

# Primjena matičnih stanica mliječnih zuba u regeneraciji tkiva

---

Čekalović, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Dental Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:127:566524>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial 3.0 Unported](#) / [Imenovanje-Nekomercijalno 3.0](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-02-27**



Repository / Repozitorij:

[University of Zagreb School of Dental Medicine Repository](#)





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Sara Čekalović

**PRIMJENA MATIČNIH STANICA  
MLIJEČNIH ZUBA U REGENERACIJI TKIVA**

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Rad je ostvaren na Stomatološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Zavodu za dječju i preventivnu stomatologiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Dubravka Negovetić-Vranić, dr. med. dent.

Lektor hrvatskog jezika: Isidora Vujošević, mag. educ.philol.croat.

Lektor engleskog jezika: Jurica Korade, mag.educ.philol.angl.

Sastav Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Datum obrane rada: \_\_\_\_\_

Rad sadrži:

41 stranicu

1 tablicu

5 slika

1 CD

## **Zahvala**

Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. Dubravki Negovetić-Vranić na pomoći i savjetima prilikom izrade ovog rada, ali i tijekom samog studiranja.

Zahvaljujem svojoj dragoj obitelji i Alenu na velikoj podršci, ljubavi i razumijevanju.

## **Primjena matičnih stanica mliječnih zuba u regeneraciji tkiva**

### **Sažetak**

Matične su stanice nediferencirane vrste stanica koje imaju sposobnost diferencijacije u specijalizirane stanice. Njihove glavne osobine su samoobnovljivost i potentnost. Razlikujemo embrionalne matične stanice, koje se izoliraju iz embrija u stadiju blastociste, i odrasle matične stanice koje su prisutne u različitim vrstama tkiva. Ranijih godina 21. stoljeća otkrivaju se dentalne matične stanice od kojih razlikujemo matične stanice zubne pulpe, parodontnog ligamenta, apikalne papile, dentalnog folikula i mliječnih zuba. Matične stanice mliječnih zuba pokazuju veći broj dioba i mogućnost proliferacije u odnosu na ostale vrste dentalnih matičnih stanica. In vitro i in vivo istraživanja pokazuju njihovu mogućnost diferencijacije u adipogene, hondrogene, angiogene, osteogene i mnoge druge specijalizirane vrste stanica. Njihova sposobnost u regeneraciji i obnavljanju tkiva omogućuje njihovu terapijsku primjenu kod bolesti stomatognatog sustava, ali i teških sistemnih bolesti. U novije vrijeme došlo je do razvoja banaka matičnih stanica koje nude pacijentima pohranu matičnih stanica mliječnih zuba i njihovo korištenje u slučaju da to donoru u budućnosti zatreba. Prikupljanje mliječnih zuba potrebno je napraviti u stomatološkoj ordinaciji, pod vodstvom doktora koji će procijeniti koji zub je kandidat za uspješnu izolaciju matičnih stanica. Pohranjeni zub šalje se u banku nakon čega slijedi laboratorijska obrada. Vjerujemo da će ovakve usluge u skoroj budućnosti biti dostupne u svakoj ordinaciji, a otvaranje banke u Hrvatskoj zasigurno bi omogućilo korištenje ove usluge većem broju pacijenata.

**Ključne riječi:** matične stanice, matične stanice mliječnih zuba, prikupljanje, pohrana, terapijska primjena

## **Application of stem cells from deciduous teeth in tissue regeneration**

### **Summary**

Stem cells are an undifferentiated type of cells that have the ability to differentiate to specialized cells. Their main features are self-renewal and potency. We differentiate embryonic stem cells which isolate themselves from embryos in the blastocyst and adult stem cells present in different tissue types. In the early 21st century, dental stem cells were discovered, which can be distinguished as stem cells of dental pulp, periodontal ligaments, apical papillae, dental follicles and deciduous teeth. Stem cells of deciduous teeth show a greater number of diploids and proliferation than the other types of stem cells. In vitro and in vivo studies show their ability to differentiate to adipogenic, chondrogenic, angiogenic, osteogenic and many other specialized types of cells. Their ability to regenerate and repair tissue allows their therapeutic application in the illnesses of the stomatognathic system as well as severe systemic diseases. More recently, the development of stem cells banks have been founded to provide patients with the storage of stem cells for their teeth and their use in the event that donor needs them in the future. The collection of deciduous teeth needs to be done at a dental office under the guidance of a doctor who will assess which tooth is a candidate for the successful stem cell isolation. The stored tooth is then sent to the bank, followed by laboratory processing. We believe that these kinds of services will be available in every dental office in the near future, and opening up a dental bank in Croatia would surely enable these services to a large number of patients.

**Keywords:** stem cells, stem cells of deciduous teeth, collection, storage, therapeutic use

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. VRSTE MATIČNIH STANICA.....	3
2.1. Embrionalne matične stanice.....	4
2.2. Odrasle matične stanice .....	5
3. MATIČNE STANICE DENTALNOG PODRIJETLA .....	7
3.1. Matične stanice zubne pulpe.....	9
3.2. Matične stanice parodontnog ligamenta .....	10
3.3. Perkursorske stanice dentalnog folikula .....	10
3.4. Matične stanice apikalne papile.....	10
4. MATIČNE STANICE MLIJEČNOG ZUBA .....	12
4.1. Prikupljanje mliječnih zuba u stomatološkoj ordinaciji .....	14
4.2. Izolacija i pohrana matičnih stanica u laboratoriju.....	16
5. TERAPEUTSKA PRIMJENA MATIČNIH STANICA MLIJEČNIH ZUBA .....	19
5.1. Primjena kod bolesti stomatognatog sustava.....	22
5.1.1. Regenerativna endodoncija .....	22
5.1.2. Regenerativna kirurgija .....	23
5.1.3. Regenerativna parodontologija .....	24
5.1.4. Važnost signalnih molekula i tkivnog inženjeringa .....	24
5.2. Primjena kod sistemnih bolesti.....	25
5.2.1. Neurodegenerativne bolesti.....	26
5.2.2. Bolesti gušterače i jetre .....	27
5.2.3. Kardiovaskularne bolesti.....	28
6. RASPRAVA .....	29
7. ZAKLJUČAK .....	32
8. LITERATURA .....	34
9. ŽIVOTOPIS.....	40

## **Popis skraćenica**

DPSCs: matične stanice zubne pulpe

SHEDs: matične stanice mliječnog zuba

PDLSCs: matične stanice parodontnog ligamenta

SCAPs: matične stanice apikalne papile

DFPCs: matične stanice dentalnog folikula

BMP: koštani morfogenetski protein

TGFb: transformirajući čimbenik rasta beta



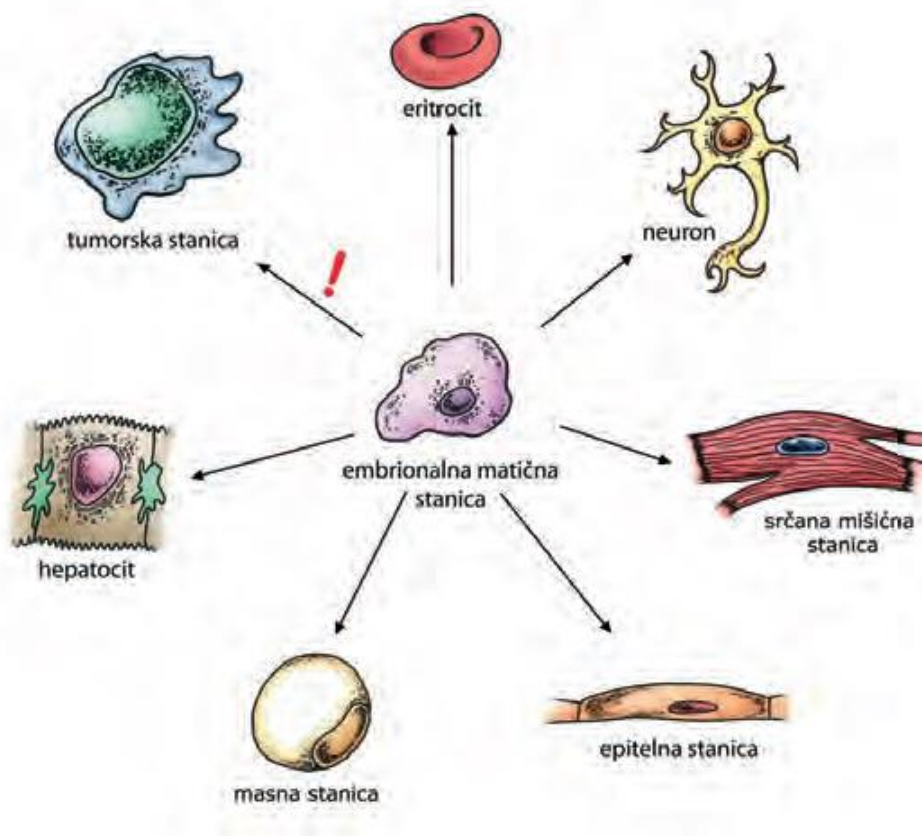
## **1. UVOD**

Matične stanice prvi su puta identificirane 50-ih godina 20. stoljeća, a sam naziv prvi uvodi ruski znanstvenik Alexandar Maximov 1908. godine na Kongresu hematološkog društva u Berlinu. Matične su stanice nediferencirane stanice koje imaju mogućnost diferencijacije u gotovo sve specijalizirane vrste stanica. Njihove glavne karakteristike su samoobnova (mogućnost da se mitotski neograničeno dijele) i potentnost (mogućnost diferencijacije u specijalizirane vrste stanica) (1, 2). Matične stanice stavljene u strogo kontrolirane uvjete imaju mogućnost specijalizacije u sve vrste stanica. Ta spoznaja otvara nova vrata u regenerativnoj medicini i stomatologiji. Njihova glavna uloga je osigurati razvoj tkiva i njegovu regeneraciju u slučaju bolesti ili oštećenja. Razlikujemo embrionalne i odrasle matične stanice (3). Ranih godina 21. stoljeća otkrivena je njihova prisutnost i u mliječnim zubima. Zbog dostupnosti i neinvazivnog načina prikupljanja, matične stanice mliječnih zuba mogle bi postati novi lijek u liječenju bolesti stomatognatog sustava, ali i teških sistemnih bolesti (4). Svrha rada je prikazati dosadašnje spoznaje i provedena istraživanja o matičnim stanicama mliječnih zuba, kao i o njihovoj terapijskoj primjeni. Budući da je ovo područje medicine koje donosi mnoge izazove znanstvenicima i brzo se razvija, očekujemo velik pomak u smjeru regenerativne medicine u budućnosti

