 1. Broj ćelija koje eksprimiraju ALDH i vreme udvajanja u kulturi

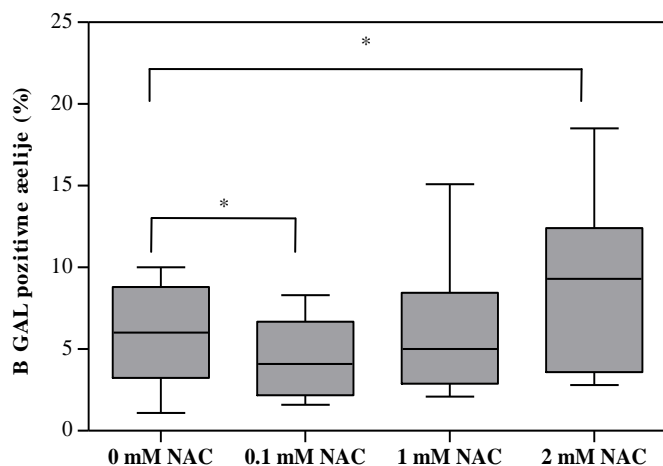
|                    | ALDH (%)         | PDT (sati)         |
|--------------------|------------------|--------------------|
| Medijana (min-max) | 7.1 (4.0 - 24.1) | 23.3 (19.2 - 28.5) |
| ALDH/PDT           |                  | <b>r= - 0.7**</b>  |

Vrednosti aldehid-dehidrogenaze (ALDH) i vremena udvajanja ćelija u kulturi (PDT) nalaze se u negativnoj korelaciji. \*\*p<0,01



## 5.12. Uticaj N-acetil-L-cisteina na aktivnost $\beta$ -galaktozidaze

Daljim ispitivanjem testiran je efekat NAC-a na aktivnost SA- $\beta$ -Gal. Prethodnim eksperimentima je pokazano da se njegova aktivnost tokom ekspanzije ćelija od P4 do P8 ne menja značajno. Ćelije su tretirane NAC-om u P8 u trajanju od 72 sata. Pokazano je da je 0,1 mM NAC značajno smanjio procenat ćelija kod kojih se može detektovati SA- $\beta$ -Gal, dok je 2 mM NAC doveo do povećanja procenta ovih ćelija (**grafikon 19**).



Grafikon 19. Uticaj različitih koncentracija NAC-a (nakon 72 h inkubacije) na procenat ćelija koje su SA- $\beta$ -Gal pozitivne. Vrednosti su prikazane Tukijevim (eng. Tukey) „box and whisker“ dijagramima na kojima je horizontalnom linijom prikazana medijana, pravougaonikom interkvartilni raspon, vertikalnim linijama minimum i maksimum (n=12).\* p<0.05

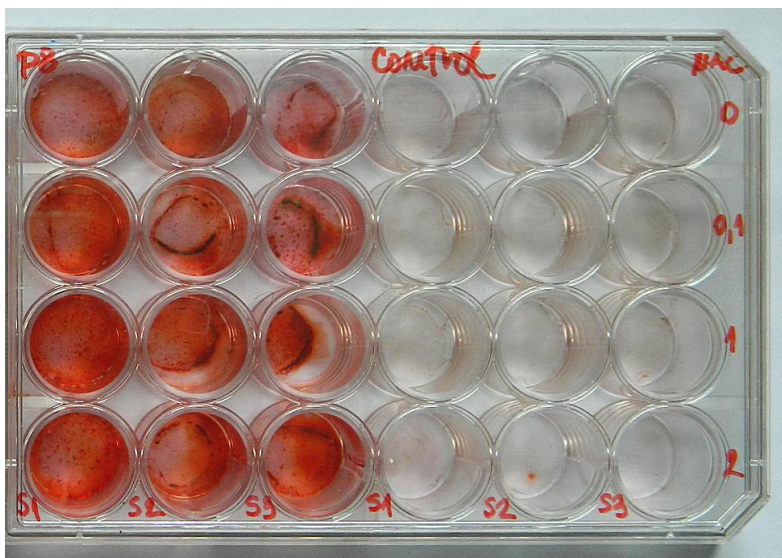
### 5.13. Uticaj N-acetil-L-cisteina na diferencijaciju ćelija izolovanih iz pulpe zuba

#### 5.13.1. Uticaj N-acetil-L-cisteina na osteogenu diferencijaciju

**Osteogena diferencijacija:** Nakon pretretmana NAC-om u trajanju od 72 sata ćelije su gajene u kontrolnom, odnosno osteogenom medijumu. Nakon pet i deset dana, kvantifikovana je aktivnost alkalne fosfataze, a nakon tri nedelje je deponovanje kalcijum-fosfata dokazivano bojenjem Alizarin crvenim.

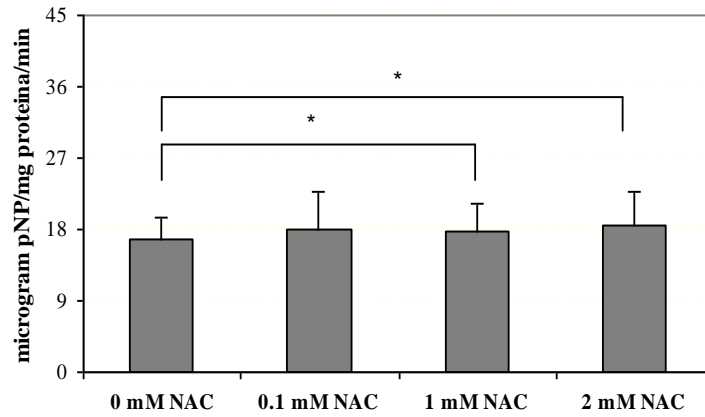
Nakon pretretmana NAC-om u trajanju od 72 sata, ćelije su dostigle konfluencu. Posle pet dana kultivacije u osteogenom medijumu, pokazano je da kulture pretretirane sa 1 i 2 mM NAC-om imaju povećanje aktivnosti AP u odnosu na kultivaciju u osteogenom medijumu bez pretretmana (**grafikon 20A**). Desetog dana kultivacije u osteogenom medijumu, efekat pretretmana 1 mM i 2 mM NAC-om se i dalje održava (**grafikon 20B**).

Na slici 7 je prikazana jedna ploča od 26 polja sa kombinacijom svih primenjenih uslova tokom osteogene diferencijacije (P6) kao i kontrolne kulture.

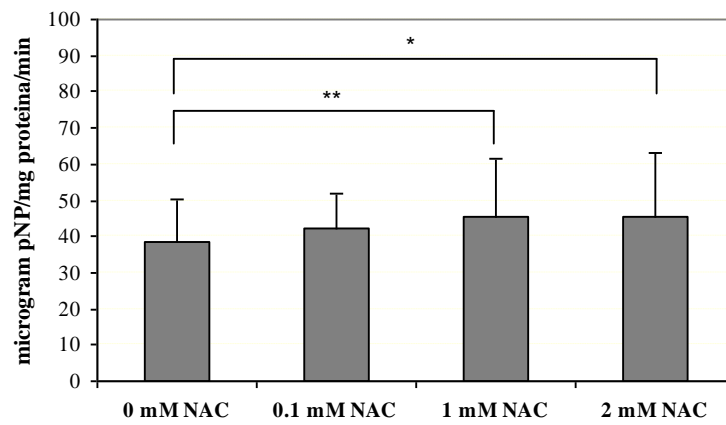


Slika 7. Alizarin Red bojenje tokom osteogene diferencijacije. Kontrolne kulture gajene u DMEM/F12 10% FCS su sasvim desno. Kulture bez i sa 0,1, 1 i 2 mM NAC-om su postavljene odozgo na dole. Uočiti da je intenzitet boje Alizarin crvenog najslabiji bez pretretmana NAC-om, a najjači sa 2 mM NAC-om.

A



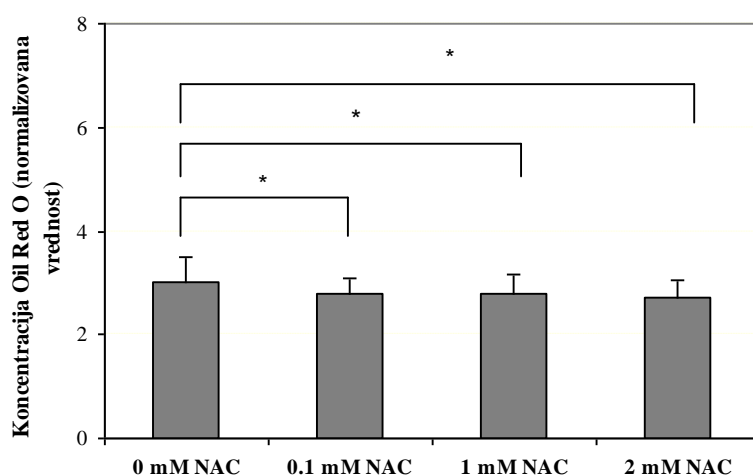
B



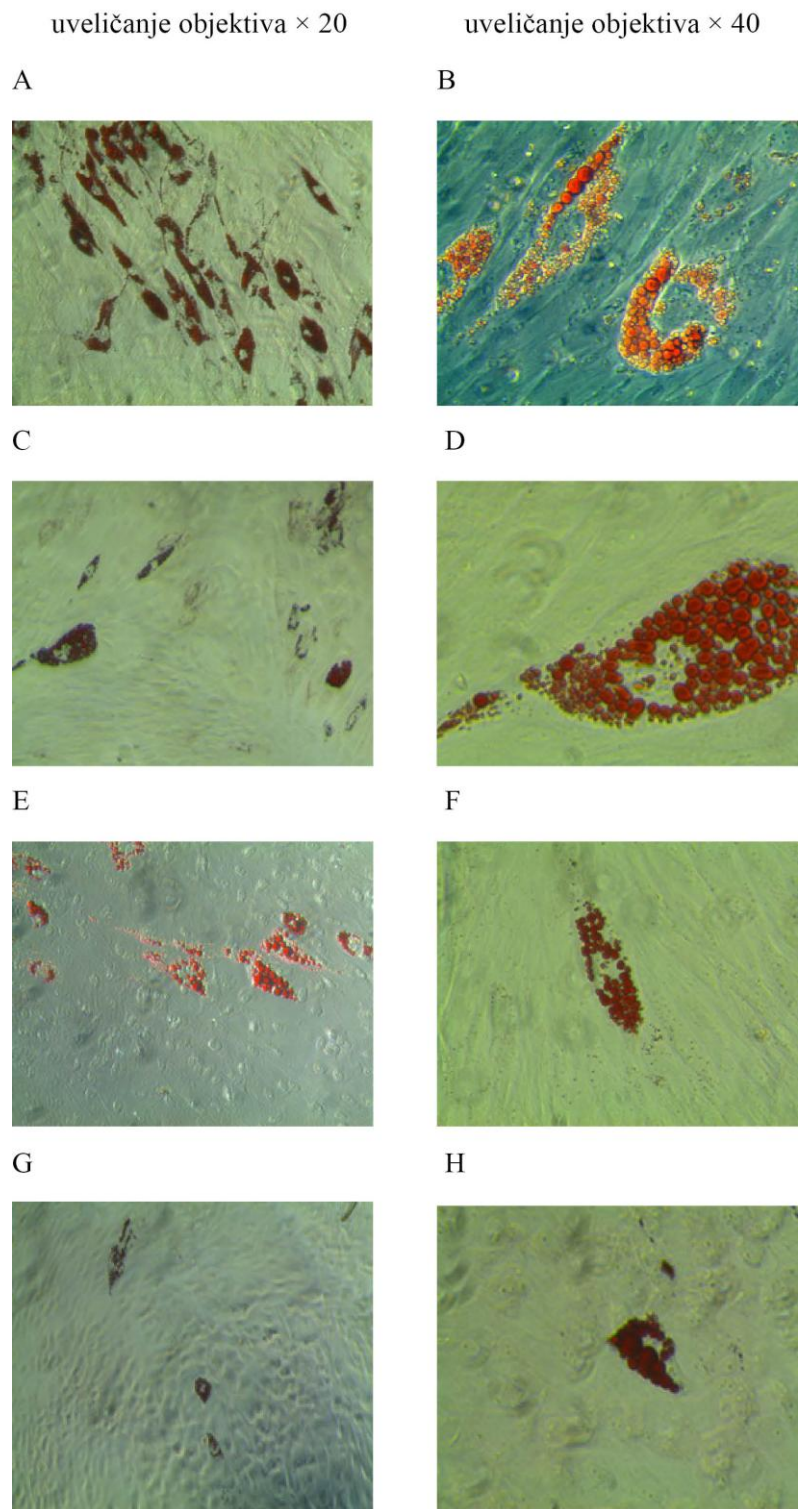
Grafikon 20. Aktivnost alkalne fosfataze nakon A (5 dana) i B (10 dana) kultivacije bez i sa različitim koncentracijama NAC-a. Vrednosti su prikazane kao  $\bar{X} \pm SD$  (n=12), \*p<0.05, \*\*p<0.01

### 5.13.2. Uticaj N-acetil-L-cisteina na adipogenu diferencijaciju

Da bi pokazali efekat različitih koncentracija NAC-a na adipogenezu, ćelije su pretretirane sa NAC-om 72 sata i nakon toga je dodat adipogeni medijum u trajanju od tri nedelje. Kvantifikacijom Oil red O bojenja, pokazano je da pretretman NAC-om u sve tri koncentracije značajno inhibira formiranje lipidnih kapljica (**grafikon 21**). Osim toga, pokazano je da se i broj diferenciranih ćelija smanjuje (**slika 8A-H**).



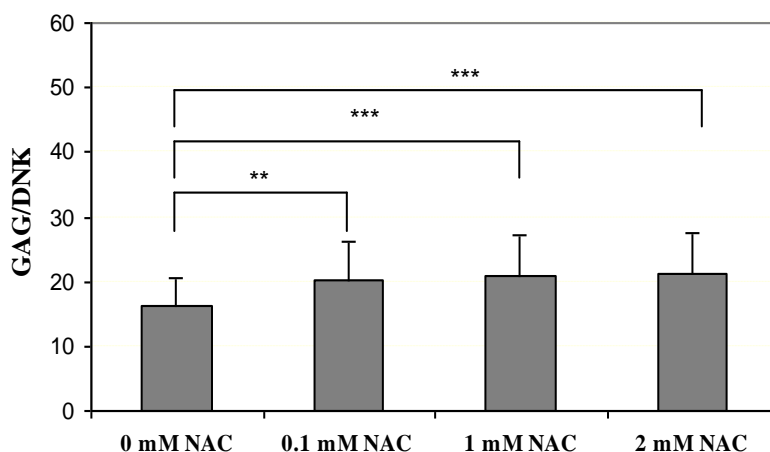
Grafikon 21. Intenzitet Oil Red O boje posle njenog eluiranja iz masnih kapljica. Uočiti da se sa povećanjem koncentracije NAC-a, smanjuje intenzitet boje. Vrednost Oil Red O je normalizovana na vrednosti kontrolnog uzorka i prikazana kao  $\bar{X} \pm SD$  (n=12). \*p<0.05



Slika 8. Oil Red O bojenje ćelija diferenciranih u pravcu adipogeneze, sa različitim koncentracijama NAC-a. A i B) bez NAC-a; C i D) 0,1 mM NAC; E i F) 1 mM NAC; G i H) 2 mM NAC. Uočiti smanjenje broja diferenciranih ćelija sa povećanjem koncentracije NAC.

### 5.13.3. Uticaj N-acetil-L-cisteina na hondrogenu diferencijaciju

Nakon pretremana NAC-om u trajanju od 72 sata i zasejavanja ćelija u formi peleta u hondrogeni, odnosno kontrolni medijum, evaluiran je uticaj NAC-a na hondrogenu diferencijaciju ekspandiranih ćelija. Nakon dve nedelje, pelete su digestirane i određena je koncentracija GAG. Pokazano je da se sa povećanjem koncentracije NAC-a povećava i količina stvorenih GAG, odnosno da je stimulirano stvaranje ECM (**grafikon 22**). Pelete nastale u različitim uslovima kultivacije su se bojile Alcian plavim i sadržale su kolagen tip 2, ali rezultati nisu prikazani jer se svetlosnom mikroskopijom nije videla razlika između pojedinih uslova.



Grafikon 22. Koncentracija glikozaminoglikana (GAG) u peletama formiranim od ćelija koje su pretretirane različitim koncentracijama NAC-a. Koncentracija GAG je izražena na koncentraciju DNK. Vrednosti su prikazane kao  $\bar{X} \pm SD$  (n=12). \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001

## 5.14. Određivanje oksidativnog oštećenja lipida i proteina

Osnovni poznati efekat NAC-a *in vitro* je njegovo antioksidativno delovanje. Kako bismo proverili kako NAC utiče na stepen oksidativnog oštećenja i na antioksidativnu zaštitu u opisanim uslovima, u kulturi ćelija, ispitali smo stepen lipidne peroksidacije, stepen oksidativnog oštećenja proteina preko nivoa karbonilnih grupa, redoks status u ćeliji na osnovu koncentracije tiolnih (-SH) grupa, kao i aktivnost enzimskih antioksidanata, superoksid-dismutaze (SOD) i katalaze (CAT).

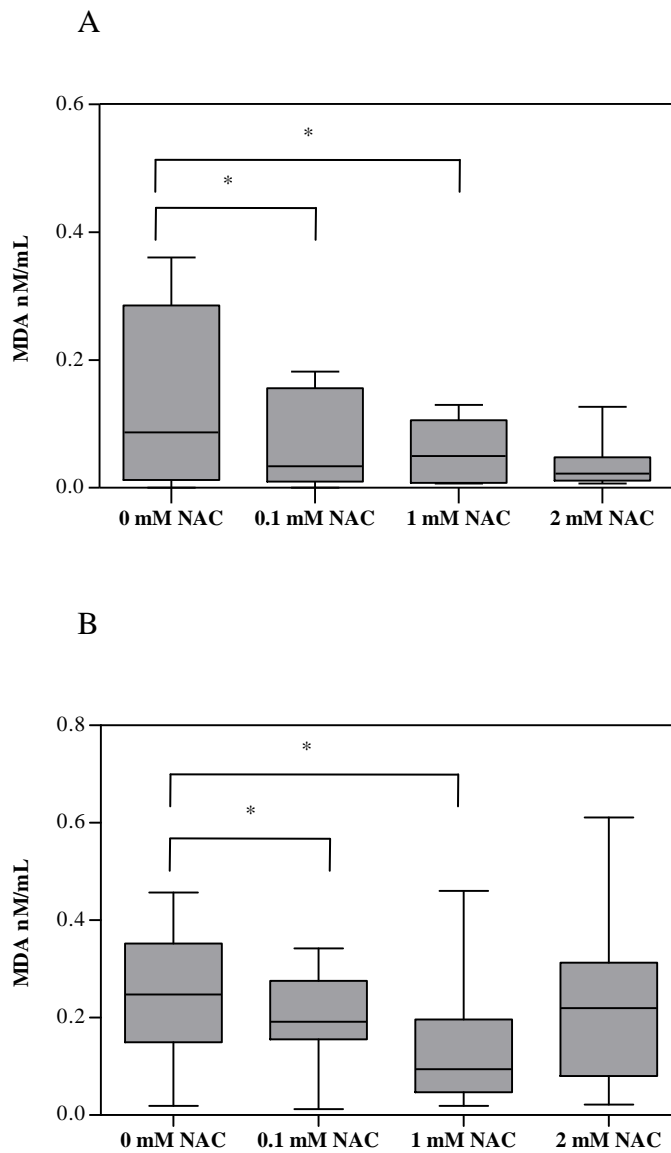
### 5.14.1. Stepen lipidne peroksidacije

Stepen lipidne peroksidacije je određen na osnovu koncentracije malondialdehida (MDA) kao i na osnovu promena u profilu masnih kiselina.

Nakon 24 sata tretmana, NAC je dozno zavisno smanjivao koncentraciju MDA, odnosno stepen lipidne peroksidacije, pri čemu je taj efekat bio značajan sa 0,1 i 1 mM NAC-om (**grafikon 23A**). Efekat na smanjenje koncentracije MDA pod dejstvom 0,1 i 1 mM NAC-a se održao i posle 48 sati kultivacije (**grafikon 23B**), na istom nivou statističke značajnosti ( $p < 0,05$ ).

### 5.14.2. Profil masnih kiselina

Pokazano je da se nakon tretmana NAC-om smanjenjuje zastupljenost MUFA (0,1 i 2 mM NAC), a povećava zastupljenost ukupnih i n-6 PUFA (0,1 mM i 1 mM NAC) u ukupnom lipidnom ekstraktu (**tabela 2**). Promena se pre svega odnosi na povećanje linolne (LA) i dokosaheksaenske masne kiseline (DHA), dok je zastupljenost arahidonske kiseline ostala nepromenjena (**tabela 2**). Tretman 2 mM NAC-om je doveo do povećanja LA i n-6 PUFA, ali to povećanje nije bilo statistički značajno zbog velikih varijacija između populacija ćelija iz različitih zuba. Urađeni su i masno-kiselinski profili korišćenog seruma, gde je pokazano da je zastupljenost SFA, MUFA i PUFA 41,92%; 28,37% i 29,71%.



Grafikon 23. Koncentracija malondialdehida (MDA) nakon A (24 sata) i B (48 sati) tretmana različitim koncentracijama NAC-a. Vrednosti su prikazane Tukijevim (eng. Tukey) „box and whisker“ dijagramima na kojima je horizontalnom linijom prikazana medijana, pravougaonikom interkvartilni raspon, vertikalnim linijama minimum i maksimum (n=9), \*p<0,05



Tabela 2. Uticaj različitih koncentracija NAC-a na masnokiselinske profile ukupnih lipida

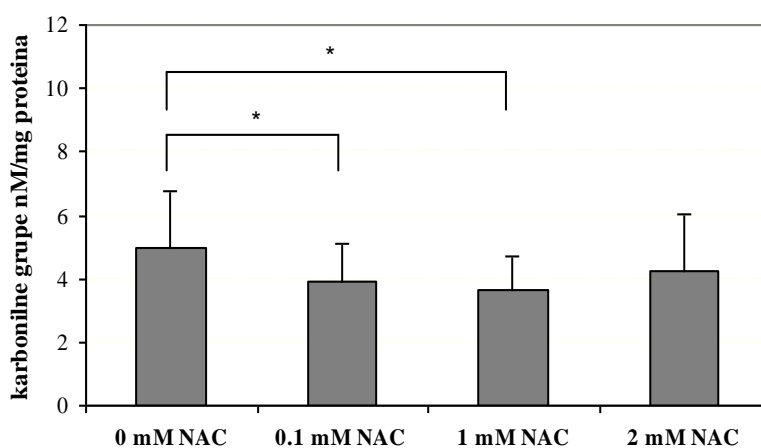
|             | <i>0 mM NAC</i>   | <i>0,1 mM NAC</i>    | <i>1 mM NAC</i>    | <i>2 mM NAC</i>   |
|-------------|-------------------|----------------------|--------------------|-------------------|
| 16:0        | 21.93±0.99        | 22.05± 0.85          | 24.02±0.45*        | 23.31±0.90*       |
| 16:1        | 7.02±1.06         | 5.99±0.65            | 4.74±1.30          | 5.90±2.12         |
| 18:0        | 18.27±1.88        | 19.39±0.84           | 19.15±1.15         | 19.66±1.06        |
| 18:1 n9     | 27.03±1.74        | 23.80±2.08*          | 24.50±0.49         | 24.50±1.64*       |
| 18:1 n7     | 4.42±0.21         | 5.63±1.06            | 5.19±0.59          | 5.36±1.02         |
| <b>18:2</b> | <b>7.36±0.51</b>  | <b>8.20±0.81*</b>    | <b>8.23±1.12</b>   | <b>8.53±2.84</b>  |
| 20:3        | 1.39±0,14         | 1.80±0.38            | 1.66±0.25          | 1.72±0.27*        |
| 20:4        | 4.05±0.05         | 4.40±0.30            | 4.18±0.48          | 3.92±0,15         |
| 22:4        | 2.80±0,14         | 2.70±0.31            | 2.52±0,15*         | 2.24±0.97         |
| 22:5        | 2.65±0.53         | 2.64±0.48            | 2.42±0.53          | 2.36±0.45         |
| <b>22:6</b> | <b>2.98±0.20</b>  | <b>3.29±0.26*</b>    | <b>3.39±0.46</b>   | <b>2.49±0.27</b>  |
| SFA         | 40.20±2.49        | 41.44±1.56           | 43.17±0.81         | 42.97±1.47        |
| MUFA        | 38.47±2.68        | 35.42±1.49*          | 34.42±1.18         | 35.76±3.15*       |
| <b>PUFA</b> | <b>21.22±1.07</b> | <b>23.03±1.05*</b>   | <b>22.41±1.83*</b> | <b>21.27±2.57</b> |
| n-3         | 5.63±0.73         | 5.94±0.73            | 5.81±0.82          | 4.85±0.61         |
| <b>n-6</b>  | <b>15.59±0.36</b> | <b>17.09±0.32***</b> | <b>16.59±1.08</b>  | <b>16.42±2.43</b> |

Vrednosti su prikazane kao  $\bar{X} \pm SD$  (n=6) \*p<0,05, \*\*\*p<0,001

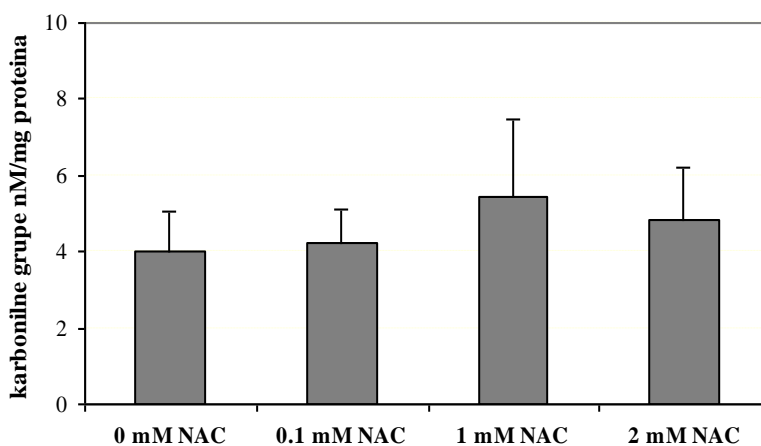
### 5.14.3. Sadržaj karbonilnih grupa

Dvadeset četiri sata posle tretmana 0,1 i 1 mM NAC-om, pokazano je značajno smanjenje sadržaja karbonilnih grupa (**grafikon 24A**). Međutim, 48 sati nakon tretmana, efekat NAC-a na pad sadržaja karbonilnih grupa se nije održao, već je došlo do njihovog blagog povećanja (**grafikon 24B**).

A



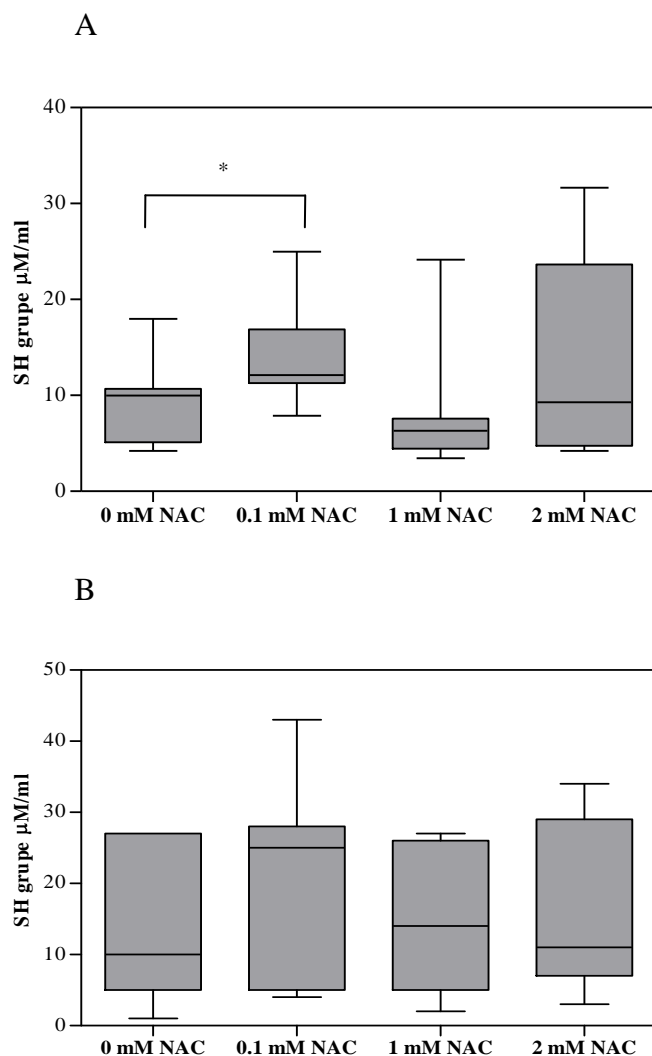
B



Grafikon 24. Koncentracija karbonilnih grupa, A (24 sata) i B (48 sati) nakon tretmana različitim koncentracijama NAC-a. Vrednosti su prikazane kao  $\bar{X} \pm SD$  (n=9), \*p<0,05

#### 5.14.4. Sadržaj -SH grupa

Iako je NAC, značajan izvor -SH grupa kao i donor cisteina za sintezu glutationa, efekat na sadržaj -SH grupa je bio varijabilan. Nakon 24 sata, koncentracija NAC-a od 0,1 mM je značajno povećala sadržaj -SH grupa. Sadržaj -SH grupa je pokazao tendenciju smanjenja nakon tretmana 1 mM NAC-om, nezavisno od vremena kada je određivan, dok je 2 mM NAC nakon 24 i 48 sati blago povećavao broj -SH grupa (**grafikoni 25A i 25B**)



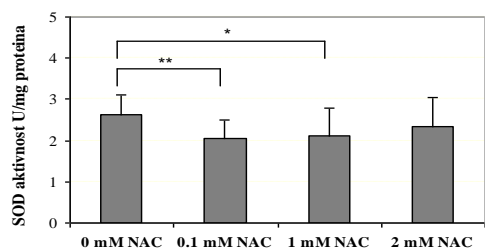
Grafikon 25. Sadržaj tiolnih grupa: A (24), B (48 sati) nakon tretmana različitim koncentracijama NAC-a. Vrednosti su prikazane Tukijevim „box and whisker“ dijagramima (n=9). \* $p < 0,05$

#### 5.14.5. Aktivnost enzimskih antioksidanata: superoksid-dismutaze i katalaze

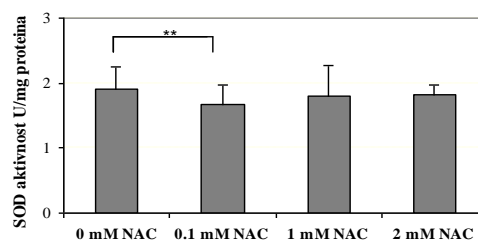
Naši rezultati pokazuju da se, 24 sata nakon tretmana sa 0,1 mM i 1 mM NAC-om, aktivnost ukupne SOD smanjuje, dok se sa 2 mM NAC-om nije detektovala promena aktivnosti ovog enzima (**grafikon 26A**). Posle 48 sati značajan je ostao jedino efekat 0,1 mM NAC-a (**grafikon 26B**). Kada je ukupna aktivnost SOD prikazana kao aktivnost citoplazmatske (Cu,Zn-SOD) i mitohondrijalne (Mn-SOD) superoksid-dismutaze, uočava se da 0,1 mM NAC smanjuje aktivnost Cu,Zn-SOD (**grafikoni 26C i D**), dok 1 i 2 mM NAC smanjuju aktivnost Mn-SOD posle 24 i 48 sati tretmana (**grafikoni 26E i F**).

Nakon 24 sata od tretmana 0,1 i 1 mM NAC-om, aktivnost katalaze se smanjivala (Grafikon 27A), dok je posle 48 sati samo efekat 0,1 mM NAC na smanjenje aktivnosti ovog enzima bio značajan (**grafikon 27B**).

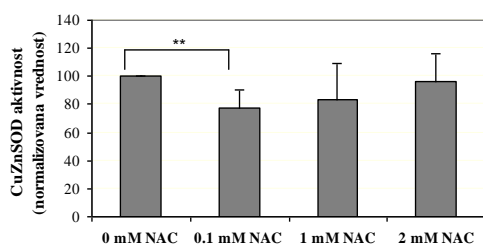
A 24 sata



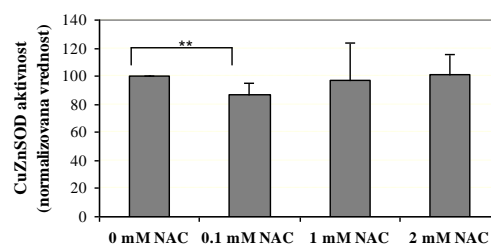
B 48 sati



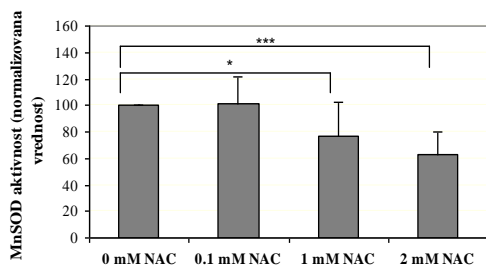
C



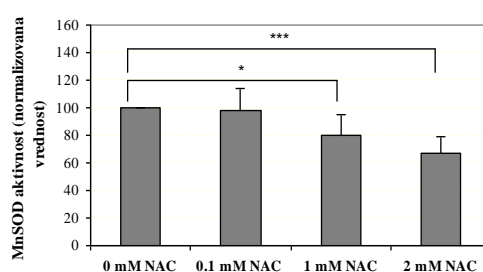
D



E

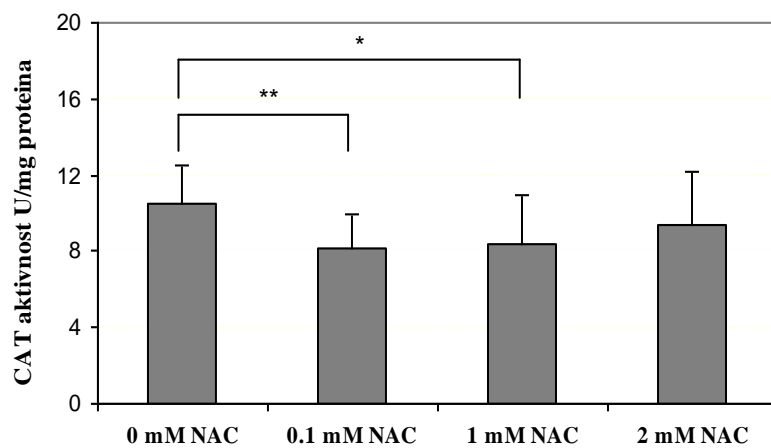


F

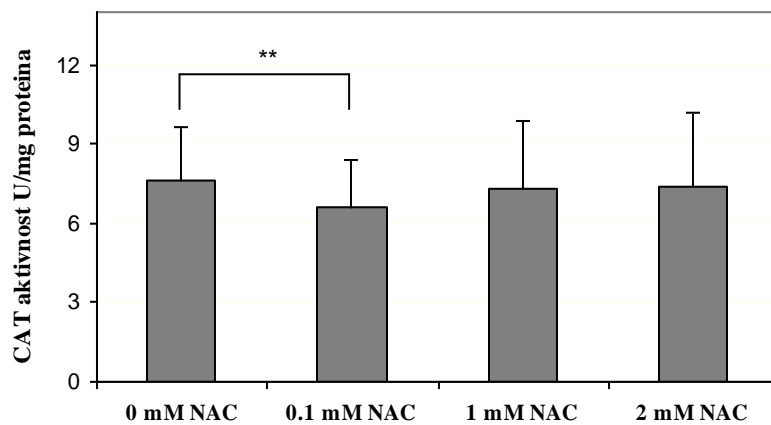


Grafikon 26. Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) posle tretmana razliĉitim koncentracijama NAC-a A) aktivnost ukupne SOD posle 24 sata B) aktivnost ukupne SOD posle 48 sati; C) aktivnost Cu,Zn-SOD posle 24 sata; D) aktivnost Cu,Zn-SOD posle 48 sati E) aktivnost Mn-SOD posle 24 sata; F) aktivnost Mn-SOD posle 48 sati. Vrednosti su prikazane kao  $\bar{X} \pm SD$  (n=9), \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001

A



B



Grafikon 27. Aktivnost katalaze (CAT) A (24 sata) i B (48 sati) posle tretmana različitim koncentracijama NAC-a. Vrednosti su prikazane kao  $\bar{X} \pm SD$  (n=9), \*p<0,05, \*\* p<0,01

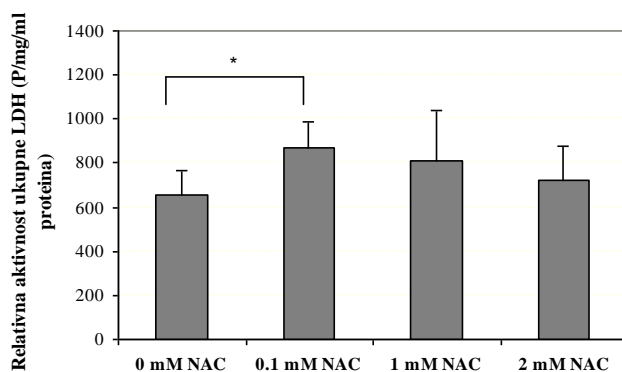
### 5.15. Uticaj NAC-a na ekspresiju HIF-1 $\alpha$

Procenat ćelija koji je ekspimirao HIF-1 $\alpha$  je bio podjednak posle dodavanja NAC-a kao i bez NAC-a, pa je to razlog zašto rezultati nisu prikazani.