## **2. VRSTE MATIČNIH STANICA**

## 2.1. Embrionalne matične stanice

Prvi izvor matičnih stanica bio je ljudski embrij. Embrionalne matične stanice izolirale su se iz unutarnjeg sloja blastociste. Ovaj zahvat prvi je izveo James Thomson 1998. godine na Sveučilištu Wisconsin u Madisonu. Ovim eksperimentom započela je nova era u znanosti i medicini koja bi omogućila regeneraciju i zamjenu oštećenog tkiva novim te bi ujedno bila i lijek za mnoge bolesti. Zbog samog zahvata koji je invazivan, ovaj eksperiment uzrokovao je mnoge etičke i moralne polemike te nije naišao na odobravanje šire javnosti unatoč revolucionarnom otkriću. Embrionalne su matične stanice samoobnovljive te su, za razliku od ostalih matičnih stanica, pluripotentne. One imaju sposobnost diferencirati se u gotovo sve vrste stanica, osim u stanice placente. Unatoč moći koja leži u embrionalnim matičnim stanicama, njihovo korištenje nije ušlo u širu primjenu zbog etičkog pitanja njihove izolacije (5, 6).

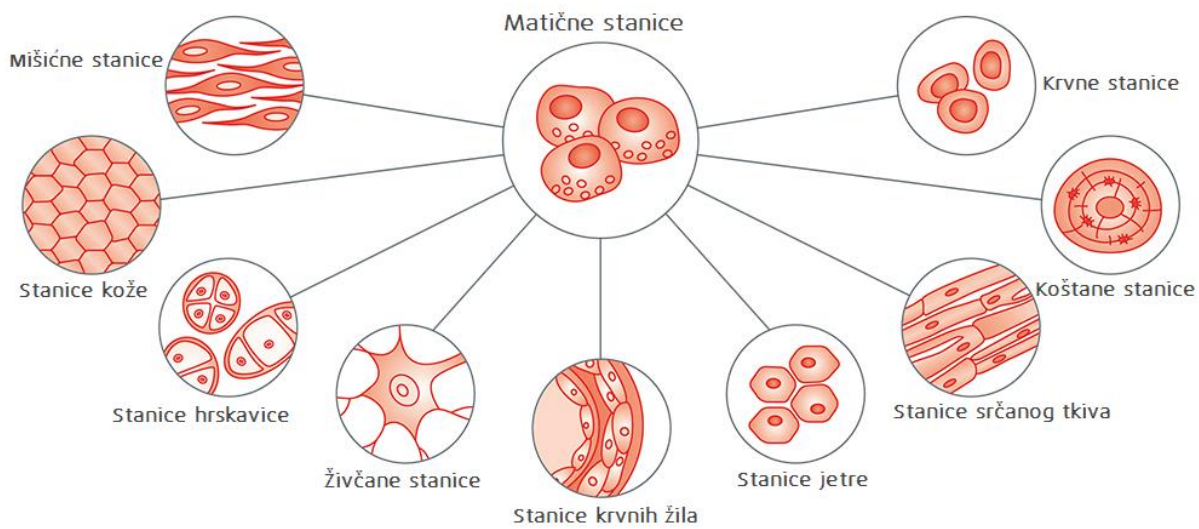


Slika 1. Embrionalne matične stanice imaju sposobnost diferencijacije u gotovo sve vrste stanica. Preuzeto i prilagođeno (7).

## 2.2. Odrasle matične stanice

Odrasle matične stanice nalaze se u različitim tkivima ljudskog organizma. Također imaju svojstvo samoobnove, ali su za razliku od embrionalnih multipotentne, što znači da se mogu diferencirati u mnoge vrste specijaliziranih stanica, ali ne u sve. Mnoga istraživanja dokazala su da bi se određeni broj odraslih matičnih stanica mogao diferencirati čak i u stanice organa iz kojih ne potječu, što se naziva transdiferencijacija. Izolacija odraslih matičnih stanica je, za razliku od izolacije embrionalnih, neinvazivan i etički prihvatljiv postupak te je u novije doba naišao na široku primjenu.

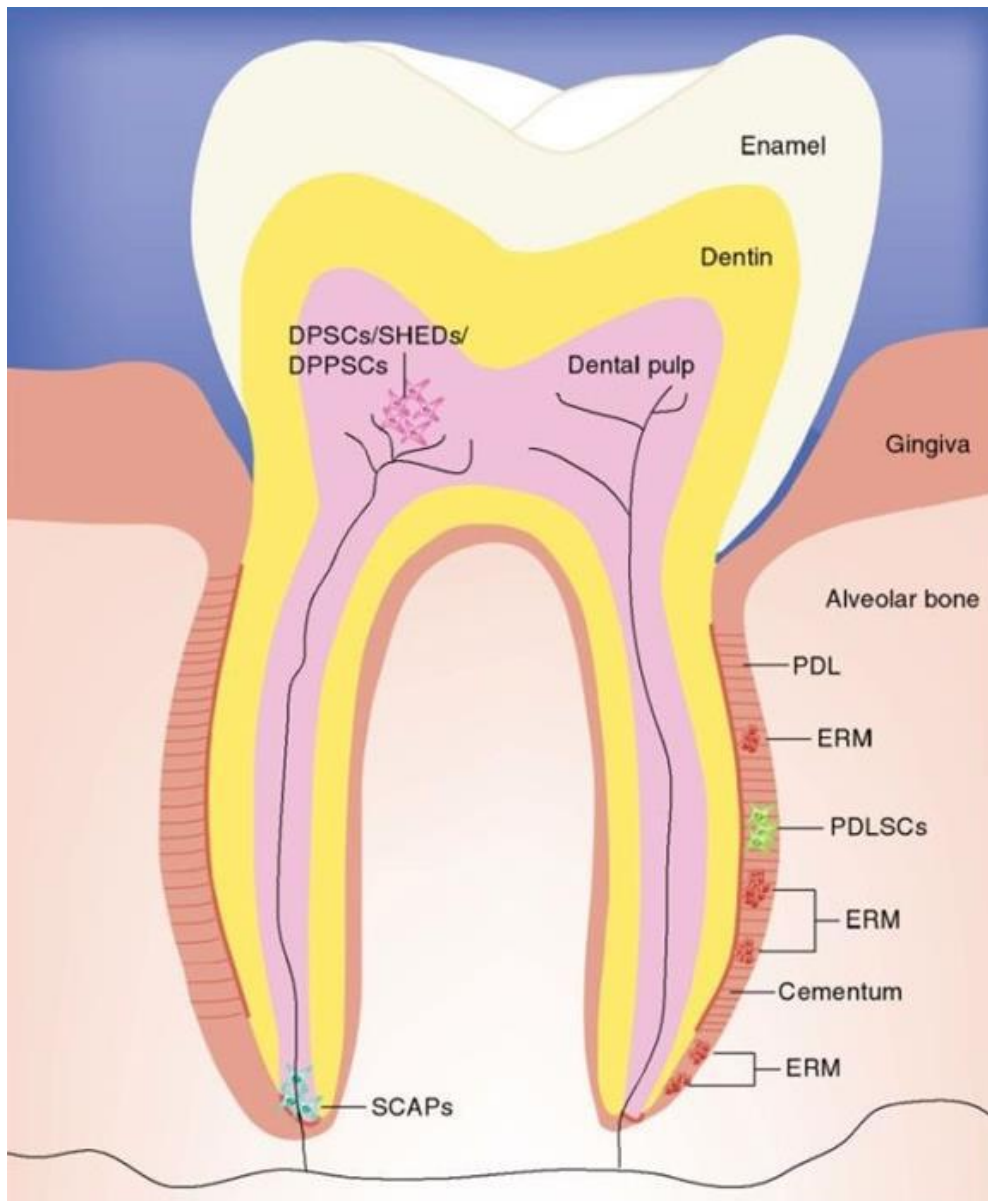
Vrste odraslih matičnih stanica koje možemo izolirati jesu 1. mezenhimalne, 2. hematopoetske, 3. neuralne, 4. epitelne i 5. kožne matične stanice. Široku primjenu našla je izolacija hematopoetskih matičnih stanica iz umbilikalne krvi. Bitna je činjenica da je upotreba takvih stanica etički prihvatljiva te je sam postupak pohrane jednostavan i neinvazivan (8). Roditelji koji se odluče na takvu vrstu pohrane unutar 48 sati od poroda prikupljene matične stanice moraju dostaviti u javne registre i banke s kojima sklope ugovor (9). Nakon toga slijedi izolacija samih hematopoetskih matičnih stanica i laboratorijska obrada kojom se iz prikupljene krvi uklanjaju eritrociti i plazma, a izdvaja se sloj leukocita u kojem se nalaze matične stanice. One se pohranjuju smrznute s tekućim dušikom na temperaturi od -196 Celzijevih stupnjeva. Ovakva vrsta pohrane omogućuje laku dostupnost i korištenje matičnih stanica u slučaju donorove potrebe u budućnosti. Također je prednost što pri transplantaciji nije potrebna 100-postotna podudarnost između primatelja i davatelja (donora), a uzrok tome je nezrelost matičnih stanica pupkovine. Kod nas su moguće ovakve vrste pohrane matičnih stanica umbilikalne krvi u Zagrebu u KBC-u „Rebro“ (10).