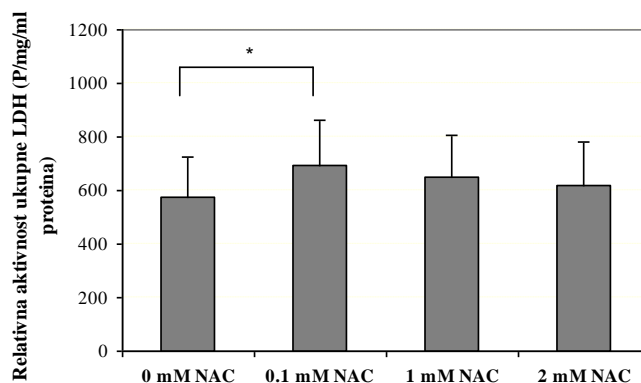
### 5.16. Uticaj NAC-a na relativnu aktivnost ukupne LDH i relativnu zastupljenost LDH izoformi

Naši rezultati pokazuju da relativna aktivnost laktat-dehidrogenaze (LDH) nakon 24 i 48 sati posle tretmana 0,1 mM NAC-om, porasla. Koncentracije od 1 i 2 mM NAC su imale samo blag pozitivan efekat na povećanje relativne aktivnosti LDH (**grafikon 28**).

A



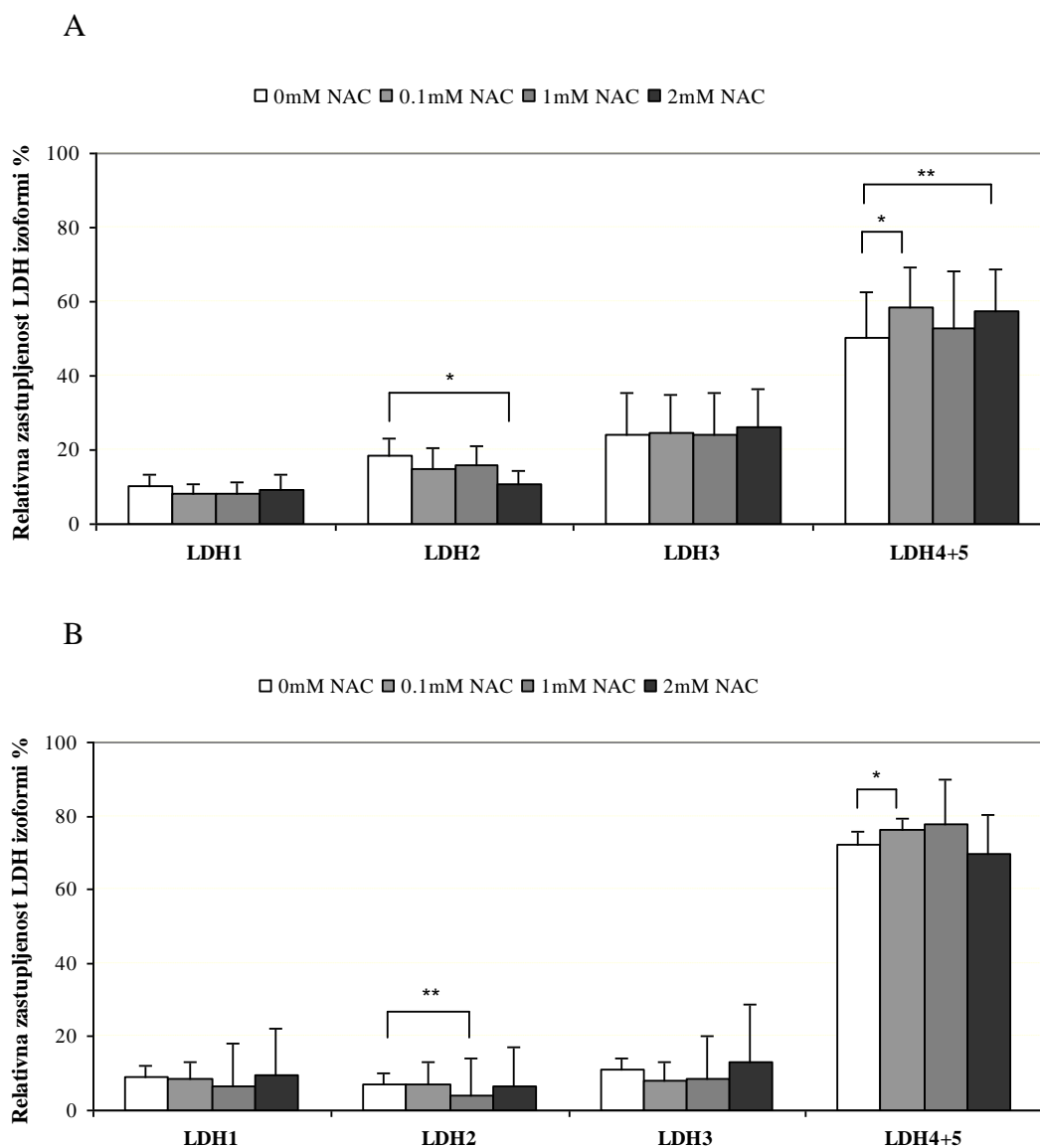
B



Grafikon 28. Relativna aktivnost ukupne LDH izražena kao površina (P) na gelu / koncentracija proteina, posle A (24 sata) i B (48 sati) tretmana različitim koncentracijama NAC-a. Vrednosti su prikazane kao  $\bar{X} \pm SD$  (n=9), \*p<0,05

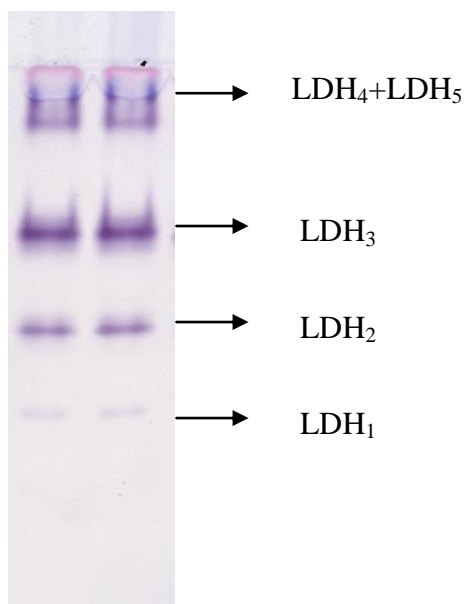
Posle razdvajanja izoenzimskih oblika LDH nativnom elektroforezom (**slika 9**), može se uočiti da nakon 24-časovnog tretmana 2 mM NAC-om, relativna aktivnost LDH<sub>2</sub>

opada, dok nakon tretmana 0,1 mM i 2 mM NAC-om, relativna aktivnost izoenzimskih oblika 4 i 5 (zbirno) raste. Nakon 48 sati tretmana 1 mM NAC-om, relativna zastupljenost LDH<sub>2</sub> opada, a nakon tretmana 0,1 mM raste relativna aktivnost izoenzimskih oblika 4 i 5 (**grafikon 29**).



Grafikon 29. Relativna zastupljenost LDH izoformi izražena u procentima, A (nakon 24 sata), B (48 sati) tretmana različitim koncentracijama NAC-a. Vrednosti su prikazane kao  $\bar{X} \pm SD$  (n=9), \*p<0,05, \*\* p<0,01

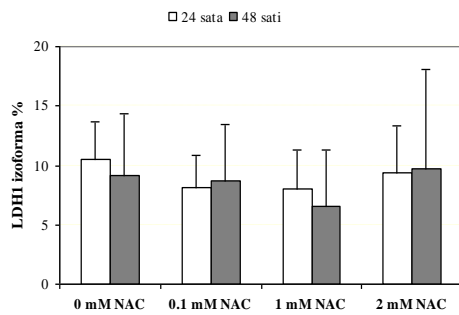




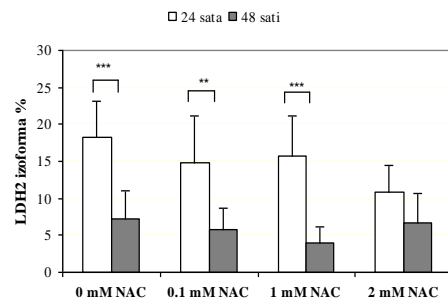
Slika 9. Nativna elektroforeza LDH<sub>1-5</sub>. Reprezentativan uzorak u P6 (D15 kontrolni uzorak, bez tretmana NAC-om) nakon 24 sata od zasejavanja ćelija.

Kada se uporede relativne zastupljenosti LDH izoformi nakon 24 i 48 sati, uočavaju se značajne razlike u zastupljenosti pojedinih frakcija u uzorcima bez i sa različitim koncentracijama NAC-a. Do promene relativne zastupljenosti LDH<sub>1</sub> izoforme nije došlo (**grafikon 30A**), dok je relativna učestalost LDH<sub>2</sub> i LDH<sub>3</sub> značajno opala (**grafikoni 30 B i C**). Relativna zastupljenost LDH<sub>4</sub> i LDH<sub>5</sub> izoforme je porasla od 24 do 48 sata u svim uslovima, osim posle tretmana 2 mM NAC-om.

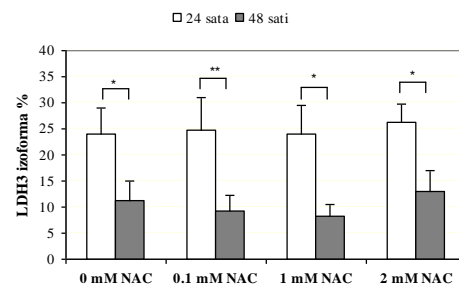
A



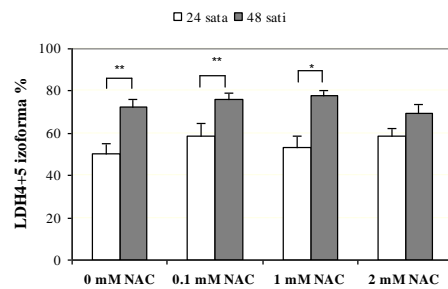
B



C



D



Grafikon 30. Uporedna analiza relativne zastupljenosti LDH izoformi nakon tretmana NAC-om u trajanju od 24, odnosno 48 sati A) Promene u pogledu relativne zastupljenosti LDH<sub>1</sub> izoforme; B) Promene u pogledu relativne zastupljenosti LDH<sub>2</sub> izoforme; C) Promene u pogledu relativne zastupljenosti LDH<sub>3</sub> izoforme; D) Promene u pogledu relativne zastupljenosti LDH<sub>4</sub> i LDH<sub>5</sub> izoformi. Vrednosti su prikazane kao  $\bar{X} \pm SD$  (n=9), \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001

## 6. DISKUSIJA

Naši rezultati su pokazali da je iz zubne pulpe mlečnih zuba dece, metodom tkivnog eksplanta, uzgojena populacija ćelija koja ima visok proliferativni potencijal i može da se diferencira u osteoblaste, adipocite i hondrocite. Osim toga, ima fenotipske karakteristike ćelija poreklom od mezoderma i tokom perioda kultivacije od dva meseca ne pokazuje znake starenja: vijabilitet ćelija je bio očuvan, jer je ispod 5% ćelija bilo u apoptozi posle tripsinizacije, a izrazita aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze je bila prisutna u svega 3% ćelija. Zbog toga smatramo da se izolovana populacija ćelija može okarakterisati kao populacija mezenhimalnih matičnih ćelija iz zubne pulpe mlečnih zuba dece. Kako je prema literaturnim podacima, u zavisnosti od načina izolacije i kultivacije, ta populacija do izvesne mere heterogena, odnosno u nju spadaju ćelije nazvane SHED (Miura i sar., 2003) kao i ćelije nazvane IDPSC (Kerkis i sar., 2006), smatramo da bi naziv koji obuhvata sve populacije ćelija izolovane iz zubne pulpe mlečnih zuba, zapravo najviše odgovarao ćelijama izolovanim u ovoj studiji. Taj naziv je *Dental Tissue Stem Cells* - DTSC (Kerkis i Caplan, 2012).

Drugi važan rezultat dobijen u ovoj studiji je da NAC utiče na proliferaciju i diferencijaciju DTSC. Naime, koncentracija od 0,1 mM NAC povećava broj DTSC u kulturi za 20% i to najverovatnije ubrzavajući ćelijski ciklus jedne manje populacije ćelija. Osim toga, rastuća koncentracija NAC-a stimuliše osteogenezu i hondrogenezu, a inhibira adipogenezu. Iako molekularni mehanizam ovih dejstava nije proučavan u ovom radu, pokazano je da NAC deluje na redoks status nediferenciranih DTSC. Naime, 0,1 i 1 mM NAC smanjuju oksidativno oštećenje ćelija, ali smanjuju i aktivnost SOD i katalaze, enzima uključenih u sistem antioksidativne zaštite. Osim toga, na osnovu porasta aktivnosti LDH izoformi 4 i 5, možemo zaključiti da 0,1 mM NAC utiče na stimulaciju glikolize u ćelijama u kulturi, čime bi se barem delimično mogla objasniti i njihova brža proliferacija.

## 6.1. CFU-F test i proliferacija ćelija tokom dugotrajne kultivacije

Do sada je puno puta pokazano da u adekvatnim uslovima, jedna CFU-F, nastaje od jedne ćelije, te da su ćelije potomci te jedne ćelije zapravo njeni klonovi (Menicanin i sar., 2010). Primitivnije ćelije formiraju multipotentne, bipotentne ili unipotentne ćelije potomke sa velikim proliferativnim potencijalom. U slučaju da ćelija koja je formirala koloniju nije primitivna, presađivanjem ćelija koje je sačinjavaju, kultura se neće nastaviti jer te ćelije nemaju adekvatan proliferativni potencijal. CFU-F test je osnovni i jedinstven način da se *in vitro* pokaže koji broj ćelija iz izolovane populacije ćelija ima značajan proliferativni potencijal. Ako CFU-F test posmatramo u svetlu hijerarhijske organizacije hematopoetskog sistema, CFU-F bi mogle da predstavljaju multipotentne progenitore. Naime, MČH ne mogu formirati kolonije, i mogu se detektovati *in vitro* samo indirektno, posredstvom tečnih kultura u kojima proliferišući, tokom dužeg vremena, stvaraju progenitore koji se dokazuju testom formiranja kolonija. Test formiranja kolonija u sistemu hematopoeze ima klinički značaj jer učestalost progenitora korelira sa uspehom transplantacije MČH (Balint i sar., 1999). Na isti način, učestalost CFU-F bi trebalo da predstavlja potencijal pojedinih tkiva u pogledu mogućnosti produkcije zadovoljavajućeg broja ćelija koje se mogu iskoristiti za ćelijsku terapiju. S obzirom na činjenicu da su naše ćelije izolovane metodom tkivnog eksplanta, broj kolonija je određivan tek posle 10 ili 15 dana primarne migracije ćelija iz fragmenata pulpe, odnosno broj CFU-F je određivan prilikom prvog presejavanja ćelija. Prosečan broj CFU-F je bio  $470 \pm 52$  na 10000 zasejanih ćelija. Naš rezultat je u skladu sa rezultatima drugih autora (Gronthos i sar., 2000; Yamaza i sar., 2010). Inače je incidenca njihovog nalaza viša nego u koštanoj srži (Gronthos i sar., 2000; Yamaza i sar., 2010).

Vreme duplikacije ćelija u kulturi (PDT) je u proseku od P4 do P8 iznosilo 23,23 sata i nije bilo statistički značajnih razlika između pasaža. Ovaj podatak je u skladu sa literaturnim podacima (Pivoriūnas i sar., 2010), ali se i razlikuje u zavisnosti od sistema kultivacije koji su primenjeni tokom eksperimenata. Pokazano je da PDT može da bude od 18 (Nakamura i sar., 2009) do 41,3 sata (Suchanek i sar., 2010). Takođe, pokazano je da su ćelije izolovane iz zubne pulpe mlečnih zuba proliferisale brže i imale veći kumulativni PD u odnosu na DPSC i MMČ iz koštane srži (Huang i

sar., 2009). U našem sistemu kultivacije ćelije su u periodu od 30 dana prošle u proseku kroz 31 deobu i to bez usporavanja ćelijskog ciklusa, što ukazuje da izolovane ćelije imaju visok proliferativni potencijal. Korišćenjem BrdU testa je pokazano da je u P4, tokom 12 sati kultivacije 70% ćelija prošlo kroz S fazu ćelijskog ciklusa, a u P8, 78% ćelija. Dobijene prosečne vrednosti su u saglasnosti sa publikovanim rezultatima sličnih eksperimenata (Miura i sar., 2003; Nakamura i sar., 2009). Možemo pretpostaviti da povećanje broja ćelija u S fazi ciklusa, u istom periodu, zapravo znači da je došlo do ubrzanja ćelijskog ciklusa barem jedne populacije ćelija.

Rezultati dobijeni praćenjem ćelijskih deoba uz pomoć boje CFSE, pokazuju da se među ćelijama u kulturi nalazi oko 12% ćelija koje su se za 72 sata podelile jedan do četiri puta, dok se ostatak ćelija podelio više od četiri puta. Ovi rezultati su zanimljivi jer pokazuju da je izolovana populacija ćelija heterogena ne samo po ekspresiji antigena, već i po brzini proliferacije. Brzina proliferacije je funkcionalna karakteristika ćelija koja bi mogla da bude jedan od kriterijuma za razdvajanje manje i više primitivnih ćelija u kulturi, jer se može pretpostaviti da se primitivnije ćelije brže dele. Takođe pokazuje da PDT, kao opšte prihvaćeni način prikazivanja brzine ćelijske proliferacije u kulturama adherentnih ćelija, pokazuje samo prosek vremena potrebnog za deobu pojedinih ćelijskih populacija. Populacija ćelija u našem radu je bila heterogena i po ekspresiji CD146 antigena, koji je jedan od markera onih ćelija među kojima je frekvencija CFU-F veća (Shi i Gronthos, 2003). Ukrštanjem bojenja CFSE i CD146 nisu dobijeni rezultati koji bi ukazali da se populacije CD146+ i CD146- ćelija razlikuju po brzini proliferacije (rezultati nisu prikazani). Podaci koji ukazuju na različitu brzinu deobe MMĆ do sada nisu zabeleženi u literaturi.

U ovom radu je takođe pokazano da se populacije DTSC izolovane iz pojedinih zuba razlikuju na osnovu aktivnosti ALDH. U pojedinim uzorcima se aktivnost ALDH mogla detektovati u svega 4% ćelija, dok se u drugim uzorcima aktivnost detektovala u 24% ćelija. Kako je pokazano da je veća aktivnost ALDH u negativnoj korelaciji sa vremenom udvajanja ćelija u kulturi, može se pretpostaviti da primitivnije ćelije, koje imaju višu aktivnost ALDH, brže proliferišu. Prema literaturnim podacima, aktivnost ALDH se razlikuje među populacijama ćelija. Među MMĆ poreklom iz krvi pupčane vrpce 10% ćelija je ALDH pozitivno, odnosno 8% ćelija ima nižu, a 2% ćelija ima visoku ALDH aktivnost (Nagano i sar., 2010). Kada su u pitanju MČH, bilo da se radi o

koštanoj srži ili krvi pupčane vrpce procenat visoko ALDH pozitivnih ćelija se kreće između 1% i 5% (Keller, 2009), dok procenat u kancerskim ćelijskim linijama varira i može biti veoma visok – čak do 94% u slučaju A549-ćelijske linije poreklom od adenokarcinoma pluća (Moreb i sar., 2007). Do sada u literaturi nije opisana aktivnost ALDH u DTSC, niti je aktivnost ovog enzima dovođena u vezu sa brzinom proliferacije ćelija. S obzirom da je u kulturama ćelija od pojedinih zubnih pulpi aktivnost ALDH vrlo visoka, možemo da pretpostavimo da su u tim pulpama, bile očuvane veoma primitivne ćelije.

Ukoliko se uporedi početni broj ćelija koji se može dobiti metodom tkivnog eksplanta iz pulpe jednog zuba ( $0.3 - 3 \times 10^5$  ćelija ukupno i od toga su 4-5% matične ćelije) sa brojem ćelija koji se može dobiti iz koštane srži ( $6 \times 10^6$  ćelija / mL, a od toga su 0.01% matične ćelije) ili lipoaspirata ( $2 \times 10^6$  ćelija / mL, a od toga su 10% matične ćelije), jasno je da je početni broj ćelija u zubnoj pulpi veoma mali. Međutim, nakon četvrte pasaže DTSC dobija se oko  $100 \times 10^6$  što predstavlja dovoljan broj ćelija za različite terapijske namene (Emadedin i sar., 2012; Martin i sar., 2010). Kako je njihov proliferativni potencijal veći od MMĆ izolovanih iz koštane srži (Gronthos i sar., 2000), a PDT kraći od MMĆ izolovanih iz masnog tkiva (naši neobjavljeni rezultati), može se smatrati da je zubna pulpa mlečnih zuba dobar izvor matičnih ćelija za primenu u praksi.

## **6.2. Ekspresija površinskih antigena tokom kultivacije**

Naši rezultati su pokazali da je ekspresija CD44, CD29, CD90, CD73 i kolagena tip 1, homogena u izolovanoj populaciji DTSC. U odnosu na ekspresiju CD106, STRO-1, i CD146, kultivisane ćelije su bile heterogene i manje od 10% ćelija je ekspresiralo CD106 i STRO-1, dok je ekspresija CD146 markera bila veoma varijabilna između zuba i pokazivala trend opadanja sa povećanjem broja pasaža. DTSC nisu ekspresirale CD34 antigen, karakterističan za nezrele ćelije hematopoetske loze. Važnost ovog antigena je mnogo veća prilikom izolacije MMĆ iz koštane srži, s obzirom da se prilikom uzorkovanja ćelija iz tog izvora, uvek dobije populacija koja sadrži i MMĆ i MĆH. Bez obzira na način izolacije primarne ćelijske populacije iz zubne pulpe, svi do sada opisani postupci, kao rezultat imaju umnožavanje populacije ćelija koja je heterogena po svom fenotipu (Miura i sar., 2003; Kerkis i sar., 2006). Ćelije zubne

pulpe koje istovremeno imaju visok proliferativni potencijal i migratornu sposobnost su MMC, periciti i endotelne ćelije. Antigeni praćeni u našem sistemu kultivacije, i preporučeni kao markeri mezenhimalnih matičnih ćelija, nisu eksprimirani samo na ovoj populaciji ćelija. Tako je pokazano da CD146 u kulturi eksprimiraju i periciti i endotelne ćelije (Shi i Gronthos, 2003; Miura i sar., 2003; Siemerink i sar., 2012). STRO-1 eksprimiraju periciti zubne pulpe i koštane srži, ali i ćelije koje formiraju CFU-F, a za koje je pokazano da su multipotentne (Kaneko i sar., 2009). CD106 je marker aktivisanih endotelnih ćelija, a eksprimiraju ga i glatko-mišićne ćelije i periciti (Garmy-Susini i sar., 2005). S obzirom da se sva tri molekula nalaze na pericitima, možemo pretpostaviti da je u populaciji ćelija izolovanoj u našem radu svakako bila značajna populacija pericita, ali se ne može zanemariti ni pretpostavka da su naše kulture inicijalno sadržale i nešto endotelnih ćelija. Pretpostavka da smo metodom tkivnog eksplanta izolovali populaciju ćelija koju u značajnom procentu sačinjavaju periciti je u skladu sa sve većim brojem literaturnih podataka koji identifikuju pericite kao mezenhimalne matične ćelije (Covas i sar., 2008; Chen i sar., 2009; Spath i sar., 2010). Ono što bi se sa velikim stepenom sigurnosti moglo tvrditi jeste da izolovanu populaciju ćelija čine multipotentni progenitori koji ne eksprimiraju markere matičnih ćelija hematopoeze, a koje karakterišu markeri koji u isto vreme identifikuju i pericite i MMC.

Kultivacijom ćelija od P4 do P8 nije došlo do promena u ekspresiji navedenih antigena, osim blagog smanjenja populacije ćelija koja je eksprimirala CD146. Taj nalaz je u skladu sa literaturnim podacima koji takođe ukazuju da tokom dugotrajne kultivacije (od P6) dolazi do smanjenja populacije CD106 i CD146 pozitivnih ćelija (Halfon i sar., 2011). Zanimljivo je primetiti da ukoliko bi jedna od navedenih populacija ćelija (CD146+, CD146-, CD106+, CD106-, STRO-1+, STRO-1-) imala veći proliferativni potencijal od drugih populacija, odnosno ukoliko bi bila manje diferencirana, tokom dugotrajnog pasażiranja bi njena zastupljenost trebalo da raste. Ni u našem eksperimentalnom sistemu, a ni prema literaturnim podacima takva pojava nije zapažena i opisana.

### 6.3. Diferencijacija DTSC

Naši rezultati pokazuju da su se izolovane DTSC kroz sve ispitivane pasaže (P4 do P8) uspešno diferencirale u pravcu osteoblasta, adipocita i hondrocita. Do sada objavljeni podaci nisu konzistentni u pogledu tačnog broja deoba koji bi činio graničnu vrednost posle koje ćelije gube multipotenciju. Verovatno je da starenje ćelija u kulturi zavisi od više faktora u koje spada kako kvalitet primarne ćelijske populacije, tako i vrsta medijuma i prisutni faktori rasta. Patel i saradnici (2009) su pokazali da iako je tokom kultivacije DPSC dolazilo do promena na nivou ekspresije različitih molekularnih markera i ćelijske morfološke kompleksnosti, kapacitet za diferencijaciju tokom kultivacije (sve do pasaže 15) se nije menjao. Ipak, u velikom broju radova, se naglašava da sa starenjem ćelija u kulturi opada potencijal hondrogene i adipogene diferencijacije, a raste potencijal ka osteogenezi. Tako je na primer, pokazano da se adipogeni i osteogeni potencijal MMĆ poreklom iz koštane srži ne menja sve do 15. pasaže, opada oko 20. pasaže i značajno se gubi nakon 30. pasaže (Kim i sar., 2009). Da uslovi kultivacije značajno utiču na mogućnost diferencijacije, ukazuje i podatak, da gajenje ćelija na podlozi presvučenoj kolagenom tipa 1, značajno produžava period u kome se uočava multipotentnost primarne ćelijske populacije (Ksiazek i sar., 2009).

Sudeći po aktivnosti alkalne fosfataze, nakon 5 i 10 dana, ali i površini koju zauzima mineralizovani matriks tokom osteogene indukcije, diferencijacija u smeru osteogeneze je intenzivna nezavisno od pasaže u kojoj je posmatrana. Naši rezultati su u potpunosti u korelaciji sa rezultatima iz literature. Miura i saradnici su pokazali (2003) da nakon četvoronedeljne ekspanzije, SHED imaju sposobnost formiranja Alizarin Red pozitivnih nodusa, ekspresije AP, ali i drugih markera koštanog tkiva.

U našim kulturama je oko 20% ćelija imalo sposobnost da se diferencira u adipocite sa prepoznatljivim masnim kapljicama. Brojni literaturni podaci ukazuju na to da SHED pokazuju slab potencijal za adipogenu diferencijaciju u odnosu na matične ćelije poreklom iz koštane srži (Miura i sar., 2003; Yamaza i sar., 2010).

Nakon formiranja hondrogenih peleta u medijumu za hondrogenu diferencijaciju, dokazana je intenzivna sinteza kolagena tip 1 i tip 2, a potom i sulfonovanih glikozaminoglikana što ukazuje na potencijal izolovanih ćelija da formiraju ekstracelularni matriks karakterističan za fibroznu hrskavicu. U literaturi



nema mnogo podataka o hondrogenom potencijalu DTSC, ali je pokazano da su se IDPSC uspešno diferencirale u hondrocyte (Kerkis i sar., 2006).

Diferencijacija DTSC u našim uslovima, pokazuje da tokom višenedeljne ekspanzije ove ćelije pokazuju očuvan trilinejski diferencijacioni potencijal.

#### **6.4. NAC povećava broj ćelija u kulturi**

Poznato je da je nekontrolisano/preterano stvaranje ROS, kao i reaktivnih radikala azota (ili drugih reaktivnih molekula) osnovni faktor nastanka oštećenja različitih molekula u ćelijama (Valko i sar., 2007). Gledano sa fiziološkog aspekta, ćelije koje bi trebalo da imaju najbolje mehanizme zaštite su matične ćelije, čijom proliferacijom i diferencijacijom tokom čitavog života jedinke (kod čoveka u proseku oko 70 godina), organizam obnavlja i reparira tkiva čije se terminalno diferencirane ćelije ne obnavljaju i koje imaju relativno kratak životni vek. Na primeru MČH, na osnovu *in vivo* i *in vitro* istraživanja može se zaključiti da su ove ćelije smeštene i niše sa niskom koncentracijom kiseonika od 0,1-1% (Hermitte i sar., 2006) kao i da imaju mali broj mitohondrija koje su izvor ROS (Chen i sar., 2008). *In vitro* je jasno pokazano da ove ćelije na 1-3% O<sub>2</sub> mogu da se samoobnavljaju i proliferišu, dok na 20% O<sub>2</sub> proliferišu, diferenciraju se i nestaju (Kovačević Filipović i sar., 2007). Mnogi aspekti fiziologije MMĆ su još uvek nejasni, pa tako i mikrosredina u kojoj se nalaze *in vivo*. Ukoliko je tačna pretpostavka da se MMĆ nalaze uz zidove krvnih sudova (Ishikawa i sar., 2012), onda bi ove ćelije, *in vivo*, verovatno imale metabolizam u kome se ATP delom dobija i u Krebsovom ciklusu. Sa druge strane, verovatno bi imale visok stepen antioksidativne zaštite koja bi morala da obezbedi njihovo normalno funkcionisanje kako u uslovima fiziološke ravnoteže organizma, tako i u uslovima oštećenja tkiva, kada postoji inflamacija i kada su MMĆ neophodne za ponovno uspostavljanje funkcije oštećenog tkiva. U tim uslovima koji podrazumevaju hipoksiju, stvara se više ROS i ćelije moraju da imaju aktivirane sisteme antioksidativne zaštite. Takođe je jasno da kultivacija ćelija menja njihove fiziološke osobine i da se rezultati dobijeni *in vitro* ne mogu direktno primeniti i objasniti karakteristike ćelija *in vivo*. Međutim, ekspanzija različitih ćelija *in vitro* je fascinantna osobina, koja čini se, otvara vrata mnogim vrstama terapija koje ranije nisu bile moguće, ili u najmanju ruku, omogućava ispitivanje farmakoloških supstanci na brz i etički prihvatljiv način, što svakako može

da dovede do bržeg napretka u medicini. Uslovi u kojima se vrši ekspanzija ćelija nisu standardizovani i zavise od mnogih faktora. Iako je ekspanzija na 20% O<sub>2</sub> najčešće primenjivana, mnogi radovi ukazuju da je očuvanje „izvorne“ prirode matičnih ćelija, ili bilo kojih drugih ćelija organizma, moguće samo u uslovima adekvatne koncentracije O<sub>2</sub>, odnosno one koncentracije u kojoj se ispitivane ćelije nalaze i u organizmu (Ivanović, 2009). Takođe je pokazano da uslovi niskih koncentracija O<sub>2</sub> mogu uspešno da se imitiraju dodavanjem NAC-a (Fan i sar., 2008). Osim toga, ukoliko se ekspandirane ćelije pretiraju niskim koncentracijama O<sub>2</sub> ili NAC-om, one bivaju bolje „pripremljene“ za transplantaciju i samim tim postižu bolje efekte u regeneraciji ili reparaciji oštećenih tkiva (Song i sar., 2010; Leroux i sar., 2010).

Sedamdeset dva sata posle dodavanja 0,1 mM NAC-a u kulture DTSC, broj ćelija je u proseku bio za četvrtinu veći nego u kulturama bez NAC-a. Tretman 1 mM NAC-om je takođe povećavao broj ćelija u kulturi, ali nešto slabije u odnosu na 0,1 mM NAC. Ovi rezultati se mogu objasniti time da NAC deluje stimulatивно na proliferaciju (skraćujući ćelijski ciklus) jedne ćelijske populacije u okviru heterogene grupe ćelija u našem sistemu kultivacije. Naime, u našem radu je pokazano da se posle dodavanja NAC-a, jedna populacija ćelija (obojena sa CFSE), podeli veći broj puta u odnosu na drugu populaciju. Taj nalaz je potkrepljen i rezultatima koji pokazuju da se 12 sati posle dodavanja NAC-a u kulture, povećava populacija ćelija koja se nalazi u S fazi ćelijskog ciklusa. Osim toga, pokazali smo da 0,1 mM i 1 mM NAC ne utiču na broj ćelija u apoptozi. I drugi autori su pokazali da NAC u koncentracijama 0,1 i 1 mM već posle drugog dana tretmana MMC' poreklom iz koštane srži povećava proliferaciju ćelija 1,3 odnosno 1,9 puta (Ahmadi-Ashtiani i sar., 2012). Takođe, NAC je u koncentracijama od 0,125 mM, 0,25 mM i 0,5 mM dozno zavisno povećavao proliferaciju MMC' poreklom iz koštane srži (Ji i sar., 2011). Sun i saradnici (2013) su pokazali da je povećanje proliferacije MČ' poreklom iz masnog tkiva u grupi tretiranoj bFGF-om i antioksidantima (NAC-om i askorbinskom kiselinom) praćeno značajno većim brojem ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa, rezultat smanjenja nivoa inhibitora ciklin-zavisnih kinaza (CDK), odnosno povećanja koncentracije samih CDK. Međutim, pozitivan efekat u pogledu povećanja broja ćelija (ćelijska linija L6) tretiranih NAC-om nije se manifestovao promenom broja ćelija koje se nalaze u S fazi ćelijskog ciklusa (Kim i sar., 2006). Možemo pretpostaviti da upravo stimulacija proliferacije ćelijske linije ne

mora da ima isti mehanizam, jer je ta populacija ćelija homogena po svojim osobinama, dok je u slučaju primarnih ćelijskih kultura populacija heterogena i efekat NAC-a ne mora da bude isti na svim ćelijama.

Dodavanje 2 mM NAC-a je u P8 smanjivalo proliferaciju matičnih ćelija, i taj efekat se video i kroz smanjenje broja ćelija koje prolaze kroz više od 6 deoba za 72 sata. Takođe, 2 mM NAC je nakon 24 sata kultivacije povećavao broj ćelija u apoptozi. U literaturi su primenjivane različite koncentracije NAC-a u *in vitro* sistemu, i može se uočiti da je efekat zavistan ne samo od koncentracije NAC-a, već i od tipa ćelija na kojima je efekat ispitivan. Sa druge strane, ukoliko se ima u vidu da tioli male molekulske mase pokazuju bivarijantno delovanje, što znači da su toksični u srednjim, ali ne i u niskim i visokim dozama mogu se objasniti i donekle inkonzistentni rezultati različitih studija. U radu Held i Biaglow-a (1994), na V79 ćelijama poreklom od kineskog hrčka, je pokazano da jedino za NAC nije karakterističan takav dvofazni odgovor, te da je NAC za ćelije toksičan u koncentracijama koje su  $\geq$  od 2 mM. S druge strane, neke studije ukazuju da NAC čak i u višim koncentracijama (20 mM) ne izaziva proces apoptoze u kulturama DPSC, bilo da se radi o diferenciranim ili nediferenciranim ćelijama (Paranjpe i sar., 2007). Zapravo je pokazano da prilikom kontakta sa biomaterijalom, ima čak i protektivan efekat na DPSC (Paranjpe i sar., 2007). Ovi rezultati pokazuju da efekat NAC-a značajno zavisi od drugih uslova kultivacije, ali da taj isti efekat može da se primeni u praksi.

### **6.5. NAC povećava aktivnost ALDH u jednoj populaciji ćelija u kulturi**

Naši rezultati pokazuju da je 0,1 mM NAC u P6 povećao procenat ćelija u kojima se može detektovati visoka aktivnost ALDH, a u isto vreme je dovodio do ubrzanja ćelijskog ciklusa jedne populacije ćelija. Različite ćelije eksprimiraju različite izoforme ALDH, ali koja je izoforma aktivna u ćelijama zubne pulpe nije do sada pokazano. Poznato je da visoka aktivnost ALDH3A1 izoforme stimuliše proliferaciju ćelija i da je povezana sa otpornošću ćelija na citostatske i citotoksične efekte lipidnih peroksida (Muzio i sar., 2012). Mogući mehanizam se zasniva na sposobnosti ALDH da metabolizuje neke endogene supstrate koji nastaju kao rezultat normalnog ćelijskog metabolizma (4-hidroksinonenal), a koji utiču na ekspresiju gena koji su uključeni u

regulaciju proliferacije (Muzio i sar., 2012). *In vitro* eseji enzimске aktivnosti ukazuju na to da je humana ALDH7A1 osetljiva na oksidaciju i efikasnost enzima može bar delimično biti obnovljena dodavanjem  $\beta$ -merkaptoetanol-a (Brocker i sar., 2011). Kako je u našem eksperimentalnom sistemu pokazano, NAC smanjuje oksidativno oštećenje u ćelijama pa bi se na taj način moglo objasniti kako dodavanje NAC-a povećava procenat ćelija koje ekspimiraju ALDH. Moguće je pretpostaviti da je aktivacija ALDH u pojedinim ćelijama povezana sa ubrzanjem njihovog ćelijskog ciklusa i povećanjem ukupnog broja ćelija u kulturama.

Što se tiče fenotipskih markera, dodavanje NAC-a u medijum za kultivaciju nije značajno uticalo na njihovu ekspresiju.

## **6.6. NAC smanjuje aktivnost SA- $\beta$ -gal *in vitro***

Dugotrajna kultivacija ćelija *in vitro*, neminovno, posle određenog broja pasaža, indukuje akumulaciju ćelija koje pokazuju znake starenja. Ako  $\beta$ -galaktozidazu označimo kao važan marker starenja *in vitro*, onda je zaključak da DTSC tokom kultivacije, do osme pasaže, nisu pokazivale značajnije znake starenja. Drugačija slika je dobijena nakon tretmana ćelija NAC-om. Nezavisno od pasaže, 0,1 mM NAC je uticao da se procenat SA- $\beta$ -gal pozitivnih ćelija smanji, dok je 2 mM NAC značajno uticao na povećanje broja ćelija koje su SA- $\beta$ -gal pozitivne. To bi možda donekle moglo da objasni dobijeno smanjenje proliferacije, odnosno, smanjenje broja ćelija koje su prolazile kroz veći broj deoba, u uslovima tretmana 2 mM NAC-om.