Slika 2. Odrasle matične stanice možemo izolirati iz različitih organa. Preuzeto i prilagođeno (11).

### **3. MATIČNE STANICE DENTALNOG PODRIJETLA**

Gronthos i suradnici 2000. godine prvi su puta izolirali matične stanice iz trajnog zuba. Do sada je poznato i identificirano već 5 populacija, a to su matične stanice zubne pulpe, matične stanice apikalne papile, matične stanice parodontnog ligamenta, perkursorske stanice dentalnog folikula i matične stanice mliječnih zuba. Matične stanice zuba zbog neinvazivnog i jednostavnog načina izolacije, te novih otkrića njihovih sposobnosti, otvaraju nova vrata u regenerativnoj medicini i stomatologiji (12).



Slika 3. Vrste dentalnih matičnih stanica: DPSCs (matične stanice zubne pulpe), SHEDs (matične stanice mliječnog zuba), PDLSCs (matične stanice parodontnog ligamenta), SCAPs (apikalne papile) i DFPCs (dentalnog folikula). Preuzeto i prilagođeno (12).



### **3.1. Matične stanice zubne pulpe**

Matične stanice zubne pulpe ektomezenhimalnog su podrijetla i smještene su u samom središtu pulpe, zoni koja je bogata krvnom i živčanom opskrbom. Sama specifičnost zubne pulpe, tj. pulpodentinskoga kompleksa, koji prilikom opsežnoga karijesa ili traume zuba odgovara stvaranjem tercijarnog dentina, potaknula je znanstvenike na razmišljanje o regenerativnim sposobnostima i same zubne pulpe (13). U zubnoj pulpi nalazimo dvije populacije matičnih stanica. Jedna nastaje iz mezenhima neuralnoga grebena, a druga iz derivata ektodermalne dentalne lamine. Provedena su brojna istraživanja u kojima je dokazano da matične stanice zubne pulpe imaju multipotentni kapacitet i mogu se diferencirati u različite vrste stanica in vitro, kao što su adipociti, hondrociti, miociti i osteociti. In vivo istraživanja dokazala su njihovu veliku ulogu prilikom oporavka od srčanog infarkta, preuzimanjem angiogeneze i poboljšavanjem krvne opskrbe zahvaćenog područja (14, 15). Za razliku od odraslih mezenhimalnih matičnih stanica, matične stanice zubne pulpe imaju povišenu imunosupresivnu aktivnost te izražene koštane markere (sijaloprotein, osteokalcin, kolagen tipa 1 i 2). Njihovim uzgojem na hranjivim podlogama s dodatkom hidroksiapatita dokazano je formiranje tkiva nalik cementu i kosti. Istraživanja provedena na životinjama potvrdila su njihov potencijal. U prazne alveole ekstrahiranih zuba stavljanjem matičnih stanica nakon određenog vremena došlo je do stvaranja nove alveolarne kosti (16). Ovu tvrdnju potvrdilo je istraživanje koje je proveo znanstvenik d Aquina. Ekstrahirao je simultano donje treće molare te je u jednu alveolu stavio nosač s matičnim stanicama, dok je drugu ostavio praznom te je ona služila kao kontrola. Nakon razdoblja od tri mjeseca radiografskom pretragom utvrđena je regeneracija i potpuno cijeljenje alveole u kojoj je bio postavljen nosač s matičnim stanicama, dok je na kontrolnoj strani količina nastale kosti bila znatno manja (17,18).

In vivo istraživanje koje su proveli Huang GT i suradnici dokazalo je mogućnost stvaranja vaskulariziranog tkiva korištenjem matičnih stanica. U proširene kanale zuba miša postavljene su matične stanice zubne pulpe. Nakon određenog vremena došlo je do ponovne prokrvljenosti zuba miša. Nastala je struktura slična pulpodentinskom kompleksu te je vitalitet zuba miša vraćen (14).

### **3.2. Matične stanice parodontnog ligamenta**

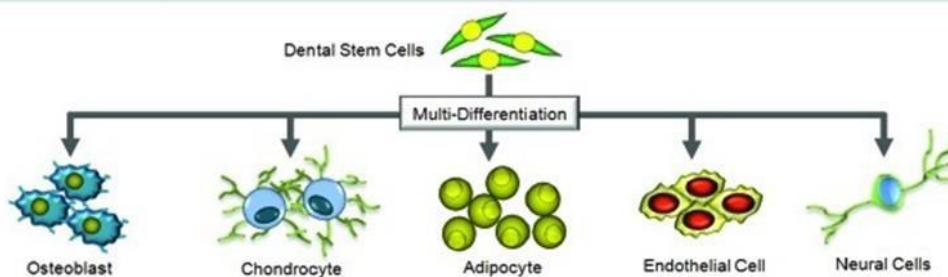
Matične stanice parodontnog ligamenta heterogena su populacija stanica koje imaju osnovne karakteristike matičnih stanica. One se nalaze u zdravom parodontnom ligamentu zuba, kao i u ligamentu koji je zahvaćen parodontitisom. Lokalizirane su najčešće u području furkacija stražnjih zuba te u području apeksa i koronarnom dijelu prednjih zuba (19). Istraživanjima je dokazana njihova mogućnost diferencijacije u cementoblaste, adipocite, hondrocite, osteoblaste i fibroblaste (20). In vivo istraživanje, provedeno na imunodeficijntnom mišu, korištenjem matičnih stanica parodontnog ligamenta, dokazalo je sintetiziranje kolagena tipa 1 i cementu slične strukture, oponašajući time parodont zuba. Takve supstance transplantirane su u područja zuba s parodontnim defektima i gubitkom kosti. Nakon određenog vremena došlo je do stabilizacije i pričvršćivanja zuba u alveoli (19).

### **3.3. Perkursorske stanice dentalnog folikula**

Perkursorske stanice dentalnog folikula smještene su u područje dentalnog folikula koji je ektomezenhimalna struktura koja okružuje caklinski organ i dentalnu papilu prilikom razvoja i nicanja zuba. Zapravo je riječ o klonogenim kolonijama stanica koje nalikuju fibroblastima (21). Na svojoj površini sadrže markere matičnih stanica. Istraživanjem provedenim in vitro dokazan je njihov potencijal diferencijacije u odontoblaste, cementoblaste i osteoblaste. In vivo istraživanjem, koje je provedeno na imunodeficijntnome mišu, pokazano je stvaranje tkiva bogatog osteokalcinom i kolagenom tipa 1 (22).

### **3.4. Matične stanice apikalne papile**

Apikalna papila meko je tkivo koje okružuje vršak korijena trajnog zuba koji je u razvoju, te je ujedno i perkusor radikularne papile zuba (23). Matične stanice nađene u tom području pokazuju sposobnost diferencijacije u adipogene, osteogene, odontogene i neurogene vrste stanica. Također, na svojoj površini imaju izražene markere matičnih stanica koje nalazimo i u zubnoj pulpi. Prilikom transplantacije u imunodeficijntnog miša one pokazuju sposobnost diferencijacije u vaskularizirani pulpodentinski kompleks (24). Također je dokazana veća mogućnost regeneracije dentina u odnosu na matične stanice zubne pulpe. Njihova je uloga presudna u stvaranju primarnih odontoblasta i odlaganju dentina u ranim fazama razvoja krune i korijena zuba (25)



Slika 4. Dentalne matične stanice imaju sposobnost diferencijacije u različite vrste stanica (osteoblaste, hondrocite, adipocite, endotelne, neuralne stanice). Preuzeto i prilagođeno (26).

#### **4. MATIČNE STANICE MLIJEČNOG ZUBA**

Matične stanice pulpe mliječnih zuba prvi su puta 2003. godine izolirali znanstvenik Miura i suradnici (14). One su nezrele i nespecijalizirane stanice koje se, stavljene u strogo kontroliranim uvjetima, mogu diferencirati u različite specijalizirane vrste stanica. Osim multipotentnosti i samoobnavljanja, dokazano je i da se brže razmnožavaju i rastu od ostatka postnatalnih odraslih matičnih stanica (27).

Matične stanice mliječnih zuba nastaju tijekom embrionalnog razvoja u periodu između šestog i sedmog tjedna. Radi se o heterogenoj populaciji stanica koje u uvjetima in vitro dijele slične karakteristike s ostatkom matičnih stanica. Na njihovoj površini nalazimo markere karakteristične za matične stanice.

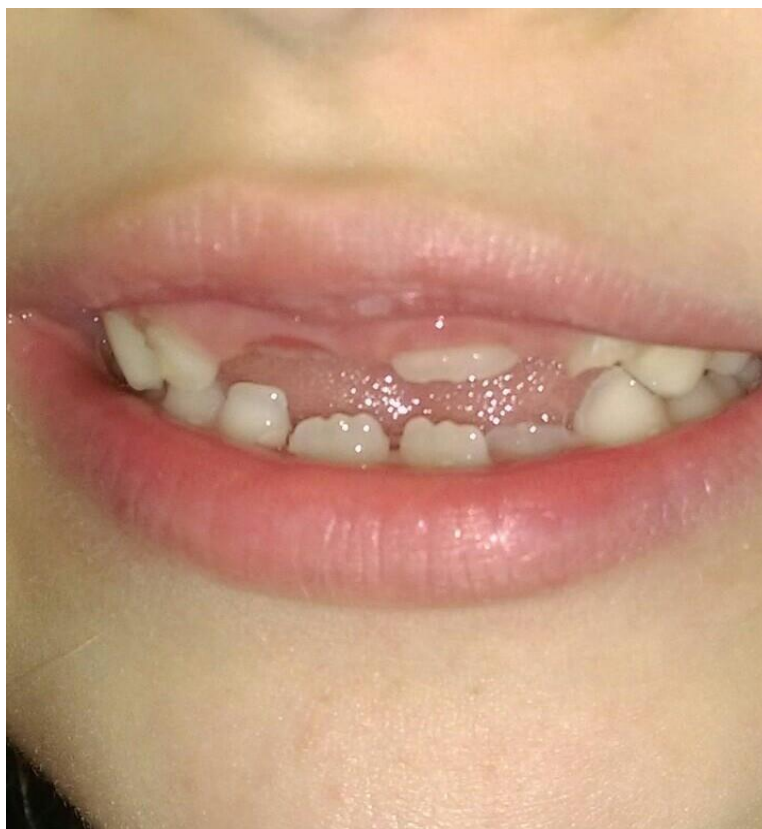
U uvjetima in vitro matične stanice mliječnog zuba mogu se diferencirati u neurogene, osteogene, odontogene, miogene, adipogene i hondrogene vrste stanica, dok u uvjetima in vivo pokazuju osteoinduktivni potencijal (28). Transplantacijom matičnih stanica mliječnih zuba u imunodeficientnog miša, nakon nekog vremena došlo je do organizacije matriksa i nastajanja nove trabekularne kosti (4). Ekspresija proteina na njihovim staničnim površinama omogućuje diferencijaciju u stanice zubne pulpe, kosti, cementa i dentina, ali i u ostale vrste stanica kao što su adipociti i neurogene stanice. U provedenim istraživanjima dokazano je da se matične stanice pulpe mliječnih zuba ne mogu izravno diferencirati u osteoblaste, ali mogu potaknuti formiranje i stvaranje osteoinduktivnog obrasca koji zatim aktivira osteogene stanice domaćina i započinje proces proliferacije i sazrijevanja novog tkiva, tj. kosti.

Znanstvenik Fernando de SA Silva svojim je istraživanjem dokazao da matične stanice mliječnog zuba mogu služiti u kliničkoj praksi kao imunološki modulator. Tom činjenicom možemo doći do zaključka da mliječni zubi imaju veliku ulogu tijekom nicanja trajnih zuba (29).

Znanstvenik Yamanda i njegovi suradnici u svom su istraživanju koristili pseće matične stanice pulpe zuba i matične stanice mliječnih zuba. Obje populacije stanica kombinirali su s plazmom bogatom trombocitima. Nakon određenog perioda došlo je do nastajanja zrelog koštanog tkiva koje je bilo dobro vaskularizirano novonastalim krvnim žilama. Ovo otkriće značajno je za implantološku stomatologiju jer se ovim postupkom može povećati osteointegracija te može doći do boljeg i čvršćega kontakta između alveole i površine implantata (30).

Mliječni su zubi široko dostupan izvor matičnih stanica te je njihovo prikupljanje jednostavan i etički prihvatljiv postupak. One pokazuju veću diobu i proliferaciju od ostatka dentalnih matičnih stanica te time otvaraju nova vrata u regenerativnoj medicini.

#### 4.1. Prikupljanje mliječnih zuba u stomatološkoj ordinaciji



Slika 5. Mješovita denticija. Ljubaznošću Renate Vojković

Istraživanja su pokazala da postoji velik potencijal matičnih stanica u liječenju bolesti stomatognatog sustava, ali i teških sistemnih bolesti kao što su degenerativne bolesti, kardiovaskularne, autoimune, koje sve više pogađaju današnju populaciju. Prikupljanje mliječnih zuba kod djece u svrhu izolacije matičnih stanica neinvazivan je i jednostavan zahvat koji će zasigurno u bližoj budućnosti biti usluga dostupna roditeljima i djeci u gotovo svakoj stomatološkoj ordinaciji. Odluka roditelja na takav zahvat i korištenje bankarstva matičnih stanica omogućit će njihovu dostupnost i korištenje u budućnosti u slučaju da to donoru bude potrebno. U Hrvatskoj još ne postoje banke za pohranjivanje matičnih stanica mliječnih zuba te je takvu vrstu usluge potrebno potražiti u inozemstvu, čime je i cijena same

usluge znatno viša. Pojedine stomatološke ordinacije imaju ugovor s inozemnim bankama, a te banke nude ugovor roditeljima te im putem interneta daju smjernice na koji način pohraniti i sačuvati mliječni zub nakon njegova ispadanja te ga poslati njima na daljnju obradu u određenom vremenskom roku.

Prikupljanje mliječnog zuba ipak bi najsigurnije bilo napraviti u stomatološkoj ordinaciji pod stručnim vodstvom doktora koji će procijeniti u kakvom je stanju mliječni zub te ga pažljivo izvaditi. Stomatolog bi se trebao držati određenih smjernica i kriterija o prihvatljivosti zuba koji bi se mogli uspješno skladištiti u banci matičnih stanica. Za uzimanje mliječnih zuba za pohranu i daljnju obradu idealni su mliječni sjekutići i očnjaci, dok bi lateralnije zube trebalo izbjegavati. Naime, mliječni molari imaju širok i masivan korijen zbog čega ostaju duže u ustima nego frontalni zubi. Također, erupcija stražnjih trajnih kutnjaka traje dulje te ujedno resorpcija korijena mliječnih molara traje dulje što može rezultirati gubitkom vitaliteta takvog zuba, nekrozom te gubitkom vitalne i zdrave pulpe, a takav zub nije nam prihvatljiv za skladištenje ni daljnju obradu.

Zubi koji su jako klimavi također se ne bi trebali uzimati u obzir jer je moguće da im je vitalitet prekinut zbog dugotrajnoga klimanja. Jednako tako zubi s opsežnim karijesom, periapikalnim procesom, apscesom, cistom ili traumom nisu kandidati za izolaciju matičnih stanica te loša procjena i korištenje ovakvih zuba rezultira neuspjelom izolacijom i potrebom za ponavljanjem postupka (31).

Za pohranu se uzima mliječni zub koji je klimav, ali ima bar još jednu trećinu korijena u kosti, što nam ujedno osigurava vitalitet zuba te eliminira mogućnost prekida krvne opskrbe, kojom može doći i do propadanja samih matičnih stanica unutar pulpe. Nakon pažljivog vađenja takvog zuba stomatolog mora zub vizualno procijeniti te potvrditi prisutnost vitalnog pulpnog tkiva. Tek izvađeni zub mora imati pulpu crvene boje što nam dokazuje da je zub bio vitalan sve do trenutka njegova vađenja. U slučaju da je pulpa sive boje, njezina je opskrba vjerojatno bila ugrožena zbog patoloških promjena ili jer se zub klimao u ustima dulje vrijeme. Zbog svega navedenog, izolacija matičnih stanica poželjnija je iz tek ekstrahiranog mliječnog zuba, nego iz onog koji se klima već dulje vrijeme. Iz tog razloga prikupljanje mliječnih zuba trebalo bi se obavljati isključivo u stomatološkoj ordinaciji.

Nakon vađenja stomatolog pohranjuje zub u posebnu kutijicu/bočicu koja sadrži hipotonični fosfat s puferiranom otopinom soli koja matičnim stanicama osigurava hranjive tvari te sprječava mogućnost isušivanja i propadanja tijekom transporta. Nakon toga kutijica se izolira

i zapečati te se stavlja u metalnu transportnu posudu. Važno je da od vađenja i pohrane zuba te njegova transporta u laboratorij, tj. banku matičnih stanica, ne prođe više od 48 sati kako ne bi došlo do propadanja matičnih stanica. Uz izvađeni zub, roditelj šalje i uzorak krvi djeteta zbog daljnjih testiranja (31).

Stomatolog se mora držati smjernica i kriterija koje zube može uzeti u obzir za pohranu kako bi krajnji cilj i rezultat bio što uspješniji. Vjerujemo da će u budućnosti prikupljanje mliječnih zuba kod djece biti moguće obaviti u svakoj stomatološkoj ordinaciji, a otvaranje banke matičnih stanica za njihovu pohranu u Hrvatskoj bi takvu uslugu učinilo jeftinijom i pristupačnijom pacijentima.