U literaturi je pokazano da iako je sa diferencijacijom indukovanih pluripotentnih matičnih ćelija došlo do povećanja broja ćelija koje su SA- $\beta$ -gal pozitivne, tretman NAC-om je tokom diferencijacije značajno uticao na smanjenje broja starih ćelija, što ukazuje na protektivan efekat NAC-a kada je u pitanju oksidativni stres *in vitro* (Berniakovich i sar., 2012). Rezultati dobijeni primenom NAC-a u uslovima prekomerne ekspresije Wnt3a (ubrzanje starenje) u MMC' poreklom iz koštane srži, su ukazali da ROS imaju značajnu ulogu tokom starenja MC' *in vitro*. NAC je, naime, smanjujući stvaranje ROS, značajno smanjio procenat SA- $\beta$ -gal pozitivnih ćelija, mada sam efekat NAC-a, bez indukcije starenja, nije ispitivan (Zhang i sar., 2013). Voghel i saradnici (2008) su zaključili da ukoliko nije došlo do ireverzibilnog oštećenja

endotelnih ćelija u uslovima oksidativnog stresa, kontinuirana primena NAC-a dovodi do inhibicije starenja ćelija i to mehanizmom koji uključuje aktivaciju katalitičke subjedinice telomeraze i prolaznu stabilizaciju telomera. Svi navedeni rezultati ukazuju da je jedan od efekata NAC-a, svakako smanjeno nakupljanje lizozoma u ćelijama, što može da bude povezano, kao što je ranije objašnjeno, i sa ubrzanjem proliferacije jedne ćelijske populacije.

### **6.7. NAC stimuliše osteogenu i hondrogenu, a inhibira adipogenu diferencijaciju**

NAC je dozno zavisno, u svim ispitivanim periodima po indukciji osteogeneze povećavao kako aktivnost AP, tako i količinu deponovanog kalcijum-fosfata, što znači da je tokom trodnevnog pretremana NAC-om veći broj ćelija u kulturi zadržao ili stekao potencijal da se diferencira u osteoblaste. I drugi podaci iz literature pokazuju da NAC stimuliše osteogenezu. Tako je tretman NAC-om (10-30 mM) stimulisao kako ranu tako i kasnu fazu osteoplastne diferencijacije ćelija dobijenih enzimskom digestijom frontalne i parijetalne kosti lobanje neonatalnih miševa (Jun i sar., 2008). Dodavanje NAC-a u medijum za osteogenu diferencijaciju je stimulisalo i osteogenezu MMĆ izolovanih iz koštane srži. Došlo je do povećanja aktivnosti alkalne fosfataze, kao i mRNK za kolagen tip 1 i osteopontin (Ji i sar., 2011). Nasuprot našim rezultatima, NAC je i u bazalnom medijumu stimulisao mineralizaciju i aktivnost alkalne fosfataze (Ji i sar., 2011). Tretman DPSC samo sa NAC-om, ili NAC-om i agensima koji su uključeni u proces osteogene diferencijacije značajno je povećao ekspresiju gena za osteopontin, osteoklacin i dentalni sijaloprotein. U bazalnom medijumu NAC je stimulisao proliferaciju i diferencijaciju ćelija (Paranjpe i sar., 2007). Radeći na stromalnim ćelijama poreklom iz koštane srži, Ji sa saradnicima (2011) je pokazao da kada je NAC dodat u medijum za diferencijaciju, značajno povećava osteogenu diferencijaciju, kako tokom rane induktivne faze, tako i tokom faze kada dolazi do mineralizacije. Svi navedeni podaci ukazuju na to da NAC stimuliše diferencijaciju MMĆ ka osteoplastima.

Pretretman NAC-om u trajanju od 72 sata, je dozno zavisno, inhibirao diferencijaciju DTSC u adipocite. Slično, Kanda i saradnici (2011), su posle petodnevnog pretremana MMĆ poreklom iz koštane srži, 5 mM NAC-om, dobili smanjenje adipogene diferencijacije. NAC je, mehanizmom koji se zasniva na inhibiciji

formiranja ROS, inhibirao i akumulaciju masnih kapljica tokom finalne diferencijacije preadipocita (Calzadilla i sar., 2011). Dodavanje NAC-a u medijum za adipogenu diferencijaciju dovelo je do inhibicije adipogeneze (Ji i sar, 2011). Naime, došlo je do smanjenja ekspresije markera adipogeneze LPL, FABP4 i PPAR $\gamma$  na nivou mRNK, kao i inhibicije akumulacije lipidnih kapljica u ćelijama tokom diferencijacije (Ji i sar., 2011). Zanimljivo je da je sličan trend u pogledu delovanja NAC-a u njihovom sistemu kultivacije primećen i nakon gajenja ćelija u bazalnom medijumu, što u našem sistemu nije bilo slučaj. Može se zaključiti da je NAC u svim opisanim uslovima inhibirao adipogenezu.

Pre tretman NAC-om je značajno, dozno zavisno, stimulisao sintezu glikozaminoglikana tokom hondrogene diferencijacije DTSC. Dve nedelje nakon formiranja hondrogenih peleta u medijumu za hondrogenu diferencijaciju, pokazana je intenzivna sinteza kolagena 2, međutim, poređenje histoloških preparata nije moglo da da jasnu sliku o efektima NAC-a. Pokazano je da primena niskih koncentracija O<sub>2</sub> *in vitro* utiče na pojačanje procesa glikolize u MMĆ poreklom iz koštane srži i da je to mehanizam koji je važan za stimulaciju hondrogeneze *in vitro* (Pattappa i sar., 2011). Ukoliko se efekti *in vitro* primene niskih koncentracija kiseonika i NAC-a mogu porediti, onda bi to bio način da se objasni izrazito pozitivan efekat NAC-a na hondrogenu diferencijaciju. Nakon analize dinamike hondrogeneze kod miševa tretiranih NAC-om od dana rođenja pa do druge odnosno treće nedelje života, utvrđeno je da je tretman NAC-om stimulisao sintezu proteoglikana i smanjio procenat hipertrofičnih hondrocita *in vivo* (Morita i sar., 2007). Kako je NAC i u našem eksperimentalnom sistemu, ali i *in vivo* stimulisao hondrogenezu, možemo smatrati da je njegov pozitivan uticaj na hondrogenu diferencijaciju DTSC dosta izvestan.

Nedavno su Sun i saradnici (2013) pokazali da je šestodnevni pretretman kombinacijom antioksidanasa (NAC i askorbinska kiselina) MMĆ poreklom iz masnog tkiva, koje su gajene u medijumu u koji je dodat bFGF, doveo do stimulacije osteogeneze, adipogeneze i hondrogeneze. Intenzivirana diferencijacija je detektovana kako histohemijski tako i na nivou povećanja ekspresije molekularnih markera diferencijacije. Efekat stimulacije diferencijacije je objašnjen činjenicom da je sam bFGF uticao na stimulaciju diferencijacije, dok je dodavanje antioksidanata dodatno amplifikovalo taj proces (Sun i sar., 2013).

## 6.8. NAC smanjuje oksidativno oštećenje proteina i lipida

Naši rezultati pokazuju da dodavanje NAC-a u nižim koncentracijama (0,1 i 1 mM) posle 24 sata smanjuje stepen oksidativnog oštećenja lipida (smanjena je koncentracija MDA) i proteina (smanjen sadržaj karbonilnih grupa), dok sadržaj SH grupa raste. Potvrdu inhibicije lipidne peroksidacije smo dobili i analizom masno-kiselinskih profila nakon tretmana NAC-om. Značajno povećanje udela PUFA u ukupnom masno-kiselinskom profilu ide u prilog činjenici da NAC ispoljava protektivno delovanje na lipide, direktno i/ili indirektno utičući na smanjenje lipidne peroksidacije.

Posle 48 sati, efekat 0,1 i 1 mM NAC-a se odražava samo na sniženu koncentraciju MDA. NAC u koncentraciji od 2 mM u proseku ima slične efekte kao i prethodne vrednosti, ali je varijacija između pojedinih uzoraka značajno veća, te rezultati nisu značajni. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim nalazima da NAC u koncentracijama koje su veće od  $10^{-3}$  mM značajno smanjuje oksidativni stres, konkretno nastanak superoksid anjon-radikala ( $O_2^{\cdot-}$ ) u primarnim kulturama angiotenzin II-stimulisanih vaskularnih glatko-mišićnih ćelija (Luo i sar., 2009) i  $O_2^{\cdot-}$  i  $H_2O_2$  u MČH (Fan i sar., 2008). Donekle drugačiji su rezultati Samuni i saradnika (2013) koji su pokazali da NAC efikasno uklanja hidroksil-radikal ( $OH^{\cdot}$ ), dok je uticaj NAC na neutralizaciju superoksid-anjon-radikala, vodonik- peroksida i peroksinitrita ostao nedovoljno ispitan. Takođe je pokazano da 0,1 mM NAC značajno poboljšava redoks status u ćelijama (povećava nivo -SH grupa), bilo putem direktnog povećanja koncentracije cisteina u ćelijama, ili indirektno povećanjem koncentracije glutathiona (Samuni i sar., 2013), što je u saglasnosti sa našim rezultatima. Fan i saradnici (2008) su ukazali na mogućnost da je snižavanje lipidne peroksidacije NAC-om u uslovima normoksije posledica porasta koncentracije GSH, pa samim tim i povećanja aktivnosti GSH zavisne GPx, koju je u odnosu na katalazu u uslovima normoksije lakše indukovati. U svetlu brojnih radova o efektima NAC-a na smanjenje oštećenja izazvanih slobodnim kiseonikovim radikalima, možemo da zaključimo da dobijeni rezultati ukazuju na direktno ili indirektno neutrališuće delovanje NAC-a na ROS, i posledično smanjenje oštećenja lipidnih i proteinskih molekula, a povećanja tiolnih grupa u ćelijama.

Takođe je zanimljivo da je stepen oštećenja lipida i proteina, pokazan kroz ispitivane parametre, relativno nizak, čak i bez NAC-a, mada u literaturi postoje kontradiktorni rezultati kada su u pitanju ispitivani parametri. Upoređujući vrednosti za MDA kontrolnih MMC' poreklom iz koštane srži pacova u radu Zhang i saradnika, (2013), ali i MDA vrednosti humanih MMC' iz koštane srži u radu Li i saradnika (2011), ispostavilo se da je lipidna peroksidacija u našem sistemu kultivacije daleko niža. Zanimljivo je da vrednosti koje smo mi dobili, kada se preračunaju na  $10^3$  ćelija, u najvišem stepenu koreliraju sa rezultatima dobijenim na MMC' poreklom iz masnog tkiva koje su u pasaži 5 transdukovane lentiviralnim vektorom koji kodira katalitičku subjedinicu humane telomerase (Estrada i sar., 2013). Takođe, procenat SA- $\beta$ -gal pozitivnih ćelija je u pasaži 5 kod MMC' poreklom iz masnog tkiva daleko veći (Estrada i sar., 2013) nego u našem eksperimentalnom sistemu. Ako se nisko oksidativno oštećenje sagleda i sa aspekta da je vijabilitet ćelija tokom čitavog perioda kultivacije izuzetno visok (mali broj ćelija u apoptozi) a aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze niska, možemo da zaključimo da se izolovane ćelije, tokom prve četiri pasaže, veoma dobro adaptiraju na uslove sa visokom koncentracijom  $O_2$ .

## **6.9. NAC smanjuje aktivnost enzima antioksidativne zaštite**

Aktivnost enzima uključenih u sistem antioksidativne zaštite (AOS), nije detaljno obrađivana u literaturi koja se bavi metabolizmom MMC'. Osim toga, postojeći rezultati su donekle kontroverzni. Pojedini autori su pokazali da MMC' imaju nižu aktivnost enzima AOS u odnosu na diferencirane ćelije, i to objašnjavaju fenomenom privilegovanih *in vivo* niša, koje štite MMC' od štetnih dejstava mikrosredine (Orciani i sar., 2010). Drugi autori su pokazali da, *in vitro*, MMC' poseduju najvažnije enzimske i neenzimske mehanizme zahvaljujući kojima su sposobne da efikasno detoksikuju ROS i RNS (Valle-Prieto i Conget, 2010) kao i da nediferencirane MČ' imaju znatno niže koncentracija ROS i u vezi sa tim veću zastupljenost nezasićenih metabolita (Vacanti i Metallo, 2013). Naši rezultati pokazuju da se *in vitro*, u DTSC, može detektovati aktivnost SOD i katalaze.

Naši rezultati takođe pokazuju da 24 i 48 sati po dodavanju 0,1 i 1 mM NAC-a dolazi do smanjenja aktivnosti ukupne SOD i CAT i da je 0,1 mM NAC smanjio



aktivnost Cu,Zn-SOD (smanjenje uzrokovano 1 mM NAC-om nije bilo značajno), dok su 1 i 2 mM NAC smanjivali aktivnost Mn-SOD.

S obzirom da je pad aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u korelaciji sa smanjenjem oksidativnog oštećenja ćelijskih makromolekula, efekat koji smo dobili bi se bar delom mogao objasniti kao adaptivan odgovor ćelija na smanjenje ROS, odnosno smanjeno stvaranje ROS je praćeno i smanjenjem aktivnosti enzima neophodnih za njihovu neutralizaciju. S obzirom na to da je broj ćelija sa 0,1 i 1 mM NAC-om veći posle 72 sata kultivacije, a stepen oksidativnog oštećenja manji, kao i aktivnost SOD i CAT, možemo zaključiti da su ova dva efekta međusobno zavisna. Jedna mogućnost je da se ćelijski ciklus, barem jedne manje populacije ćelija (kako je pokazano prethodnim rezultatima) skraćuje, zato što je potrebno manje vremena da se u pojedinim fazama ćelijskog ciklusa repariraju određeni molekuli važni za odvijanje ciklusa ćelija koje se nalaze u stalnoj proliferaciji. Druga mogućnost je da NAC delujući na nivo ROS, zapravo utiče na pojedine signalne puteve koji ubrzavaju ćelijski ciklus jedne populacije DTSC.

NAC je u koncentraciji od 2 mM smanjio aktivnosti Mn-SOD, i to je jedina koncentracija NAC-a koja je izazvala smanjenje broja ćelija posle kultivacije od 72 sata i to verovatno povećanjem procenta ćelija u apoptozi. Na koji način su povezani smanjena aktivnost Mn-SOD i povećanje apoptoze nije lako objasniti, ali se može pretpostaviti da svako veće odstupanje u aktivnosti nekog enzima može da dovede do negativnih efekata po ćelijski ciklus u preživljavanje ćelija.

#### **6.10. NAC povećava relativnu aktivnost LDH<sub>4</sub> i LDH<sub>5</sub>**

Naši rezultati pokazuju da su u kulturama DTSC, kroz sve pasaže, najaktivnije izoforme LDH<sub>3</sub>, LDH<sub>4</sub> i LDH<sub>5</sub>. Relativna aktivnost LDH<sub>1</sub> i LDH<sub>2</sub> izoformi je bila veoma slaba. NAC je dozno zavisno povećavao relativnu aktivnost LDH<sub>4</sub> i LDH<sub>5</sub>. Do sada je pokazano da linije embrionalnih matičnih ćelija eksprimiraju, kao i ćelije u našem eksperimentalnom sistemu, LDH<sub>3</sub>, LDH<sub>4</sub> i LDH<sub>5</sub>, dok su primarne embrionalne ćelije imale aktivnu LDH<sub>1</sub> i LDH<sub>5</sub> izoformu (Gibbons i sar., 2006). S druge strane, embrioni od dve ćelije i blastociste su imali aktivnu samo LDH<sub>1</sub>, a fibroblasti LDH<sub>4</sub> i LDH<sub>5</sub> (Gibbons i sar., 2006). Ovi podaci bi mogli da navedu na zaključak da ekspresija

pojedinih izoformi zavisi od dužine kultivacije ćelija, odnosno, da zavisi od toga, da li je metabolizam ćelije prilagođen uslovima kultivacije. Naime, embrionalne, hematopoetske i mezenhimalne matične ćelije u kulturi, kontinuirano proliferišu, bez obzira da li se nalaze na 3% O<sub>2</sub> ili na 20% O<sub>2</sub> (Ezashi i sar., 2005; Ivanović i sar., 2000; Fehrer i sar., 2007). Taj fenomen se može objasniti činjenicom da u kulturi nema kontaktne inhibicije, kao ni drugih regulatornih signala koji sprečavaju nekontrolisanu proliferaciju ćelija u samom organizmu. Osim toga, ćelije u kulturi imaju na raspolaganju dovoljno faktora rasta i hranljivih materija. Komercijalni medijumi za kultivaciju MĆ najčešće sadrže glukozu u koncentracijama koje su više od fizioloških (5,6 mmol/L). U ovim uslovima izgleda da sve ćelije adaptiraju osnovne metaboličke puteve na sličan način. Naime, vrlo je verovatno da više koncentracije kiseonika od fizioloških (20%), jednako kao i niže koncentracije koje se definišu kao hipoksija (za pojedine ćelije verovatno  $\leq$  1-3%, mada ove vrednosti nisu jasno određene), proizvode ROS koji su u uslovima hipoksije u organizmu okidač za stabilizaciju HIF-1 $\alpha$  i njegovu translokaciju u jedro. U našim kulturama je pokazano da praktično sve ćelije (95%), imaju jedra pozitivna na HIF-1 $\alpha$ , a da se sa dodavanjem NAC-a taj procenat ne menja (rezultati nisu prikazani). Stabilizacija HIF-1 $\alpha$ , kompatibilna našim rezultatima, pokazana je i u jedrima humanih dečijih MMC poreklom iz koštane srži i kao i iz krvi pupčanika (Palomaki i sar., 2013). HIF-1 dalje stimuliše ekspresiju gena važnih za pojačanu glikolizu – pa se sintetišu pojedini enzimi i transporteri za glukozu kao i LDHM subjedinica laktat- dehidrogenaze (Le i sar., 2010). HIF1, takođe, stimuliše pentozo-fosfatni put (Zhao i sar., 2010). Dalje, sva količina glukoze u medijumu koja je iznad minimalnih neophodnih vrednosti za aktivaciju ćelijskog ciklusa, se u ćeliji pretvara u laktat (aktivnošću LDH<sub>5</sub>), ili se koristi za pentozo-fosfatni put i proizvodnju nukleotida važnih za brzo proliferišuće ćelije (Olivotto i dello Sbarba, 2008; Vacanti i Metallo, 2013). Tako je za MMC, kao i za druge ćelije koje aktivno proliferišu u kulturi, pokazano da im je metabolizam zasnovan na glikolizi, na šta ukazuje visok nivo aktivnosti enzima uključenih u glikolizu, kao i visoka produkcija laktata (Chen i sar., 2010; Pottappa i sar., 2011). Zapravo se smatra da je metabolizam matičnih ćelija, kao i tumorskih ćelija u uslovima *in vitro*, zasnovan na „Warburg-ovom efektu“, koji upravo opisuje intenzivnu glikolizu u ćelijama, bez obzira na prisustvo zadovoljavajućih količina kiseonika (Warburg, 1956; Pattappa i sar., 2011; Vacanti i Metallo, 2013). Na

osnovu podatka da koncentracija O<sub>2</sub> (5 i 20%) ne deluje na aktivnost laktat-dehidrogenaze, kao ni na učestalost pojedinih njenih izoformi (Gibbons i sar., 2006), možemo pretpostaviti da je koncentracija glukoze u kulturi primarni regulator aktivnosti ukupne LDH i njenih izoformi, a indirektno, putem svojih metabolita, možda i samog HIF-1 $\alpha$ . To nije nepoznati podatak u literaturi, naime povećana koncentracija glukoze u medijumu stimuliše ekspresiju HIF-1 $\alpha$  u glomerularnim mezangijalnim ćelijama (Isoe i sar., 2010).