#### **4.2. Izolacija i pohrana matičnih stanica u laboratoriju**

Nakon dolaska pohranjenog mliječnog zuba u banku matičnih stanica slijedi protokol obrade zuba koji prethodi laboratorijskim postupcima izolacije i pohrane matičnih stanica. Površina samog zuba očisti se i ispere fosfatnom puferiranom otopinom soli bez dodatka magnezijevih i kalcijevih iona. Dezinficira se povidon-jodom, a tkivo pulpe izolira se iz pulpne komore malim sterilnim pincetama te se stavlja u Petrijevu posudu. Nakon toga se pulpno tkivo digestira kolagenazom tipa 1 te se ostavi da odstoji jedan sat na temperaturi od 37 Celzijevih stupnjeva. Izolirane se stanice propuštaju kroz 70-mikrometarski filterski papir da se dobiju pojedinačne suspenzije stanica (32).

Nakon svega navedenog kreće laboratorijska obrada. Laboratorij mora osigurati određene uvjete da bi omogućio uspješnu izolaciju i pohranu matičnih stanica. Na prvome mjestu su aseptični uvjeti rada što znači da se svi procesi u laboratoriju provode u sterilnim i strogo kontroliranim uvjetima te u čistom okruženju kako bi se izbjegao bilo kakav oblik kontaminacije uzoraka. Svaki dobiveni uzorak kodira se na jedinstven način, crtičnim kodom. Time se isključuje mogućnost zamjene uzoraka te je njegova identifikacija brza i lako dostupna.

Prije daljnjih postupaka obrade potrebno je napraviti inicijalnu procjenu uzoraka kojom se definira njihovo stanje i očuvanost. Nakon toga slijedi postupak izolacije i kulture matičnih stanica. Tkivo se podvrgava procesu u kojem se matične stanice odvajaju te nasađuju i uzgajaju na hranjivim podlogama u optimalnim uvjetima koji omogućuju njihov rast i razvoj. Cilj je osigurati dovoljan broj održivih stanica bez kontaminacije, a samo vrijeme postizanja



broja ovisi o samim stanicama i stopi rasta. Sve se stanice podijele u zasebne uzorke i kreće daljnja pohrana. U slučaju kontaminacije bakterijama ili gljivicama dolazi do sprječavanja rasta stanica i njihova propadanja, pa je iz tog razloga bitna konstantna kontrola mikrobne kontaminacije kako bi se održali optimalni uvjeti za napredak. Važan je broj i održivost samih stanica te je bitna njihova pažljiva kontrola jer je cilj da njihov broj bude što veći kako bi se osigurao dovoljan broj stanica u slučaju donorove potrebe u budućnosti.

Nakon navedenih kontrola kreće zamrzavanje uzoraka, a najčešće se provodi postupkom krioprezervacije. Sve se provodi s pomoću automatiziranog stroja, računala i posebnih programa. Tako zamrznuti uzorci stanica dijele se u više bočica i pohranjuju se u posebnim spremnicima koji sadrže tekući dušik na temperaturi od -150 Celzijevih stupnjeva uz 24-satni nadzor.

Najčešće se koriste dva pristupa u pohrani matičnih stanica, a to su krioprezervacija i magnetno smrzavanje. Krioprezervacija je najčešće korišten pristup, a cilj joj je očuvanje stanica/tkiva hlađenjem na niskim temperaturama, tj. zaustavljanjem njihove biološke aktivnosti. Matične stanice mliječnih zuba mogu se dugoročno pohraniti krioprezervacijom, a kada su u budućnosti potrebne donoru za upotrebu, moraju se pažljivo odmrznuti kako bi dalje bile održive. Stanice su sačuvane u dušičnoj pari koja zapravo održava njihovu latenciju i potenciju. Bitan nam je broj samih stanica, jer u slučaju da je on prenizak ili previsok, može doći do smanjenja stope oporavka i održivosti stanica.

Znanstvenik Paccio G. i suradnici 2006. godine proučavali su funkcionalna svojstva, morfologiju i diferencijaciju stanica dobivenih iz matičnih stanica koje su prethodno pohranjene krioprezervacijom. Zaključili su da matične stanice pulpe tim postupkom ne gube svoj potencijal što se pokazalo kao koristan podatak u svakodnevnoj praksi i istraživanjima (31).

Zhang i suradnici 2006. godine kao uzorak su koristili krioprezervirane matične stanice trećeg molara te također u svom istraživanju dokazali njihov potencijal i potentnost unatoč dugotrajnoj krioprezervaciji.

Znanstvenik Suichamek J. i suradnici 2007. godine uspostavili su protokol i usporedili kultiviranje pulpnih matičnih stanica s kulturom mezenhimalnih progenitorskih stanica. Dokazano je da obje vrste matičnih stanica imaju slične osobine te mogu ostati citogenetički stabilne unatoč krioprezervaciji.

Postupak magnetskog smrzavanja matičnih stanica koristi Sveučilište u Hirošimi. Njihova ideja je da se objekt potpuno ohladi ispod točke smrzavanja, ali bez zamrzavanja osiguravajući time neoštećenu staničnu stijenku. Kada se objekt ohladi, magnetsko polje se ugasi i objekt se zamrzne. Sveučilište u Hirošimi tvrdi da se ovom metodom povećava stopa preživljavanja stanica čak do 83 % što je znatna prednost u odnosu na konvencionalne metode.

Nakon prikupljanja mliječnog zuba, jednako su važni protokoli i smjernice kojih se moraju držati banka i laboratorij kako bi se osigurala što uspješnija izolacija i pohrana matičnih stanica mliječnih zuba bez njihova propadanja. Ako su rezultati izolacije i pohrane uspješni, banka matičnih stanica šalje potvrdu njihova zdravlja i održivosti roditeljima donora te se brine o njihovu nadzoru do trenutka kada donoru zatrebaju (32).

## **5. TERAPEUTSKA PRIMJENA MATIČNIH STANICA MLIJEČNIH ZUBA**

Istraživanja su pokazala da matične stanice mliječnih zuba izolirane i stavljene u strogo kontrolirane uvjete pokazuju mogućnost pretvorbe u specijalizirane vrste stanica s točno određenom ulogom. Ovo saznanje nudi brojne mogućnosti u otkrivanju novih oblika liječenja bolesti stomatognatog sustava, ali jednako tako i teških sistemnih bolesti kao što su neurodegenerativne i kardiovaskularne bolesti koje često zahvaćaju današnju populaciju.

Osnovna uloga matičnih stanica mliječnih zuba je regeneracija i cijeljenje tkiva ili organa u koje ih smjestimo i to je zapravo ključ uspješnosti njihove terapijske primjene (13). Da bi se ostvarila njihova učinkovitost u liječenju raznih bolesti, znanstvenici bi morali lako manipulirati matičnim stanicama, tj. regulirati njihovu diferencijaciju u specijalizirane vrste stanica te je usmjeravati u željenom smjeru, kako bi se one i ujedno primile kao transplantat određenog organa.

U usporedbi s matičnim stanicama pulpe trajnih zuba, matične stanice pulpe mliječnih zuba imaju veći broj dioba i bržu proliferaciju. Budući da je postupak prikupljanja mliječnih zuba jednostavan i neinvazivan, dodatno nam olakšava njihovu dostupnost te omogućuje korištenje u terapijske svrhe (4, 31).

Za određene skupine bolesti već postoje dokazani i provjereni podaci i rezultati istraživanja koji pokazuju učinkovitost njihova korištenja u liječenju, dok za određeni broj bolesti postoje još uvijek pretpostavke te su istraživanja u tijeku. Budući da se svakodnevno dolazi do novih spoznaja i otkrića na ovom području, regenerativnu medicinu vidimo kao široko primijenjenu u budućnosti.

Tablica 1. Popis bolesti kod kojih je dokazana ili se još uvijek istražuje mogućnost liječenja upotrebom matičnih stanica.

KRANIOFACIJALNA REGIJA	- defekti maksile i mandibule - bolesti i ozljede temporomandibularnog zgloba
STOMATOGNATI SUSTAV	- parodontne bolesti - bolesti zubne pulpe - gubitak zuba
NEUROLOŠKE BOLESTI	- ozljede kralježničke moždine - Alzheimerova bolest - Parkinsonova bolest - multipla skleroza
BOLESTI GUŠTERAČE I JETRE	- dijabetes melitus tipa 1 - fokalne bolesti jetre
KARDIOVASKULARNE BOLESTI	- infarkt miokarda
OSTALE BOLESTI	- krvne bolesti - karcinom jajnika - karcinom dojke - opekline

## **5.1. Primjena kod bolesti stomatognatog sustava**

Dosadašnja saznanja pokazala su veliku učinkovitost liječenja bolesti koje zahvaćaju stomatognati sustav pomoću dentalnih matičnih stanica, ponajviše matičnih stanica mliječnih zuba. One bude nadu i otkrivaju nove metode liječenja u endodonciji, kirurgiji, parodontologiji, a ujedno pred sebe stavljaju velik cilj, a to je regeneracija samog zuba s pomoću matičnih stanica.

### **5.1.1. Regenerativna endodoncija**

Pulpodentinski kompleks ima mogućnost odlaganja reparatnog dentina i time ujedno štiti pulpu od mehaničkih i mikrobnih utjecaja. Pulpa je visokospecijalizirano rahlo tkivo smješteno unutar pulpne komorice te pod utjecajem opsežnih karijesa ili trauma odgovara ireverzibilnim pulpitisom i nekrozom tkiva. Endodontski postupak liječenja takvog zuba uključuje pulpektomiju i dezinfekciju korijenskih kanala te njihovo punjenje umjetnim materijalima. Time se želi postići što dulje zadržavanje takvog zuba u ustima pacijenta, ali ujedno je takav zub zbog uklonjene krvne i živčane opskrbe te gubitka dentina zbog instrumentacije kanala oslabljen i manje je mehanički otporan na žvačne sile u odnosu na intaktne zube.