Sa druge strane, Estrada i sar., (2013), navode podatak da fiziološka koncentracija kiseonika (3%) ima određeni pozitivan uticaj na ekspresiju gena LDHA, pa tako i sintezu LDHM subjedinice, u odnosu na 21% O<sub>2</sub> u medijumu, u MMC poreklom iz masnog tkiva. Takođe, sasvim je logično da je stepen oksidativne fosforilacije nešto veći kod ćelija koje su gajene na 21% O<sub>2</sub> (MMC poreklom iz koštane srži, Pattappa i sar., 2011).

Na osnovu svega izloženog, mogli bismo da pretpostavimo da 0,1 mM NAC verovatno utiče na metabolizam glukoze, ili na pojedine metabolite uključene u signalne puteve koji su zavisni od glukoze, pa tako posredno povećava aktivnost LDH<sub>4</sub> i LDH<sub>5</sub>. Istovremeno, s obzirom na to da NAC *in vitro* donekle imitira hipoksiju (0,1 mM NAC značajno snižava oksidativno oštećenje u svim uslovima), i to može biti način na koji NAC povećava aktivnost izoformi LDH<sub>4</sub> i LDH<sub>5</sub>.

Ukoliko sagledamo sveukupno dejstvo NAC-a, možemo zaključiti da njegovo dodavanje u kulture u koncentraciji od 0,1 i 1 mM, ima pozitivan efekat, posebno ukoliko su ćelije posle ekspanzije namenjene daljoj diferencijaciji u osteoblaste i hondroците.

## 7. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata dobijenih prilikom izrade ove doktorske disertacije mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. **Iz zubne pulpe mlečnih zuba dece moguće je izolovati populaciju ćelija koja pripada mezenhimalnim matičnim ćelijama, ali je po određenim karakteristikama heterogena.** Ćelije izolovane iz zubne pulpe imaju visok proliferativni potencijal i mogu da se diferenciraju u osteoblaste, hondroците i adipocite, ali su heterogene u odnosu na ekspresiju CD146, CD106 i STRO-1 markera, aktivnost ALDH i brzinu deoba tokom kultivacije. Viša aktivnost ALDH je bila u negativnoj korelaciji sa vremenom duplikacije ćelija u kulturi te se može pretpostaviti da su ćelije koje imaju višu aktivnost ALDH primitivnije, i da brže proliferišu.
2. **Niže koncentracije NAC-a (0,1 mM i 1 mM), *in vitro*, povećavaju broj ćelija u kulturi.** Niže koncentracije NAC-a stimulišu proliferaciju jedne manje populacije ćelija, povećavaju broj ALDH<sup>+</sup> ćelija, smanjuju broj starih ćelija i povećavaju relativnu aktivnost LDH<sub>4</sub> i LDH<sub>5</sub> izoformi laktat-dehidrogenaze (što ukazuje na ubranu glikolizu). Sve navedene promene mogu indirektno objasniti ubrzanje proliferacije i povećanje broja ćelija u kulturama tretiranim nižim koncentracijama NAC-a.
3. **Niže koncentracije NAC-a (0,1 mM i 1 mM), *in vitro*, značajno smanjuju oksidativno oštećenje na nivou ćelija.** Dodavanje NAC-a posle 24 sata smanjuje stepen oksidativnog oštećenja lipida (smanjena je koncentracija MDA) i proteina (smanjen sadržaj karbonilnih grupa), dok sadržaj -SH grupa raste. Nakon tretmana nižim koncentracijama NAC-a dolazi i do smanjenja aktivnosti SOD i katalaze. S obzirom na to da je pad aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u korelaciji sa smanjenjem oksidativnog oštećenja ćelijskih makromolekula, efekat koji smo dobili bi se bar delom mogao objasniti kao adaptivan odgovor ćelija na smanjenje ROS, odnosno smanjeno stvaranje ROS je praćeno i smanjenjem aktivnosti enzima neophodnih za njihovu neutralizaciju.
4. **Viša koncentracija NAC-a (2 mM), *in vitro*, smanjuje broj ćelija u kulturi.** Viša koncentracija NAC-a (2 mM), *in vitro*, smanjuje broj ćelija u kulturi inhibirajući proliferaciju jedne manje populacije ćelija i povećavajući broj ćelija

u apoptozi i broj starih ćelija, iako ne utiče značajno na njihov oksidativni status. Navedene promene mogu objasniti smanjenje broja ćelija prilikom primene 2 mM NAC-a.

5. **NAC dozno zavisno stimuliše osteogenezu i hondrogenezu, a inhibira adipogenezu.** Zbog toga, tretiranje matičnih ćelija izolovanih iz pulpe mlečnih zuba dece niskim koncentracijama NAC-a može naći primenu tokom njihove *ex vivo* ekspanzije, ukoliko su ćelije namenjene za regeneraciju koštanog ili hrskavičavog tkiva.

## 8. LITERATURA

1. **Abdi R, Fiorina P, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH.** Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes*, 2008; 57:1759-1767.
2. **Aebi H.** Catalase in vitro. *Methods Enzimol*, 1984; 105:121-126.
3. **Ahmadi-Ashtiani H, Allameh A, Rastegar H, Soleimani M, Barkhordari E.** Inhibition of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase by silymarin in proliferating mesenchymal stem cells: comparison with glutathione modifiers. *J Nat Med*, 2012; 66:85-94.
4. **Akintoye SO, Lam T, Shi S, Brahim J, Collins MT, Robey PG.** Skeletal site-specific characterization of orofacial and iliac crest human bone marrow stromal cells in same individuals. *Bone*, 2006; 38:758-768.
5. **Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB.** Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992; 89:10114-10118.
6. **Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M.** Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum*, 2004; 50:1522-1532.
7. **Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Hoffman RM.** Multipotent hair follicle stem cells promote repair of spinal cord injury and recovery of walking function. *Cell Cycle*, 2008; 7:1865-1869.
8. **Angelova Volponi A, Kawasaki M, Sharpe PT.** Adult human gingival epithelial cells as a source for whole-tooth bioengineering. *J Dent Res*, 2013; 92:329-334.
9. **Arai F, Ohneda O, Miyamoto T, Zhang XQ, Suda T.** Mesenchymal stem cells in perichondrium express activated leukocyte cell adhesion molecule and participate in bone marrow formation. *J Exp Med*, 2002; 195:1549-1563.
10. **Aubin JE.** Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl*, 1998; 30-31:73-82.
11. **Baksh D, Yao R, Tuan RS.** Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*, 2007; 25:1384-1392.
12. **Balint B, Ivanović Z, Petakov M, Taseski J, Jovčić G, Stojanović N, Milenković P.** The cryopreservation protocol optimal for progenitor recovery is not optimal for preservation of marrow repopulating ability. *Bone Marrow Transplant*, 1999; 23:613-619.

13. **Basciano L, Nemos C, Foliguet B, de Isla N, de Carvalho M, Tran N, Dalloul A.** Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. *BMC Cell Biol*, 2011; 12:12.
14. **Baynes JW.** Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, 1991; 40:405-412.
15. **Bento LW, Zhang Z, Imai A, Nör F, Dong Z, Shi S, Araujo FB, Nör JE.** Endothelial differentiation of SHED requires MEK1/ERK signaling. *J Dent Res*, 2013; 92:51-57.
16. **Berniakovich I, Laricchia-Robbio L, Izpisua Belmonte JC.** N-acetylcysteine protects induced pluripotent stem cells from in vitro stress: impact on differentiation outcome. *Int J Dev Biol*, 2012; 56:729-735.
17. **Bi Y, Ehrichtou D, Kilts TM, Inkson CA, Embree MC, Sonoyama W, Li L, Leet AI, Seo BM, Zhang L, Shi S, Young MF.** Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med*, 2007; 13:1219-1227.
18. **Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG.** Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, 2001; 19:180-192.
19. **Bianco P, Robey PG, Simmons PJ.** Mesenchymal stem cells: Revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*, 2008; 2: 313–319.
20. **Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS.** Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*, 2004; 93:1210-1230.
21. **Boroujeni Z, Aleyasin A.** Human umbilical cord derived mesenchymal stem cells can secret insulin in vitro and in vivo. *Biotechnol Appl Biochem*, 2013 May 31. doi: 10.1002/bab.1127.
22. **Brand KA, Hermfisse U.** Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB J*, 1997; 11:388-395.
23. **Brandl C, Kaesbauer J, Weber BH, Morsczech C.** Spontaneous immortalization of neural crest-derived corneal progenitor cells after chromosomal aberration. *Cell Prolif*, 2010; 43:372-327.
24. **Braut A, Kollar EJ, Mina M.** Analysis of the odontogenic and osteogenic potentials of dental pulp in vivo using a Col1a1-2.3-GFP transgene. *Int J Dev Biol*, 2003; 47:281-292.

25. **Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L.** Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*, 1994; 331:889-895.
26. **Brocker C, Cantore M, Failli P, Vasiliou V.** Aldehyde dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) attenuates reactive aldehyde and oxidative stress induced cytotoxicity. *Chem Biol Interact*, 2011; 191:269-277.
27. **Calzadilla P, Sapochnik D, Cosentino S, Diz V, Dicio L, Calvo JC, Guerra LN.** N-Acetylcysteine reduces markers of differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *Int J Mol Sci*, 2011; 12:6936-6951.
28. **Caplan AI, Correa D.** The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell*, 2011; 9:11-15.
29. **Caplan AI.** Mesenchymal Stem Cells. *J Ortho Res*, 1991; 9:641-650.
30. **Caplan AI.** Muscle, cartilage and bone development and differentiation from chick limb mesenchymal cells. In: Ede DA, Hinchliffe JR, Balls M, editors. *Vertebrate Limb and Somite Morphogenesis*. Cambridge: Cambridge University Press; 1977; pp. 199-213.
31. **Caplan AI.** The mesengenic process. *Clin Plast Surg*, 1994; 21:429-435.
32. **Carrière A, Fernandez Y, Rigoulet M, Pénicaud L, Casteilla L.** Inhibition of preadipocyte proliferation by mitochondrial reactive oxygen species. *FEBS Lett*, 2003; 550:163-167.
33. **Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J.** Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, 2007; 25:2739-2749.
34. **Chen C, Liu Y, Liu R, Ikenoue T, Guan KL, Liu Y, Zheng P.** TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species. *J Exp Med*, 2008; 205:2397-2408.
35. **Chen CT, Hsu SH, Wei YH.** Upregulation of mitochondrial function and antioxidant defense in the differentiation of stem cells. *Biochim Biophys Acta*, 2010; 1800:257-263.
36. **Chen CT, Shih YR, Kuo TK, Lee OK, Wei YH.** Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2008; 264:960-968.
37. **Chen CW, Montelatici E, Crisan M, Corselli M, Huard J, Lazzari L, Péault B.** Perivascular multi-lineage progenitor cells in human organs: regenerative



- units, cytokine sources or both? Cytokine Growth Factor Rev, 2009; 20:429-434.
38. **Chen K, Huang YH, Chen JL.** Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol Sin*, 2013; 34:732-740.
39. **Chen XD.** Extracellular matrix provides an optimal niche for the maintenance and propagation of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2010; 90:45-54.
40. **Clinicaltrials.gov:** Available at: <http://www.clinicaltrials.gov>
41. **Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Riso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A.** Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, 2006; 107:367-372.
42. **Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, Smith AJ, Nör JE.** Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod*, 2008; 34:962-969.
43. **Cosgrove JP, Church DF, Pryor WA.** The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 1987; 22:299-304.
44. **Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, Silva WA Jr, Orellana MD, Freitas MC, Neder L, Santos AR, Peres LC, Jamur MC, Zago MA.** Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol*, 2008; 36:642-654.
45. **Christopherson SW, Glass RL.** Preparation of milk fat methyl esters by alcoholysis in an essentially nonalcoholic solution. *J. Dairy Sci*, 1969; 52:1289-1290.
46. **Cynamon HA, Isenberg JN, Nguyen CH.** A rapid method for erythrocyte membrane phospholipid determination. *Clin Chim Acta*, 1984; 144:65-70.
47. **da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB.** In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2008; 26:2287-2299.
48. **Dave SD, Vanikar AV, Trivedi HL.** Extrinsic factors promoting in vitro differentiation of insulin-secreting cells from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013; 170:962-971.
49. **Dave SD, Vanikar AV, Trivedi HL.** In-vitro generation of human adipose tissue derived insulin secreting cells: up-regulation of Pax-6, Ipf-1 and Isl-1. *Cytotechnology*, 2013 May 9.
50. **de Almeida FM, Marques SA, Ramalho Bdos S, Rodrigues RF, Cadilhe DV, Furtado D, Kerkis I, Pereira LV, Rehen SK, Martinez AM.** Human dental

pulp cells: a new source of cell therapy in a mouse model of compressive spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 2011; 28:1939-1949.

51. **De Boer J, Wang HJ, Van Blitterswijk C.** Effects of Wnt signaling on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng*, 2004; 10:393-401.
52. **De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S, Atala A.** Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol*, 2007; 25:100-106.
53. **de Mendonça Costa A, Bueno DF, Martins MT, Kerkis I, Kerkis A, Fanganiello RD, Cerruti H, Alonso N, Passos-Bueno MR.** Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. *J Craniofac Surg*, 2008; 19:204-210.
54. **Dexter TM, Wright EG, Krizsa F, Lajtha LG.** Regulation of haemopoietic stem cell proliferation in long term bone marrow cultures. *Biomedicine*, 1977; 27:344-349.
55. **Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano E, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O.** A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; 92:9363-9367.
56. **Djokic J, Tomic S, Cerovic S, Todorović V, Rudolf R, Colić M.** Characterization and immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells from periapical lesions. *J Clin Periodontol*, 2012; 39:807-816.
57. **Dolle P.** Developmental expression of retinoic acid receptors (RARs). *Nucl Recept Signal*, 2009; 7:e006.
58. **Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM.** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006; 8:315-317.
59. **Du Y, Funderburgh ML, Mann MM, SundarRaj N, Funderburgh JL.** Multipotent stem cells in human corneal stroma. *Stem Cells*, 2005; 23:1266-1275.
60. **Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS, Bartlett JD, Vacanti JP, Yelick PC.** Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res*, 2004; 83:523-528.
61. **Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G.** *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 1997; 89:747-754.

62. **Dzierzak E, Philipsen S.** Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013; 3:a011601.
63. **Ellman GL.** Tissue sulhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 1959; 82:70-77.
64. **Emadedin M, Aghdami N, Taghiyar L, Fazeli R, Moghadasali R, Jahangir S, Farjad R, Baghaban Eslaminejad M.** Intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in six patients with knee osteoarthritis. *Arch Iran Med*, 2012; 15:422-428.
65. **Estrada JC, Torres Y, Benguría A, Dopazo A, Roche E, Carrera-Quintanar L, Pérez RA, Enríquez JA, Torres R, Ramírez JC, Samper E, Bernad A.** Human mesenchymal stem cell-replicative senescence and oxidative stress are closely linked to aneuploidy. *Cell Death Dis*, 2013; 4:e691.
66. **Ezashi T, Das P, Roberts RM.** Low O<sub>2</sub> tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005; 102:4783-4788.
67. **Fan J, Hitosugi T, Chung TW, Xie J, Ge Q, Gu TL, Polakiewicz RD, Chen GZ, Boggon TJ, Lonial S, Khuri FR, Kang S, Chen J.** Tyrosine phosphorylation of lactate dehydrogenase A is important for NADH/NAD(+) redox homeostasis in cancer cells. *Mol Cell Biol*, 2011; 31:4938-4950.
68. **Fan JL, Cai HB, Tan WS.** Effect of regulating intracellular ROS with antioxidants on the ex vivo expansion of cord blood CD34+ cells. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2008; 24:767-770.
69. **Fan J, Cai H, Yang S, Yan L, Tan W.** Comparison between the effects of normoxia and hypoxia on antioxidant enzymes and glutathione redox state in ex vivo culture of CD34(+) cells. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2008;151:153-158.
70. **Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitinger S, Kloss F, Güllly C, Gassner R, Lepperdinger G.** Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell*, 2007; 6:745-757.
71. **Finkel T.** Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett*, 2000; 476:52–54.
72. **Fischer L, Boland G, Tuan RS.** Wnt-3A enhances bone morphogenetic protein-2-mediated chondrogenesis of murine C3H10T1/2 mesenchymal cells. *J Biol Chem*, 2002; 277:30870–30878.
73. **Freeman HJ.** Crypt region localization of intestinal stem cells in adults. *World J Gastroenterol*, 2008; 14:7160-7162.

74. **Frenette PS, Pinho S, Lucas D, Scheiermann C.** Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annu Rev Immunol*, 2013; 31:285-316.
75. **Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS.** The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, 1970; 3:393-403.
76. **Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV.** Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*, 1974; 17:331-40.
77. **Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV.** Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*, 1966; 16:381-390.
78. **Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K.** Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells*, 2004; 22:649-658.
79. **Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM, Nguyen HP, Wu D.** Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol Reprod*, 2009; 80:1136-1145.
80. **Garmy-Susini B, Jin H, Zhu Y, Sung RJ, Hwang R, Varner J.** Integrin alpha4beta1-VCAM-1-mediated adhesion between endothelial and mural cells is required for blood vessel maturation. *J Clin Invest*, 2005; 115:1542-1551.
81. **Geißler S, Textor M, Kühnisch J, Könnig D, Klein O, Ode A, Pfitzner T, Adjaye J, Kasper G, Duda GN.** Functional comparison of chronological and in vitro aging: differential role of the cytoskeleton and mitochondria in mesenchymal stromal cells. *PLoS One*, 2012; 7:e52700.
82. **Gibbons J, Hewitt E, Gardner DK.** Effects of oxygen tension on the establishment and lactate dehydrogenase activity of murine embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells*, 2006; 8:117-122.
83. **Gopurappilly R, Bhat V, Bhonde R.** Pancreatic tissue resident mesenchymal stromal cell (MSC)-like cells as a source of in vitro islet neogenesis. *J Cell Biochem*, 2013; 114:2240-2247.
84. **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; 97:13625-13630.
85. **Gurusamy N, Mukherjee S, Lekli I, Bearzi C, Bardelli S, Das DK.** Inhibition of ref-1 stimulates the production of reactive oxygen species and induces differentiation in adult cardiac stem cells. *Antioxid Redox Signal*, 2009; 11:589-600.

86. **Halfon S, Abramov N, Grinblat B, Ginis I.** Markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts are downregulated with passaging. *Stem Cells Dev*, 2011; 20:53-66.
87. **Halliwell B, Chirico S.** Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*, 1993; 57:715S-724S.
88. **Hao H, Chen G, Liu J, Ti D, Zhao Y, Xu S, Fu X, Han W.** Culturing on Wharton's jelly extract delays mesenchymal stem cell senescence through p53 and p16INK4a/pRb pathways. *PLoS One*, 2013; 8:e58314.
89. **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; 147:105–120.
90. **Harley CB, Futcher AB, Greider CW.** Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 1990; 345:458-460.
91. **Hayflick L.** The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 1965; 37:614–636.
92. **He H, Yu J, Liu Y, Lu S, Liu H, Shi J, Jin Y.** Effects of FGF2 and TGFβ1 on the differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Cell Biol Int*, 2008; 32:827-34.
93. **Held KD, Biaglow JE.** Mechanisms for the oxygen radical-mediated toxicity of various thiol-containing compounds in cultured mammalian cells. *Radiat Res*, 1994; 139:15-23.
94. **Heo JY, Jing K, Song KS, Seo KS, Park JH, Kim JS, Jung YJ, Hur GM, Jo DY, Kweon GR, Yoon WH, Lim K, Hwang BD, Jeon BH, Park JI.** Downregulation of APE1/Ref-1 is involved in the senescence of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2009; 27:1455-1462.
95. **Hermitte F, Brunet de la Grange P, Belloc F, Praloran V, Ivanovic Z.** Very low O<sub>2</sub> concentration (0,1%) favors G<sub>0</sub> return of dividing CD34+ cells. *Stem Cells*, 2006; 24:65-73.
96. **Hofmann AD, Beyer M, Krause-Buchholz U, Wobus M, Bornhäuser M, Rödel G.** OXPHOS supercomplexes as a hallmark of the mitochondrial phenotype of adipogenic differentiated human MSCs. *PLoS One*, 2012; 7:e35160.
97. **Huang AH, Snyder BR, Cheng PH, Chan AW.** Putative dental pulp-derived stem/stromal cells promote proliferation and differentiation of endogenous neural cells in the hippocampus of mice. *Stem Cells*, 2008; 26:2654-2663.

98. **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; 88:792-806.
99. **Huntly BJ, Gilliland DG.** Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat Rev Cancer*, 2005; 5:311-321.
100. **Iida K, Takeda-Kawaguchi T, Tezuka Y, Kunisada T, Shibata T, Tezuka K.** Hypoxia enhances colony formation and proliferation but inhibits differentiation of human dental pulp cells. *Arch Oral Biol*, 2010; 55:648-654.
101. **Imbesi S, Musolino C, Allegra A, Saija A, Morabito F, Calapai G, Gangemi S.** Oxidative stress in oncohematologic diseases: an update. *Expert Rev Hematol*, 2013; 6:317-325.
102. **Ishkitiev N, Yaegaki K, Imai T, Tanaka T, Nakahara T, Ishikawa H, Mitev V, Haapasalo M.** High-purity hepatic lineage differentiated from dental pulp stem cells in serum-free medium. *J Endod*, 2012; 38:475-480.
103. **Isoe T, Makino Y, Mizumoto K, Sakagami H, Fujita Y, Honjo J, Takiyama Y, Itoh H, Haneda M.** High glucose activates HIF-1-mediated signal transduction in glomerular mesangial cells through a carbohydrate response element binding protein. *Kidney Int*, 2010; 78:48-59.
104. **Ivan M, Kaelin WG Jr.** The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Curr Opin Genet Dev*, 2001; 11:27-34.
105. **Ivanovic Z, Boiron JM.** Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells: concept and clinical benefit. *Transfus Clin Biol*, 2009; 16:489-500.
106. **Ivanović Z, Dello Sbarba P, Trimoreau F, Faucher JL, Praloran V.** Primitive human HPCs are better maintained and expanded in vitro at 1 percent oxygen than at 20 percent. *Transfusion*, 2000; 40:1482-1488.
107. **Ivanovic Z.** Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *J Cell Physiol*, 2009; 219:271-275.
108. **Ishikawa Y, Ida-Yonemochi H, Nakakura-Ohshima K, Ohshima H.** The relationship between cell proliferation and differentiation and mapping of putative dental pulp stem/progenitor cells during mouse molar development by chasing BrdU-labeling. *Cell Tissue Res*, 2012; 348:95-107.
109. **Jahoda CA, Whitehouse J, Reynolds AJ, Hole N.** Hair follicle dermal cells differentiate into adipogenic and osteogenic lineages. *Exp Dermatol*, 2003; 12:849-859.
110. **Jaussaud J, Biais M, Calderon J, Chevaleyre J, Ducheux P, Ivanovic Z, Couffignal T, Barandon L.** Hypoxia-preconditioned mesenchymal stromal

- cells improve cardiac function in a swine model of chronic myocardial ischaemia. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2013; 43:1050-1057.
111. **Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW.** Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol*, 2004; 32:414-425.
  112. **Jeon EJ, Lee KY, Choi NS, Lee MH, Kim HN, Jin YH, Ryoo HM, Choi JY, Yoshida M, Nishino N, Oh BC, Lee KS, Lee YH, Bae SC.** Bone morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation. *J Biol Chem*, 2006; 281:16502-16511.
  113. **Ji H, Liu Y, Zhao X, Zhang M.** N-acetyl-L-cysteine enhances the osteogenic differentiation and inhibits the adipogenic differentiation through up regulation of Wnt 5a and down regulation of PPARG in bone marrow stromal cells. *Biomed Pharmacother*, 2011; 65:369-374.
  114. **Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N.** Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 2005; 105:4120-4126.
  115. **Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH, Choung YH, Kim ES, Yang HC, Choung PH.** Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng*, 2007; 13:767-773.
  116. **Jun JH, Lee SH, Kwak HB, Lee ZH, Seo SB, Woo KM, Ryoo HM, Kim GS, Baek JH.** N-acetylcysteine stimulates osteoblastic differentiation of mouse calvarial cells. *J Cell Biochem*, 2008; 103:1246-1255.
  117. **Kanda Y, Hinata T, Kang SW, Watanabe Y.** Reactive oxygen species mediate adipocyte differentiation in mesenchymal stem cells. *Life Sci*, 2011; 89:250-258.
  118. **Kaneko R, Akita H, Shimauchi H, Sasano Y.** Immunohistochemical localization of the STRO-1 antigen in developing rat teeth by light microscopy and electron microscopy. *J Electron Microsc (Tokyo)*, 2009; 58:363-373.
  119. **Karamzadeh R, Eslaminejad MB.** Dental-Related Stem Cells and Their Potential in Regenerative Medicine. In: *Andrades JA, editor. Regenerative Medicine and Tissue Engineering.* Hampshire: InTech; 2013; pp. 95-116.
  120. **Keller LH.** Bone marrow-derived aldehyde dehydrogenase-bright stem and progenitor cells for ischemic repair. *Congest Heart Fail*, 2009; 15:202-206.
  121. **Kelly GS.** Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev*, 1998; 3: 114-127.
  122. **Kerkis I, Caplan AI.** Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. *Tissue Eng Part B Rev*, 2012; 18:129-138.
  123. **Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, Caplan AI, Cerruti HF.** Isolation and characterization of a

population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cells markers. *Cells Tissues Organs*, 2000; 184:105-16.

124. **Khoo ML, Shen B, Tao H, Ma DD.** Long-term serial passage and neuronal differentiation capability of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 2008; 17:883-896.
125. **Kim GH, Song DK, Cho CH, Yoo SK, Kim DK, Park GY, Suh SI, Jang BC, Lim JG.** Muscular cell proliferative and protective effects of N-acetylcysteine by modulating activity of extracellular signal-regulated protein kinase. *Life Sci*, 2006; 79:622-628.
126. **Kim J, Kang JW, Park JH, Choi Y, Choi KS, Park KD, Baek DH, Seong SK, Min HK, Kim HS.** Biological characterization of long-term cultured human mesenchymal stem cells. *Arch Pharm Res*, 2009; 32:117-126.
127. **Kirkwood TB, Austad SN.** Why do we age? *Nature*, 2000; 408:233–238.
128. **Kode JA, Mukherjee S, Joglekar MV, Hardikar AA.** Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy*, 2009; 11:377-91.
129. **Koepke JI, Nakrieko KA, Wood CS, Boucher KK, Terlecky LJ, Walton PA, Terlecky SR.** Restoration of peroxisomal catalase import in a model of human cellular aging. *Traffic*, 2007; 8:1590-1600.
130. **Kojima N, Yamada M, Paranjpe A, Tsukimura N, Kubo K, Jewett A, Ogawa T.** Restored viability and function of dental pulp cells on poly-methylmethacrylate (PMMA)-based dental resin supplemented with N-acetyl cysteine (NAC). *Dent Mater*, 2008; 24:1686-1693.
131. **Kolf CM, Cho E, Tuan RS.** Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther*, 2007; 9:204.
132. **Kong D, Kotraiah V.** Modulation of aldehyde dehydrogenase activity affects ( $\pm$ )-4-hydroxy-2E-nonenal (HNE) toxicity and HNE-protein adduct levels in PC12 cells. *J Mol Neurosci*, 2012; 47:595-603.
133. **Kordes C, Sawitza I, Götze S, Häussinger D.** Hepatic stellate cells support hematopoiesis and are liver-resident mesenchymal stem cells. *Cell Physiol Biochem*, 2013; 31:290-304.
134. **Kovačević-Filipović M, Petakov M, Hermitte F, Debeissat C, Krstić A, Jovčić G, Bugarski D, Lafarge X, Milenković P, Praloran V, Ivanović Z.** Interleukin-6 (IL-6) and low O<sub>2</sub> concentration (1%) synergize to improve the maintenance of hematopoietic stem cells (pre-CFC). *J Cell Physiol*, 2007; 212:68-75.



135. **Koyama N, Okubo Y, Nakao K, Bessho K.** Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. *J Oral Maxillofac Surg*, 2009; 67:501-506.
136. **Ksiazek K.** A comprehensive review on mesenchymal stem cell growth and senescence. *Rejuvenation Res*, 2009; 12:105-116.
137. **Kuhn NZ, Tuan RS.** Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. *J Cell Physiol*, 2010; 222:268-77.
138. **Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS.** The essence of senescence. *Genes Dev*, 2010; 24:2463-2479.
139. **Lačković V, Nikolić IR, Todorović V.** Digestivni sistem USNA DUPLJA. U: Nikolić IR, editor. *Osnovna i oralna histologija i embriologija*. Beograd: Data Status; 2012; str. 208.
140. **Lakshmipathy U, Verfaillie C.** Stem cell plasticity. *Blood Reviews*, 2005; 19: 29–38.
141. **Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM, Royer RE, Vander Jagt DL, Semenza GL, Dang CV.** Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010; 107:2037-2042.
142. **Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J Jr, Dionne L, Lu N, Huang S, Matzuk MM.** Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996; 93:9782-9787.
143. **Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, DiMaio D, Hwang ES.** Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*, 2006; 5:187-195.
144. **Léobon B, Roncalli J, Joffre C, Mazo M, Boisson M, Barreau C, Calise D, Arnaud E, André M, Pucéat M, Pénicaud L, Prosper F, Planat-Bénard V, Casteilla L.** Adipose-derived cardiomyogenic cells: in vitro expansion and functional improvement in a mouse model of myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 2009; 83:757-767.
145. **Leroux L, Descamps B, Tojais NF, Séguy B, Oses P, Moreau C, Daret D, Ivanovic Z, Boiron JM, Lamazière JM, Dufourcq P, Couffinhal T, Duplâa C.** Hypoxia preconditioned mesenchymal stem cells improve vascular and skeletal muscle fiber regeneration after ischemia through a Wnt4-dependent pathway. *Mol Ther*, 2010; 18:1545-1552.

146. **Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER.** Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, 1990; 186:464-478.
147. **Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E.** Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, 1994; 233:346-357.
148. **Li B, Qu C, Chen C, Liu Y, Akiyama K, Yang R, Chen F, Zhao Y, Shi S.** Basic fibroblast growth factor inhibits osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth through ERK signaling. *Oral Dis*, 2012; 18:285-292.
149. **Li DR, Cai JH.** Methods of isolation, expansion, differentiating induction and preservation of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Chin Med J Engl*, 2012; 125:4504-4510.
150. **Li R, Chen B, Wang G, Yu B, Ren G, Ni G.** Effects of mechanical strain on oxygen free radical system in bone marrow mesenchymal stem cells from children. *Injury*, 2011; 42:753-757.
151. **Li Y, Lü X, Sun X, Bai S, Li S, Shi J.** Odontoblast-like cell differentiation and dentin formation induced with TGF- $\beta$ 1. *Arch Oral Biol*, 2011; 56:1221-1229.
152. **Lin TM, Tsai JL, Lin SD, Lai CS, Chang CC.** Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants. *Stem Cells Dev*, 2005; 14:92-102.
153. **Linde A, Ljunggren A.** Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns of human dental pulp. *J Dent Res*, 1970; 49:Suppl:1469-1472.
154. **Liu J, Hinkhouse MM, Sun W, Weydert CJ, Ritchie JM, Oberley LW, Cullen JJ.** Redox regulation of pancreatic cancer cell growth: role of glutathione peroxidase in the suppression of the malignant phenotype. *Hum Gene Ther*, 2004; 15:239-250.
155. **Lizier NF, Kerkis A, Gomes CM, Hebling J, Oliveira CF, Caplan AI, Kerkis I.** Scaling-up of dental pulp stem cells isolated from multiple niches. *PLoS One*, 2012; 7:e39885.
156. **Luo Z, Chen Y, Chen S, Welch WJ, Andresen BT, Jose PA, Wilcox CS.** Comparison of inhibitors of superoxide generation in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*, 2009; 157:935-943.
157. **Lyons AB, Parish CR.** Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods*, 1994; 171:131-137

158. **Ma L, Feng XY, Cui BL, Law F, Jiang XW, Yang LY, Xie QD, Huang TH.** Human umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells differentiation into nerve-like cells. *Chin Med J (Engl)*, 2005; 118:1987-1993.
159. **Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF.** Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng*, 1998; 4:415-428.
160. **Marchitti SA, Brocker C, Stagos D, Vasiliou V.** Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2008; 4:697-720.
161. **Mareschi K, Rustichelli D, Comunanza V, De Fazio R, Cravero C, Morterra G, Martinoglio B, Medico E, Carbone E, Benedetto C, Fagioli F.** Multipotent mesenchymal stem cells from amniotic fluid originate neural precursors with functional voltage-gated sodium channels. *Cytotherapy*, 2009; 11:534-547.
162. **Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R.** HIF-1alpha modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Rev Med Chem*, 2009; 9:1084-1101.
163. **Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P.** Function of retinoic acid receptors during embryonic development. *Nucl Recept Signal*, 2009; 7:e002.
164. **Marnett LJ.** Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res*, 1999; 424:83-95.
165. **Marnett LJ.** Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*, 2002; 181-182:219-222.
166. **Marnett LJ.** Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 2000; 21:361-370.
167. **Martin I, Baldomero H, Bocelli-Tyndall C, Passweg J, Saris D, Tyndall A.** The survey on cellular and engineered tissue therapies in Europe in 2010. *Tissue Eng Part A*, 2012; 18:2268-2279.
168. **Martin-Rendon E, Sweeney D, Lu F, Girdlestone J, Navarrete C, Watt SM.** 5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes in vitro at high frequencies, *Vox Sang*, 2008; 95:137-48
169. **Maximov A.** Cultures of blood leucocytes. From leucocyte and monocyte to connective tissue. *Arch exp Zellforsch*, 1928; 5:169-178.
170. **McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS.** Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell*, 2004; 6:483-495.

171. **McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase.** An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J Biol Chem*, 1969; 244:6049-6055.
172. **Melk A, Kittikowit W, Sandhu I, Halloran KM, Grimm P, Schmidt BM, Halloran PF.** Cell senescence in rat kidneys in vivo increases with growth and age despite lack of telomere shortening. *Kidney Int*, 2003; 63:2134–2143.
173. **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.
174. **Menon SG, Sarsour EH, Kalen AL, Venkataraman S, Hitchler MJ, Domann FE, Oberley LW, Goswami PC.** Superoxide signaling mediates N-acetyl-L-cysteine-induced G1 arrest: regulatory role of cyclin D1 and manganese superoxide dismutase. *Cancer Res*, 2007; 67:6392-6399.
175. **Minamikawa H, Yamada M, Deyama Y, Suzuki K, Kaga M, Yawaka Y, Ogawa T.** Effect of N-acetylcysteine on rat dental pulp cells cultured on mineral trioxide aggregate. *J Endod*, 2011; 37:637-641.
176. **Misra HP, Fridovich I.** The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 1972; 247:3170-3175.
177. **Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S.** SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003; 100:5807-5812.
178. **Mofarrahi M, Brandes RP, Gorlach A, Hanze J, Terada LS, Quinn MT, Mayaki D, Petrof B, Hussain SN.** Regulation of proliferation of skeletal muscle precursor cells by NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal*, 2008; 10:559-574.
179. **Moreb JS, Ucar D, Han S, Amory JK, Goldstein AS, Ostmark B, Chang LJ.** The enzymatic activity of human aldehyde dehydrogenases 1A2 and 2 (ALDH1A2 and ALDH2) is detected by Aldefluor, inhibited by diethylaminobenzaldehyde and has significant effects on cell proliferation and drug resistance. *Chem Biol Interact*, 2012; 195:52-60.
180. **Moreb JS, Zucali JR, Ostmark B, Benson NA.** Heterogeneity of aldehyde dehydrogenase expression in lung cancer cell lines is revealed by Aldefluor flow cytometry-based assay. *Cytometry B Clin Cytom*, 2007; 72:281-289.
181. **Morita K, Miyamoto T, Fujita N, Kubota Y, Ito K, Takubo K, Miyamoto K, Ninomiya K, Suzuki T, Iwasaki R, Yagi M, Takaishi H, Toyama Y, Suda T.** Reactive oxygen species induce chondrocyte hypertrophy in endochondral ossification. *J Exp Med*, 2007; 204:1613-1623.