Pomak u smjeru regenerativne endodoncije zasigurno bi promijenio postupke u endodonciji te omogućio regeneraciju i oporavak inflamirane pulpe pomoću matičnih stanica. Znanstvenik Miura sa suradnicima 2003. godine prvi je puta dokazao da se matične stanice mliječnih zuba mogu koristiti za obnavljanje pulpnog tkiva (12). U eksperimentu matične stanice mliječnog zuba bile su pomiješane s hidroksiapatit trikalcij-fosfatom i postavljene u subkutani prostor imunokompromitirajućih miševa. Poslije osam tjedana matične stanice mliječnih zuba iz više kolonija miševa pokazale su sposobnost proliferacije i preživljavanja unutar nosača te su formirale dentinu slično tkivo. Pogledom pod mikroskop površina stanica koje se nalaze na dentinu svojom morfologijom podsjeća na odontoblaste.

Matične stanice mliječnih zuba u istraživanju gdje su kombinirane s mikrovaskularnim endotelnim stanicama u strogo kontroliranim uvjetima nakon određenog vremena stvorile su vaskularizirano tkivo koje svojom morfologijom nalikuje zubnoj pulpi.

Znanstvenik Casagrande i suradnici 2010. godine pokazali su da se matične stanice mliječnih zuba mogu diferencirati u stanice nalik odontoblastima. In vitro eksperimentom dokazano je da mogu proliferirati unutar korijenskih kanala te se pričvrstiti na zidove dentina (33).

Istraživanje koje je provedeno 2013. godine koristilo je transplantirane matične stanice mliječnih zuba postavljene punom duljinom unutar korijenskih kanala zajedno s nosačima. Nakon 28 dana od implantacije nastalo je tkivo nalik pulpi koje je zauzimalo većinu prostora korijenskoga kanala (34).

Velik izazov na polju tkivnog inženjeringa zubne pulpe čini i sam specifičan anatomski prostor pulpne komorice i korijenskih kanala. Stalnim napredovanjem i pozitivnim rezultatima istraživanja regenerativna endodoncija daje obećavajuće rezultate korištenjem matičnih stanica mliječnih zuba u kombinaciji s prikladnim nosačima.

### **5.1.2. Regenerativna kirurgija**

Provedena su mnoga istraživanja na životinjama i ljudima u kojima su se pokušali liječiti defekti mandibule, maksile, temporomandibularnog zgloba. Korištene su mezenhimalne matične stanice u augmentaciji alveole. Rezultati istraživanja provedeni na životinjama pokazali su da je došlo do brže i bolje regeneracije kosti korištenjem matičnih stanica u odnosu na biomaterijale (35).

Znanstvenik Meijer i suradnici proveli su istraživanje u kojem su implantirali mezenhimalne matične stanice u alveolarne kosti kod šest pacijenata. Nakon četiri mjeseca uočena je regeneracija kosti kod tri pacijenta (36). Ito i suradnici usporedili su osteointegraciju dentalnih implantata i kosti korištenjem matičnih stanica zubne pulpe, mezenhimalnih matičnih stanica i stanica pokosnice. Defekti u donjoj čeljusti ispunjeni su plazmom bogatom trombocitima i jednim od ovih triju izvora stanica. Nakon osam tjedana od postavljanja implantata u ta područja kosti, procijenili su veličinu dodirnih površina kosti i implantata. Matične stanice zubne pulpe pokazale su najbolji rezultat, čak 67 % (37).

Matične stanice mliječnih zuba pokazuju u in vitro uvjetima diferencijaciju u osteogene stanice, dok in vivo pokazuju osteoinduktivni kapacitet. U istraživanju je dokazano da potiču formiranje nove kosti i aktiviraju domaćinove osteogene stanice. Napredak u njihovom korištenju dovest će do novih strategija liječenja velikih defekata kosti mandibule, maksile, ali će poslužiti i kao idealna preprotetska terapija u smislu augmentacije alveole i formiranja

prikladnoga grebena. Također, matične stanice mliječnih zuba pokazuju potencijal i u liječenju bolesti temporomandibularnog zgloba te velikih kraniofacijalnih defekata nastalih zbog trauma, cista ili tumora (38).

### **5.1.3. Regenerativna parodontologija**

Parodontitis je kronična bolest koju uzrokuju mikroorganizmi i nakupljeni plak, koji dovode do upale i uništavanja parodontnih struktura te posljedično resorpcije kosti te klimanja i ispadanja zuba. Regenerativna parodontna terapija koristi tehnike i dizajne prikladne za obnavljanje potpornih struktura zuba. Cilj takvih zahvata je stvaranje novog pričvrsta, parodontnog ligamenta, cementa i alveolarne kosti.

U istraživanjima provedenim na imunokompromitiranim miševima koristile su se matične stanice parodontnog ligamenta koje su pokazale mogućnost proliferacije i regeneracije potpornog aparata zuba. Nažalost, teška parodontna oštećenja rezultiraju gubitkom zuba te su zato potrebne nove strategije i metode koje bi omogućile regeneraciju čitavog zuba (18). Smatra se da bi jedne od mogućnosti bile stvaranje zubnog zametka *in vitro* prije njegove implantacije ili transplantacija dentalnih matičnih stanica direktno u usnu šupljinu. U ovoj situaciji ključni bi bili nosači koji moraju imati oblik budućeg zuba. Njihovim korištenjem moguće je potaknuti diferencijaciju matičnih stanica parodontnog ligamenta i zubne pulpe u stanice koje će formirati korijen i parodontna tkiva.

Kod napredovanja parodontne bolesti, dolazi posljedično i do resorpcije kosti i snižavanja alveolarnoga grebena. U ovom slučaju može se iskoristiti osteoinduktivni potencijal matičnih stanica mliječnih zuba koji će u kontaktu s domaćinovu kosti poticati stvaranje novih osteoblasta te regenerirati koštane defekte (39).

### **5.1.4. Važnost signalnih molekula i tkivnog inženjeringa**

Ključ za uspješnu regeneraciju tkiva kod bolesti stomatognatog sustava jesu signalne molekule. Trenutna istraživanja usmjerena su na pronalaženje prikladnih signalnih molekula i materijala koji bi se koristili kao nosači (40). Trijada tkivnog inženjeringa, čiji je cilj regeneracija tkiva, jest uzgoj matičnih stanica na prikladnim nosačima s pomoću faktora rasta. Faktori rasta su molekule koje se vežu za receptore stanica te induciraju njihovu



diferencijaciju i proliferaciju. Za regeneraciju zubnih tkiva ključni su koštani morfogenetski proteini (BMP) i transformirajući čimbenik rasta beta (TGFβ).

Kod ozlijeđenih ili patološki promijenjenih tkiva, osim matičnih stanica bitno je osigurati i prikladne uvjete za rast jer u suprotnom stanice odumiru i sam postupak je neuspješan. To možemo izbjeći upotrebom matičnih stanica zajedno s nosačima, tj. kalupima. Oni omogućuju trodimenzionalni rast matičnih stanica. Bitno je da su biokompatibilni, porozni i da imaju mogućnost razgradnje nakon određenog vremena što najbolje pružaju kalupi od prirodnih materijala (fibrin, svila, kolagen...). Matične se stanice usidre na prikladne nosače te bivaju implantirane na mjesto defekta, tj. lezije. Tim postupkom njima se omogućuje preživljenje, ali ujedno i prostorna organizacija koju im omogućava kalup.

Budućnost regeneracije s pomoću matičnih stanica pomiče granice i otvara nova vrata i mogućnosti obnove i samog izgubljenog zuba. Veliku nadu za tako revolucionarne pothvate pružaju matične stanice postavljene na prikladnim nosačima, potpomognute faktorima rasta u strogo kontroliranim uvjetima (41).

## **5.2. Primjena kod sistemnih bolesti**

Dokazana je praktična primjena matičnih stanica u terapiji teških sistemnih bolesti kao što su infarkt miokarda, krvne bolesti, Parkinsonova bolest, multipla skleroza, dijabetes melitus itd. Za mnoge od bolesti u tijeku su eksperimentalna istraživanja kojima se pokušava naći ključ konačnog izlječenja kao što su karcinom dojke i jajnika. Primjena matičnih stanica kao lijek kod tako učestalih bolesti današnjice zasigurno bi bila revolucionarna te bi pacijentu znatno olakšala izlječenje i produljila životni vijek (42).

Velik potencijal pokazale su dentalne matične stanice, a naglasak stavljamo na matične stanice izolirane iz mliječnih zuba. Istraživanja su pokazala njihovu sposobnost u liječenju neurodegenerativnih i hormonskih bolesti. Nada leži u jednostanom prikupljanju mliječnih zuba i izolaciji matičnih stanica. Njihova moć u odnosu na ostale dentalne stanice leži u većem broju dioba i bržoj proliferaciji.

Sve ove informacije pružaju nadu u mogućnost njihova korištenja u svakodnevnoj praksi. Naravno, brojna istraživanja tek su u izvedbi; budući da se svakodnevno otkrivaju nova saznanja i spoznaje, vjerojatno je da će korištenje matičnih stanica mliječnih zuba u liječenju teških bolesti postati svakidašnji lijek.

### **5.2.1. Neurodegenerativne bolesti**

Neurodegenerativne bolesti specifične su po gubitku i degeneraciji neurona što rezultira funkcionalnim oštećenjima. Predstavnici te skupine bolesti su Parkinsonova bolest i Alzheimerova bolest, čije su karakteristike tremor, ispad funkcije i naposljetku demencija. Iako se javljaju kod starije populacije stanovništva, nisu prirodan način starenja. Teška oštećenja leđne moždine, perifernih živaca ili oštećenja nastala moždanim inzultom skupina su teških bolesti i za pacijenta podrazumijevaju dugoročan i težak oporavak koji vjerojatno neće u potpunosti biti uspješan.