182. **Morito A, Kida Y, Suzuki K, Inoue K, Kuroda N, Gomi K, Arai T, Sato T.** Effects of basic fibroblast growth factor on the development of the stem cell properties of human dental pulp cells. *Arch Histol Cytol*, 2009; 72:51-64.
183. **Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, Sippel C, Hoffmann KH.** Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol*, 2005; 24:155-165.
184. **Morsczeck C, Schmalz G, Reichert TE, Volner F, Galler K, Driemel O.** Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Invest*, 2008; 12:113-118.
185. **Muraglia A, Cancedda R, Quarto R.** Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci*, 2000; 113:1161-1166.
186. **Muzio G, Maggiora M, Paiuzzi E, Oraldi M, Canuto RA.** Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation. *Free Radic Biol Med*, 2012; 52:735-746.
187. **Nagano M, Kimura K, Yamashita T, Ohneda K, Nozawa D, Hamada H, Yoshikawa H, Ochiai N, Ohneda O.** Hypoxia responsive mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood are effective for bone repair. *Stem Cells Dev*, 2010; 19:1195-1210.
188. **Nakagami H, Morishita R, Maeda K, Kikuchi Y, Ogihara T, Kaneda Y.** Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *J Atheroscler Thromb*, 2006; 13:77-81.
189. **Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, Sugito T, Ito K, Ueda M.** Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. *J Endod*, 2009; 35:1536-1542.
190. **Nakashima M, Iohara K, Sugiyama M.** Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009; 20:435-40.
191. **Nam H, Lee G.** Identification of novel epithelial stem cell-like cells in human deciduous dental pulp. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009; 386:135-139.
192. **Nibley WE, Spangrude GJ.** Primitive stem cells alone mediate rapid marrow recovery and multilineage engraftment after transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 1998; 21:345-354.
193. **Noer A, Boquest AC, Collas P.** Dynamics of adipogenic promoter DNA methylation during clonal culture of human adipose stem cells to senescence. *BMC Cell Biol*, 2007; 8:18.
194. **Noh YH, Chob HS, Kim DH, Kim OH, Park J, Lee SA, Yang HS, Sohn DS, Kim W, Kim D, Chung YH, Kim KY, Kim SS, Lee WB.** N-acetylcysteine

enhances neuronal differentiation of P19 embryonic stem cells via Akt and N-cadherin activation. *Mol Biol (Mosk)*, 2012; 46:741-746.

195. **Nourbakhsh N, Soleimani M, Taghipour Z, Karbalaie K, Mousavi SB, Talebi A, Nadali F, Tanhaei S, Kiyani GA, Nematollahi M, Rabiei F, Mardani M, Bahramiyan H, Torabinejad M, Nasr-Esfahani MH, Baharvand H.** Induced in vitro differentiation of neural-like cells from human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells. *Int J Dev Biol*, 2011; 55:189-195.
196. **Nuttall ME, Patton AJ, Olivera DL, Nadeau DP, Gowen M.** Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders. *J Bone Miner Res*, 1998; 13:371-82.
197. **Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, Pavletich N, Chau V, Kaelin WG.** Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol*, 2000; 2:423-427.
198. **Olivotto M, Dello Sbarba P.** Environmental restrictions within tumor ecosystems select for a convergent, hypoxia-resistant phenotype of cancer stem cells. *Cell Cycle*, 2008; 7:176-187.
199. **Orciani M, Gorbi S, Benedetti M, Di Benedetto G, Mattioli-Belmonte M, Regoli F, Di Primio R.** Oxidative stress defense in human-skin-derived mesenchymal stem cells versus human keratinocytes: Different mechanisms of protection and cell selection. *Free Radic Biol Med*, 2010; 49:830-838.
200. **Osathanon T, Nowwarote N, Pavasant P.** Basic fibroblast growth factor inhibits mineralization but induces neuronal differentiation by human dental pulp stem cells through a FGFR and PLC $\gamma$  signaling pathway. *J Cell Biochem*, 2011; 112:1807-1816.
201. **Oshima M, Mizuno M, Imamura A, Ogawa M, Yasukawa M, Yamazaki H, Morita R, Ikeda E, Nakao K, Takano-Yamamoto T, Kasugai S, Saito M, Tsuji T.** Functional tooth regeneration using a bioengineered tooth unit as a mature organ replacement regenerative therapy. *PLoS One*, 2011; 6:e21531.
202. **Palomäki S, Pietilä M, Laitinen S, Pesälä J, Sormunen R, Lehenkari P, Koivunen P.** HIF-1 $\alpha$  is Upregulated in Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 2013 Jun 6. doi: 10.1002/stem.1435.
203. **Paranjpe A, Cacalano NA, Hume WR, Jewett A.** N-acetylcysteine protects dental pulp stromal cells from HEMA-induced apoptosis by inducing differentiation of the cells. *Free Radic Biol Med*, 2007; 43:1394-1408.
204. **Park SR, Oreffo RO, Triffitt JT.** Interconversion potential of cloned human marrow adipocytes in vitro. *Bone*, 1999; 24:549-554.

205. **Patel M, Smith AJ, Sloan AJ, Smith G, Cooper PR.** Phenotype and behaviour of dental pulp cells during expansion culture. *Arch Oral Biol*, 2009; 54:898-908.
206. **Pattappa G, Heywood HK, de Bruijn JD, Lee DA.** The metabolism of human mesenchymal stem cells during proliferation and differentiation. *J Cell Physiol*, 2011; 226:2562-2570.
207. **Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR.** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999; 284:143–147.
208. **Pittenger MF, Mosca JD, McIntosh KR.** Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2000; 251:3-11.
209. **Pivoriūnas A, Surovas A, Borutinskaite V, Matuzevicius D, Treigyte G, Savickiene J, Tunaitis V, Aldonyte R, Jarmalaviciuūte A, Suriakaite K, Liutkevicius E, Venalis A, Navakauskas D, Navakauskiene R, Magnusson KE.** Proteomic analysis of stromal cells derived from the dental pulp of human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cells Dev*, 2010; 19:1081-1093.
210. **Pojda Z, Machaj EK, Oldak T, Gajkowska A, Jastrzevska M.** Nonhematopoietic stem cells of fetal origin-how much of today's enthusiasm will pass the time test? *Folia Histochem Cytobiol*, 2005; 43:209-212.
211. **Radtke C, Schmitz B, Spies M, Kocsis JD, Vogt PM.** Peripheral glial cell differentiation from neurospheres derived from adipose mesenchymal stem cells. *Int J Dev Neurosci*, 2009; 27:817-823.
212. **Reinhold MI, Kapadia RM, Liao Z, Naski MC.** The Wnt-inducible transcription factor *Twist1* inhibits chondrogenesis. *J Biol Chem*, 2006; 281:1381-1388.
213. **Rose H, Oklander M.** Improved procedure for the extraction of lipids from human erythrocytes. *J. Lipid Res*, 1965; 6:428-431.
214. **Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, MacDougald OA.** Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*, 2000; 289:950-953.
215. **Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP.** Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond)*, 2005; 26:2:8.
216. **Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, Tagliafico E, Ferrari S, Robey PG, Riminucci M, Bianco P.** Self renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*, 2007; 131:324–336.

217. **Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T.** Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum*, 2005; 52:2521-2529.
218. **Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado MA, Shi S, Santos CF, Nör JE.** SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res*, 2010; 89:791-796.
219. **Sakdee JB, White RR, Pagonis TC, Hauschka PV.** Hypoxia-amplified proliferation of human dental pulp cells. *J Endod*, 2009; 35:818-823.
220. **Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M.** The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta*, 2013; 1830:4117-4129.
221. **Sato N, Ueno T, Kubo K, Suzuki T, Tsukimura N, Att W, Yamada M, Hori N, Maeda H, Ogawa T.** N-Acetyl cysteine (NAC) inhibits proliferation, collagen gene transcription, and redox stress in rat palatal mucosal cells. *Dent Mater*, 2009; 25:1532-1540.
222. **Sauer H, Rahimi G, Hescheler J, Wartenberg M.** Role of reactive oxygen species and phosphatidylinositol 3-kinase in cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *FEBS Lett*, 2000; 476:218-223.
223. **Scheller EL, Chang J, Wang CY.** Wnt/beta catenin inhibits dental pulp stem cell differentiation. *J Dent Res*, 2008; 87:126-130
224. **Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vécsei V, Schlegel J.** Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002; 10:62-70.
225. **Schriner SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Van Remmen H, Wallace DC, Rabinovitch PS.** Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science*, 2005; 308:1909-1911.
226. **Scion Corp**, 2007: Available at <http://www.scionimage.com>
227. **Shi Y, Pulliam DA, Liu Y, Hamilton RT, Jernigan AL, Bhattacharya A, Sloane LB, Qi W, Chaudhuri A, Buffenstein R, Ungvari Z, Austad SN, Van Remmen H.** Reduced mitochondrial ROS, enhanced antioxidant defense, and distinct age-related changes in oxidative damage in muscles of long-lived *Peromyscus leucopus*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2013; 304:R343-55.
228. **Semenza GL, Wang GL.** A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, 1992; 12:5447-5454.



- 229.**Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S.** Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 2004; 364:149-155.
- 230.**Seo BM, Sonoyama W, Yamaza T, Coppe C, Kikui T, Akiyama K, Lee JS, Shi S.** SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Dis*, 2008; 14:428-434.
- 231.**Sethe S, Scutt A, Stolzing A.** Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev*, 2006; 5:91-116.
- 232.**Shi S, Gronthos S.** Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*, 2003; 18:696-704.
- 233.**Siemerink MJ, Klaassen I, Vogels IM, Griffioen AW, Van Noorden CJ, Schlingemann RO.** CD34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures. *Angiogenesis*, 2012; 15:151-163.
- 234.**Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, Justesen J, Stenderup K, Rattan SI, Jensen TG, Kassem M.** Telomerase expression extends the proliferative lifespan and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol*, 2002; 20:592-596.
- 235.**Sloan AJ, Smith AJ.** Stimulation of the dentine-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in vitro. *Arch Oral Biol*, 1999; 44:149-156.
- 236.**Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 1985; 150:76-85. Erratum in: *Anal Biochem*, 1987; 163:279.
- 237.**Snykers S, De Kock J, Rogiers V, Vanhaecke T.** In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art. *Stem Cells*, 2009; 27:577-605.
- 238.**Song H, Cha MJ, Song BW, Kim IK, Chang W, Lim S, Choi EJ, Ham O, Lee SY, Chung N, Jang Y, Hwang KC.** Reactive oxygen species inhibit adhesion of mesenchymal stem cells implanted into ischemic myocardium via interference of focal adhesion complex. *Stem Cells*, 2010; 28:555-563.
- 239.**Song K, Wang Z, Li W, Zhang C, Lim M, Liu T.** In vitro culture, determination, and directed differentiation of adult adipose-derived stem cells towards cardiomyocyte-like cells induced by angiotensin II. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013; 170:459-70.

240. **Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, Liu H, Gronthos S, Wang CY, Wang S, Shi S.** Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One*, 2006; 1:e79.
241. **Spath L, Rotilio V, Alessandrini M, Gambarà G, De Angelis L, Mancini M, Mitsiadis TA, Vivarelli E, Naro F, Filippini A, Papaccio G.** Explant-derived human dental pulp stem cells enhance differentiation and proliferation potentials. *J Cell Mol Med*, 2010; 14:1635-1644.
242. **Suchánek J, Visek B, Soukup T, El-Din Mohamed SK, Ivancaková R, Mokry J, Aboul-Ezz EH, Omran A.** Stem cells from human exfoliated deciduous teeth-isolation, long term cultivation and phenotypical analysis. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2010; 53:93-99.
243. **Sun J, Tower J.** FLP recombinase-mediated induction of Cu/Zn-superoxide dismutase transgene expression can extend the life span of adult *Drosophila melanogaster* flies. *Mol Cell Biol*, 1999; 19:216-228.
244. **Tai TF, Chan CP, Lin CC, Chen LI, Jeng JH, Chang MC.** Transforming growth factor beta2 regulates growth and differentiation of pulp cells via ALK5/Smad2/3. *J Endod*, 2008; 34:427-432.
245. **Takada I, Yogiashi Y, Kato S.** Signaling crosstalk between PPAR $\gamma$  and BMP2 in mesenchymal stem cells. *PPAR Res*, 2012; 2012:607141.
246. **Telles PD, Machado MA, Sakai VT, Nör JE.** Pulp tissue from primary teeth: new source of stem cells. *J Appl Oral Sci*, 2011; 19:189-194.
247. **Till JE, McCulloch EA.** A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, 1961; 14:213-222.
248. **Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabé-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD.** Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*, 2001; 3:778-84.
249. **Tomic S, Djokic J, Vasilijic S, Vucevic D, Todorovic V, Supic G, Colic M.** Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from dental pulp and dental follicle are susceptible to activation by toll-like receptor agonists. *Stem Cells Dev*, 2011; 20:695-708.
250. **Toussaint O, Royer V, Salmon M, Remacle J.** Stress-induced premature senescence and tissue ageing. *Biochem Pharmacol*, 2002; 64:1007–1009.
251. **Tower J.** Stress and stem cells. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2012; 1:789-802.
252. **Vacanti NM, Metallo CM.** Exploring metabolic pathways that contribute to the stem cell phenotype. *Biochim Biophys Acta*, 2013; 1830:2361-2369.

253. **Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007; 39:44-84.
254. **Valle-Prieto A, Conget PA.** Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress. *Stem Cells Dev*, 2010; 19:1885-1893.
255. **Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, Mamarbachi AM, Villeneuve L, Fortier A, Perrault LP, Carrier M, Thorin E.** Chronic treatment with N-acetyl-cystein delays cellular senescence in endothelial cells isolated from a subgroup of atherosclerotic patients. *Mech Ageing Dev*, 2008; 129:261-270.
256. **Wagers AJ, Weissman IL.** Plasticity of adult stem cells. *Cell*, 2004; 116:639-48.
257. **Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, Benes V, Blake J, Pfister S, Eckstein V, Ho AD.** Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One*, 2008; 3:e2213.
258. **Wang K, Zhang T, Dong Q, Nice EC, Huang C, Wei Y.** Redox homeostasis: the linchpin in stem cell self-renewal and differentiation. *Cell Death Dis*, 2013; 4:e537.
259. **Wang KH, Kao AP, Wangchen H, Wang FY, Chang CH, Chang CC, Lin SD.** Optimizing proliferation and characterization of multipotent stem cells from porcine adipose tissue. *Biotechnol Appl Biochem*, 2008; 51:159-166.
260. **Wang Q, Zhu H, Zhou WG, Guo XC, Wu MJ, Xu ZY, Jiang JF, Shen C, Liu HQ.** N-acetylcysteine-pretreated human embryonic mesenchymal stem cell administration protects against bleomycin-induced lung injury. *Am J Med Sci*, 2013; 346:113-122.
261. **Wang XF, Zhang G, Qiu SB, He F, Tan YH, Chen Q.** Effect of Notch ligand Delta1-RNA interference by lentivirus on proliferation and differentiation of human dental pulp stem cells. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 2011; 46:730-734.
262. **Warburg O.** On the origin of cancer cells. *Science*, 1956; 123:309-314.
263. **Weydert CJ, Cullen JJ.** Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc*, 2010; 5:51-66.
264. **Williams R, Khan IM, Richardson K, Nelson L, McCarthy HE, Anabalsi T, Singh Rao SK, Dowthwaite GP, Jones RE, Baird DM, Lewis H, Roberts S, Shaw HM, Dudhia J, Fairclough J, Briggs T, Archer CW.** Identification and

clonal characterisation of a progenitor cell sub-population in normal human articular cartilage. *PLoS One*, 2010; 5:e13246.

265. **Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N, Yarmush ML.** Mesenchymal stem cells: mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant*, 2010; 19:667-79.
266. **Yamamoto H, Kim EJ, Cho SW, Jung HS.** Analysis of tooth formation by reaggregated dental mesenchyme from mouse embryo. *J Electron Microsc (Tokyo)*, 2003; 52:559-566.
267. **Yamaza T, Kentaro A, Chen C, Liu Y, Shi Y, Gronthos S, Wang S, Shi S.** Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Res Ther*, 2010; 1:5.
268. **Yee Koh M, Spivak-Kroizman TR, Powis G.** HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends Biochem Sci*, 2008; 33:526-534.
269. **Yoo AS, Sun AX, Li L, Shcheglovitov A, Portmann T, Li Y, Lee-Messer C, Dolmetsch RE, Tsien RW, Crabtree GR.** MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature*, 2011; 476:228-231.
270. **Yoshida M, Takakuwa Y.** Method for simultaneous assay of initial velocities of lactate dehydrogenase isoenzymes following gel electrophoresis. *J Biochem Biophys Methods*, 1997; 34:167-175.
271. **Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, Thomas K, Austin T, Edwards C, Cuzzourt J, Duenzl M, Lucas PA, Black AC Jr.** Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec*, 2001; 264:51-62.
272. **Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M.** Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci*, 2003; 60:6-20.
273. **Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ.** Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*, 2002; 33:337-349.
274. **Zhang C, Chang J, Sonoyama W, Shi S, Wang CY.** Inhibition of human dental pulp stem cell differentiation by Notch signaling. *J Dent Res*, 2008; 87:250-255.
275. **Zhang DY, Pan Y, Zhang C, Yan BX, Yu SS, Wu DL, Shi MM, Shi K, Cai XX, Zhou S S, Wang JB, Pan JP, Zhang LH.** Wnt/ $\beta$ -catenin signaling induces the aging of mesenchymal stem cells through promoting the ROS production. *Mol Cell Biochem*, 2013; 374:13-20.

276. **Zhang YN, Lie PC, Wei X.** Differentiation of mesenchymal stromal cells derived from umbilical cord Wharton's jelly into hepatocyte-like cells. *Cytotherapy*, 2009; 11:548-558.
277. **Zhao F, Mancuso A, Bui TV, Tong X, Gruber JJ, Swider CR, Sanchez PV, Lum JJ, Sayed N, Melo JV, Perl AE, Carroll M, Tuttle SW, Thompson CB.** Imatinib resistance associated with BCR-ABL upregulation is dependent on HIF-1alpha-induced metabolic reprogramming. *Oncogene*, 2010; 29:2962-2972.
278. **Zheng Y, Liu Y, Zhang CM, Zhang HY, Li WH, Shi S, Le AD, Wang SL.** Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defect in swine. *J Dent Res*, 2009; 88:249-254.
279. **Zhou J, Brüne B.** Cytokines and hormones in the regulation of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha). *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 2006; 4:189-197.
280. **Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH.** Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 2002; 13:4279-4295.
281. **Zulewski H.** Differentiation of embryonic and adult stem cells into insulin producing cells. *Panminerva Med*, 2008; 50:73-9.

## **BIOGRAFIJA**

Jasmina D. Debeljak Martačić je rođena u Kraljevu, 27.9.1976.godine. Srednju školu je završila u Vrnjačkoj Banji. Po završetku gimnazije upisala je studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu i diplomirala februara 2004. godine sa prosečnom ocenom 9,62.

Jasmina D. Debeljak Martačić je od marta 2007. godine zaposlena na Institutu za medicinska istraživanja, Univerziteta u Beogradu, kao istraživač saradnik. Koautor je 12 radova koji su objavljeni u međunarodnim časopisima i većeg broja radova saopštenih na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Јасмина Дебељак Мартачић

број индекса ю 060043

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај N-ацетил-L-цистеина *in vitro* на пролиферацију и диференцијацију матичних ћелија зубне пулпе млечних зуба деце

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

Потпис докторанда

У Београду, 24.10.2013. године

*Јасмина Дебељак Мартачић*

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_ Јасмина Дебељак Мартачић

Број индекса io 060043

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Утицај N-ацетил-L-цистеина *in vitro* на пролиферацију и  
диференцијацију матичних ћелија зубне пулпе млечних зуба деце

Ментори др Милица Ковачевић Филиповић ванредни професор Факултета  
ветеринарске медицине у Београду

др Гордана Матић редовни професор Биолошког факултета у Београду

Потписани/а Јасмина Дебељак Мартачић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 24. 10. 2013. год.

*Јасмина Дебељак Мартачић*



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Утицај N-ацетил-L-цистеина *in vitro* на пролиферацију и диференцијацију матичних ћелија зубне пулпе млечних зуба деце

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 24.10.2013. год.

*Јасмина Дебељак Марковић*

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.