Zbog ograničene neuronske regeneracije, matične stanice mliječnih zuba idealno su rješenje i nada za liječenje ovako teških bolesti. Studije su pokazale da u uvjetima neneuronske indukcije matične stanice mliječnih zuba izražavaju markere kao što su dvostruki kortin, glijalni kiseli fibrilarni protein, nestin i mnoge druge. U in vitro istraživanju matične stanice mliječnih zuba kombinirane su s medijem kulture i epidermalnim faktorom rasta te fibroblastičnim faktorom rasta. Nakon četiri tjedna došlo je do povećanja proteinskog udjela neuroloških markera kao što je glutaminska kiselina. U drugoj studiji matične stanice mliječnih zuba pokazale su nakon dvadeset i jednog dana pozitivnu ekspresiju neuronskih i glijalnih markera (42).

Znanstvenik Miura i suradnici proveli su istraživanje in vivo. U girus hipokampusa miševa ubrizgali su matične stanice mliječnih zuba te dokazali njihov neuronski razvojni potencijal. Tijekom više od deset dana određeni je broj stanica preživio i počeo ispoljavati neuronske markere. Ovim istraživanjem i dokazom da matične stanice mliječnih zuba imaju sposobnost neuronske diferencijacije in vivo, otvorena su nova vrata u medicini i liječenju teških neurodegenerativnih bolesti.

Dokazano je i da matične stanice mliječnih zuba izlučuju spojeve koji pozitivno utječu pri cijeljenju lezija nastalih ozljedom kralježničke moždine i fokalne cerebralne ishemije (43). Eksperimentalno su matične stanice mliječnih zuba ubrizgane u torakalne kralješke štakora, dok su u drugu skupinu štakora transplantirane stromalne stanice koštane srži i fibroblasti. Nakon određenog perioda bolje rezultate eksperimenta pokazala je skupina štakora s matičnim stanicama. Oni su bili u mogućnosti hodati i pomicati svoje stražnje noge. Smatra se da je oporavak torakalnih kralježaka povezan s diferencijacijom matičnih stanica mliječnih zuba u oligodendrocite koji su nastali kao nadomjestak izgubljenim stanicama (44).

Mogućnost in vivo neuronske diferencijacije stavlja matične stanice mliječnih zuba u prvi plan pri liječenju teških degenerativnih bolesti (Parkins, Alzheimer...) kao i kod cijeljenja lezija i oštećenja nastalih ozljedom kralježničke moždine i cerebralnim infarktom.

### **5.2.2. Bolesti gušterače i jetre**

Dijabetes je kronična bolest gušterače povezana s disfunkcijom i propadanjem beta-stanica te spada u najčešće endokrine bolesti današnjice.

In vitro istraživanje dokazalo je da se matične stanice mliječnih zuba mogu diferencirati u specijalizirane stanice nalik otočićima te otpustiti inzulin i C-peptid. In vivo istraživanje koristilo je miševe s dijabetesom uzrokovanim streptozotocinom. U njih su transplantirane stanice nalik otočićima koje su se diferencirale iz matičnih stanica mliječnih zuba. Nakon četiri tjedna došlo je do normalne glikemije i zaustavljanja dijabetesa. Ovaj podatak pruža nadu i alternativu kod liječenja ovako učestale bolesti današnjice koja često zahvaća populaciju raznih dobnih skupina, a posljedice i napredovanje nekontrolirane bolesti su teške (45).

Matične stanice mliječnih zuba pokazale su svoj potencijal i u liječenju bolesti jetre. Bolesnici koji pate od hepatocelularnoga karcinoma i ciroze jetre završavaju transplantacijom organa. Istraživanje pokazuje da matične stanice mliječnih zuba imaju mogućnost diferencijacije u hepatijske linije stanica. Uz ispravnu stimulaciju i strogo kontrolirane uvjete, matične stanice mliječnih zuba ispoljavaju hepatološke markere (alfa-fetoprotein, faktor rasta 1, hepatički nuklearni faktor). Također je bitan podatak da je velik broj hepatocita pozitivan za ekspresiju albumina. Razina i postotak diferencijacije matičnih stanica može se povećati dodatnim testiranjem vodikovim sulfidom i slinom (46).

### **5.2.3. Kardiovaskularne bolesti**

U današnje vrijeme kardiovaskularne bolesti čest su uzrok smrti te zahvaćaju različite dobne skupine. Mikroskopski gledano, infarktom miokarda dolazi do odumiranja kardiomiocita i stvaranja ožiljnog tkiva. Terapija kod ovih bolesnika su različite vrste lijekova (npr. beta-blokatori) koji se moraju uzimati dugoročno na dnevnoj bazi (47). Idealna bi terapija zapravo bila mogućnost regeneracije odumrlih kardiomiocita i stvaranje nove angiogeneze.

U istraživanjima su korištene različite vrste odraslih matičnih stanica koje su dale pozitivne rezultate. Matične stanice mliječnih zuba, u odnosu na ostale, pokazuju veći proliferacijski kapacitet i u strogo kontroliranim uvjetima imaju mogućnost stvaranja novog vaskulariziranog tkiva što bi u ovom slučaju bilo idealno rješenje kod oporavka kardiomiocita (48).

Matične stanice mliječnih zuba nude nove mogućnosti liječenja bolesti srca i nude potencijal koji se može iskoristiti i usmjeriti u nalaženje alternativnih metoda i pristupa liječenju.

## **6. RASPRAVA**

Matične stanice mliječnih zuba identificirali su 2003. godine znanstvenik Miura i suradnici te se od tada ispituje njihova mogućnost primjene u terapijske svrhe. In vitro istraživanja dokazuju njihovu mogućnost diferencijacije u neurogene, osteogene, odontogene, miogene, adipogene i hondrogene vrste stanica, dok in vivo pokazuju osteoinduktivni kapacitet. Transplantacijom matičnih stanica mliječnih zuba u imunodeficientnog miša došlo je do organizacije osteoinduktivnog matriksa i nastajanja nove kosti. Znanstvenik Yamada u svom istraživanju koristio je kombinaciju matičnih stanica mliječnih zuba zajedno s plazmom bogatom trombocitima i dobio zrelo koštano tkivo s vaskularizacijom. Istraživanje provedeno 2013. godine koristilo je matične stanice mliječnih zuba postavljene punom duljinom korijenskih kanala zajedno s nosačima te dokazalo nastajanje tkiva nalik zubnoj pulpi.

Sva ova istraživanja i brojna druga pokazuju mogućnost terapijske primjene matičnih stanica mliječnih zuba kod bolesti stomatognatog sustava. Možemo reći da bi se njihova moć regeneracije mogla primijeniti u svim granama stomatologije te u potpunosti promijeniti dosadašnje metode liječenja koje su podrazumijevale korištenje umjetnih materijala i nadomještanje izgubljenih zuba i kosti protetskim radovima. Njihovo otkriće dovodi do razvoja regenerativne endodoncije, parodontologije i kirurgije. Mnoga istraživanja još su u tijeku i na znanstvenicima je u potpunosti otkriti mogućnosti matičnih stanica mliječnih zuba i njihovu sposobnost diferencijacije te je usmjeriti ka željenom cilju. Postavlja se i pitanje je li moguće pomoću matičnih stanica postavljenih na prikladnim nosačima, potpomognutim faktorima rasta postići regeneraciju i stvaranje zuba u cjelini? Ovakva bi mogućnost zasigurno u potpunosti promijenila dosadašnje metode i postupke liječenja u stomatologiji.

Matične stanice mliječnih zuba pokazale su svoju moć i kod liječenja sistemnih bolesti kao što su dijabetes, Alzheimerova bolest, kardiovaskularne bolesti. Studije su pokazale pozitivne rezultate istraživanja te nadu u liječenju ovako teških bolesti kod kojih je terapija dugoročna, a sve češće zahvaćaju današnju populaciju. Zasigurno bi zamjena lijekova matičnim stanicama mliječnih zuba bila revolucionarno terapijsko dostignuće. Matične stanice mliječnih zuba dale su izvrsne rezultate kod neurodegenerativnih, endokrinih i kardiovaskularnih bolesti. Postavlja se pitanje, unatoč tako izvrsnim rezultatima, kada će se doći do tog stadija da njihova primjena bude stvarna i uobičajena u svakidašnjem životu.

Osim svih navedenih pozitivnih rezultata dobivenih brojnim in vitro i in vivo istraživanjima, velika prednost matičnih stanica mliječnih zuba je i njihova jednostavna i neinvazivna izolacija i pohrana. Mliječni zubi prikupljaju se u stomatološkoj ordinaciji pod vodstvom

doktora koji se drži određenih kriterija vezanih za prihvatljivost pojedinih zuba. Nakon vađenja mliječnog zuba, on se u posebnoj pohrani šalje u banku u laboratorij na daljnju obradu. Pojedine ordinacije nude ovakvu vrstu usluge i imaju sklopljene ugovore s inozemnim bankama, čime je i cijena takve usluge znatno viša. Pretpostavljamo da će u budućnosti ova vrsta usluge biti široko rasprostranjena i da će pacijenti biti ujedno u potpunosti upoznati što im ona nudi te da će je moći dobiti u svakoj stomatološkoj ordinaciji. Otvaranje banke matičnih stanica u Hrvatskoj zasigurno bi ovakvu uslugu učinilo jeftinijom i dostupnijom pacijentima.

## **7. ZAKLJUČAK**



Matične stanice mliječnih zuba imaju karakteristike samoobnovljivosti i potentnosti. Mogu se diferencirati u različite vrste specijaliziranih stanica i time otkrivaju nova područja u regenerativnoj stomatologiji i medicini. U odnosu na ostale vrste dentalnih matičnih stanica, one pokazuju veću proliferaciju i broj dioba.

Rezultati istraživanja pokazali su pozitivne rezultate te dokazali njihovu mogućnost korištenja u liječenju bolesti stomatognatog sustava, ali i teških sistemnih bolesti kao što su Parkinsonova bolest, dijabetes, infarkt miokarda. Brojne bolesti i njihove mogućnosti liječenja pomoću matičnih stanica još se istražuju.

Osim regenerativnih sposobnosti, matične stanice mliječnih zuba jednostavne su za prikupljanje te je njihovo korištenje etički prihvatljivo. U skoroj budućnosti očekujemo mogućnost prikupljanja i pohrane mliječnih zuba radi izolacije matičnih stanica, u gotovo svakoj stomatološkoj ordinaciji.

Znanstvenici moraju otkriti još mnogo informacija vezanih za samo djelovanje i diferencijaciju matičnih stanica, ali ovo je područje medicine koje se brzo razvija te se nova saznanja otkrivaju na dnevnoj bazi. Očekuje se da će terapijska primjena matičnih stanica mliječnih zuba biti revolucionarna te će zamijeniti mnoge lijekove, zahvate, umjetne materijale, a pacijentima olakšati sam tijek liječenja i oporavka.

## **8. LITERATURA**

1. Bradamante Ž, Kostović-Knežević LJ, Osnove histologije. Zagreb; Školska knjiga, 2008.
2. Hirschi KK, Li S, Ray K. Induces pluripotent stem cell for regenerative medicine. *Annu Rev Biomed Eng.* 2014;16:277-94.
3. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36(14): 568-84.
4. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: Stem cell from human exfoliated teeth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003. 100:5807-12.
5. Thomson JA, Itskovitz-Edor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998; 282:145-7.
6. Noisa P, Parnpai R. Technical challenges in the derivation of human pluripotent cells, *Stem cells Int.* 2011; 2011:907-61.
7. [www.medicinar.mef.hr/assets/arhiva/maticne-stanice2.pdf](http://www.medicinar.mef.hr/assets/arhiva/maticne-stanice2.pdf)
8. Peran M, Marchal JA, Rodriguez-Serrano F, Alvarez P, Aranega A. Transdifferentiation: why and how? *Cell Biol Int.* 2014; 35(4):373-9.
9. [www.kbc-zagreb.hr/?s=matične+stanice](http://www.kbc-zagreb.hr/?s=matične+stanice)
10. McKenna DH, Clay ME: Hematopoietic stem cell processing and storage. In: Murphy MF, Pampilon DH, editors, *Practical transfusion medicine.* 2nd ed. Blackwell Publishing; 2005.P.368-5.
11. [www.biosave.hr](http://www.biosave.hr)
12. Caton J, Bostanci N, Remboustika E, De Bari C, Mitsiadis TA. Future dentistry: cell therapy meets tooth and periodontal repair and regeneration. *J Cell Mol Med.* 2011; 15(5), 1054-65.
13. Gronthos S, Matikani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo
14. Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jasen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng.* 2006; 12:2013-282.

15. Huang AH, Snyder Br, Cheng PH, Chan AW. Putative dental pulp-derived stem/stromal cells in the hippocampus of mice. *Stem cells*. 2008;26:2654-63.
16. Pierdomenico L, Nonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation*. 2005; 80:836-42.
17. d Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L, Graziano A et al. Human mandibular bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cell Mater*. 2009;18:75-83.
18. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: Stem cell from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003. 100: 5807-12.
19. Morsczeck C, Schmalz G, Reichert FE; Vollner F, Galler K, Driemel O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Investig*. 2008;12:113-8.
20. Chen SC, Marino V, Gronthos S, Bartold PM. Location of putative stem cells in human periodontal ligament. *J Periodontol Res*. 2006, 41:547-53.
21. Morsczek C. Gene expression of runx 2, osterix, x-fos, DLX-3, DLX-5 and MSX-3 in dental follicle cells during osteogenic differentiation in vitro. *Calcit Tissue Int*. 2006; 78:98-10.
22. Luan X, Ito Y, Dangaria S, Diekwisch TG. Dental follicle progenitor cell heterogeneity in the developing mouse periodontium. *Stem cells Dev*. 2006; 15:595-608.
23. Abe S, Yamaguchi S, Amagasa T. Multilineage cells from apical pulp of human tooth with immature apex. *Oral Sci Int*. 2007;4:45-58.
24. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tsuchida RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod*. 2008; 34:166-71.
25. Chadipiralla K, Yochim JM, Banuteyan B, Huang CY, Garcia-Godoy F, Murray PE, et al. Osteogenic differentiation of stem cells derived from human periodontal ligaments and pulp of human exfoliated deciduous teeth. *Cell Tissue Res*. 2010; 340:323-33.

26. Papaccio G, Graziano A, d Aquino R, Graziano MF, Pirozzi G, Menchitti D et al. Long term cryopreservation of dental pulp stem cells and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *J Cell Physiol.* 2006; 208:319-25.
27. Potten CS. *Stem Cells.* San Diego: Elsevier; 1998.
28. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart- Parsons GC, Gomes- Massiorni SM, Pereira LV, et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs.* 2006; 184:105-16.
29. Bansal R, Jain A. Current overview on dental stem cells applications in regenerative dentistry. *J Nat Sci Biol Med.* 2015; 6(1): 29-34.
30. Yamanda t, Kentaro A, Chen C, Liu X, Shi Y, Gronthos S, et al. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1:5.
31. Arora V, Arora P, Munshi AK, Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED); saving for the future. *J Clin PediatrDent* 2009; 33(4): 289-294.
32. Mycells. Laboratory procedure for deciduous teeth. (place unknown): cord blood storage bank, 2017. Available from [www.mycells.gr](http://www.mycells.gr)
33. Casagrande L, Demarco FF, Zhang Z, Aranja FB, Shi S, Nor JE. Dentin derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *J Dent Res.* 2010; 89:603-8.
34. Kawasaki K, Tanaka S, Ishikawa T. On the incremental lines in human dentine as revealed by tetracycline labeling. *J Anat.* 1997;123(2): 427-436.
35. Mylonas D, Vidal MD, De Kok IJ, Moriarity JD, Cooper LF. Investigation of a thermoplastic polymeric carrier for bone tissue engineering using allogeneic mesenchymal stem cells in granular scaffolds. *J Prosthodont.* 2007;16:421-30.
36. Meijer GJ, de Bruijn JD, Koole R, van Blitterswijk CA. Cell based bone tissue engineering in jaw defects. *Biomaterials.* 2008; 29:3053-51.

37. Ito K, Yamanda Y, Nakamura S, Ueda M. Osteogenic potential of effective bone engineering using dental pulp stem cells, bone marrow stem cells and periosteal cells for osseointegration of dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2011;26: 947-54.
38. Ramalingam M, Ramakrishna S, Best S. *Biomaterials and stem cells in Regenerative Medicine*. Boca Raton: CRS Press; 2012.
39. Murphy WL, Mooney DJ. Controlled delivery of inductive proteins, plasmid DNA and cells from tissue engineering matrices. *J Periodontal Res*. 1999; 34: 413-9.
40. Mitsiadis TA, Feki A, Papaccio G, Caton J. Dental pulp stem cells, niches and notch signaling in tooth injury. *Adv Dental Res*. 2011; 23(3): 275-9.
41. Sharma S, Snivastava D, Grover S, Sharma V. Biomaterials in Tooth Tissue Engineering: A Review. *J Clin Diagn Res*. 2014; 8(1): 309-15.
42. Nakamura S, Yamanda 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(11): 1536-1542.
43. Russek NS; Jensen MB. Histological quantification of brain tissue inflammatory cell infiltration after focal cerebral infarction. A systematic review. *Int J Neur*. 2014; 124(3), 160-165.
44. Balkaya M, Krober JM, Rex A, Endres M. Accessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia. *J Cerdo Blood Flow Metab*. 2012; 33(3): 330-338.
45. Kanati MM, Rajeshwari YB, Gupta S et al. Transplantation of islet-like stem cell clusters derived from human dental pulp stem cells restores homoglycemia in diabetic mice. *Cytotherapy*. 2013; 15(10): 1228-1236.
46. Ishkitiev N, Yaegaki K, Catenic B et al. Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional feature in vitro. *J Endod*. 2010; 36(3): 469-474.
47. Tomaselli GF, Zipes DP: What causes sudden death in heart failure? *Circ Res*. 2004; 95(8): 754-63

48. Christof Stamm, Yeong Hoon, Chori, Boris Nasser, Roland Hetzer. A heart full of stem cells: the spectrum of myocardial progenitor cells in postnatal heart. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2009; 3:3:251-229.

## **9. ŽIVOTOPIS**



Sara Čekalović rođena je 14. 8. 1992. godine u Splitu. Nakon završene Osnovne škole „Vis“ upisuje Srednju opću gimnaziju „Antun Matijašević Karamaneo“ u Visu. Godine 2011. upisuje Stomatološki fakultet u Zagrebu.