

Matične stanice i njihova primjena u regeneraciji zubnih tkiva

Medved, Monika

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:127:356605>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Monika Medved

**MATIČNE STANICE I NJIHOVA
PRIMJENA U REGENERACIJI ZUBNIH
TKIVA**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2015.

Rad je ostvaren na Zavodu za dentalnu antropologiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditeljica rada: dr. sc. Ivana Savić Pavičin, Zavod za dentalnu antropologiju,
Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Lektor hrvatskog jezika: Gabrijela Detelj, mag.educ.philol.croat.

Podravska 10, 40328 Donja Dubrava

098 1339 384

Lektor engleskog jezika: Marija Radočaj, prof.engleskog jezika i književnosti

Ante Starčevića 74, 23000 Zadar

091 5196 065

Rad sadrži: 49 stranica

4 slike

1 CD

Zahvaljujem svojoj mentorici dr.sc. Ivani Savić Pavičin na pomoći, strpljenju i savjetima tijekom izrade diplomskog rada.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji i svojoj majci koja mi je tijekom studiranja pružila bezuvjetnu ljubav, razumijevanje i potporu. Hvala također prijateljima i kolegama koji su mi uljepšavali i olakšavali studentske dane.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. SVRHA RADA	4
3. MATIČNE STANICE DENTALNOG PODRIJETLA	6
3.1. Matične stanice zubne pulpe	7
3.2. Matične stanice mliječnih zuba	9
3.3. Matične stanice apikalne papile	10
3.4. Matične stanice parodontnog ligamenta.....	11
3.5. Prekursorske stanice dentalnog folikula.....	12
4. IZVORI I NAČINI IZOLACIJE MATIČNIH STANICA IZ ZUBA	12
5. TERAPEUTSKA PRIMJENA MATIČNIH STANICA U DENTALNOJ MEDICINI	17
5.1. Regenerativna parodontologija	18
5.2. Regenerativna endodoncija	19
5.3. Regenerativna kirurgija	21
5.4. Signalne molekule	23
6. RASPRAVA.....	25
7. ZAKLJUČAK.....	32
8. SAŽETAK.....	34

10. SUMMARY	36
11. LITERATURA	36
12. ŽIVOTOPIS	48

POPIS SKRAĆENICA

DFPCs - Prekursorske stanice dentalnog folikula

DPSCs - Matične stanice zubne pulpe

FGS - Fetalni goveđi serum

PDLSCs - Matične stanice parodontnog ligamenta

SCAPs - Matične stanice apikalne papile

SHEDs - Matične stanice mliječnih zuba

1. UVOD

Termin matične stanice prvi se puta pojavio u znanstvenoj literaturi još 1868. godine u radu njemačkog biologa Ernesta Haeckela. Haeckel je koristio termin „Stemmerzelle“ kako bi opisao progenitorni jednostanični organizam za koji je pretpostavio da je prekursor svih višestaničnih organizama. Kasnije, 1960. godine, Leroy Stevens otkrio je embrionalne tumorske stanice prilikom istraživanja testikularnog karcinoma. Stevens i njegovi suradnici dokazali su da su embrionalne tumorske stanice zaista pluripotentne matične stanice. Jednim od najvećih postignuća na ovom području znanosti smatra se rad o specifičnoj modifikaciji gena embrionalnim matičnim stanicama za koji su 2007. Mario R. Capecchi, Martin J. Evans i Oliver Smithies nagrađeni Nobelovom nagradom za medicinu (1).

Matične stanice su nespecijalizirane stanice koje se mogu neograničeno samoobnavljati i diferencirati u zrelije stanice sa specijaliziranim funkcijama. Glavna funkcija im je osigurati razvoj tkiva, homeostazu i reparaciju u slučaju oštećenja tkiva (2). Razlikujemo embrionalne i odrasle matične stanice. Embrionalne matične stanice proizlaze iz unutarnje stanične mase blastociste te imaju sposobnost neograničenog rasta zadržavajući svoju pluripotentnost (3). Odrasle matične stanice nazivaju se još i tkivno specifične ili somatske, a prisutne su u koštanoj srži, masnom tkivu, koži, mišićima i perifernoj krvi. Imaju sposobnost diferencijacije u različite loze stanica uključujući one koje tvore kost, hrskavicu, masno tkivo, mišiće i neurone (4). Embrionalne matične stanice su pluripotentne. Sve ostale matične stanice koje se nalaze u specijaliziranim tkivima fetusa ili odrasle osobe nazivaju se multipotentnima, što znači da mogu formirati mnoge, ali ne sve vrste stanica. Dakle, multipotentne matične stanice mogu proizvesti samo one vrste stanica u čijim se

tkivima uobičajeno nalaze (5). No, otkrićem induciranih pluripotentnih matičnih stanica (iPS), otvorena je mogućnost pretvorbe diferenciranih somatskih stanica u multipotentne matične stanice (6).

Matične stanice imaju dvije ključne osobine: sposobnost samoobnavljanja i sposobnost diferencijacije (7). Prilikom samoobnavljanja od matične stanice nastaje stanica kćeri (8). Matične stanice imaju kapacitet samoobnavljanja iznad Hayflickovog limita, što znači da stanica može proliferirati preko 50 dioba (2). Diferencijaciju možemo definirati kao kvalitativnu promjenu staničnog fenotipa koja je posljedica promjene u ekspresiji gena i posljedične funkcionalne sposobnosti stanice, a može se prepoznati kao promjena u morfologiji stanice ili promjenama u enzimskoj aktivnosti ili sastavu enzima (9).

Terapija matičnim stanicama predstavlja velik potencijal za primjenu u regenerativnoj medicini. Međutim, jedna od glavnih prepreka s kojom se suočava takva terapija je nemogućnost predviđanja sudbine stanice te rezultata terapije prije transplantacije. Prije uvođenja terapije matičnim stanicama u svakodnevnu praksu, potrebno je razviti nove tehnologije za procjenu vitalnosti stanice prije transplantacije (1).

2. SVRHA RADA

Svrha rada je prikazati mogućnosti terapijske primjene matičnih stanica s posebnim osvrtom na primjenu u dentalnoj medicini. Terapija matičnim stanicama ima velik potencijal za reparaciju i regeneraciju oštećenih tkiva. Istraživanje matičnih stanica nudi mogućnost razvoja novih načina liječenja različitih bolesti stomatognatog sustava.

3. MATIČNE STANICE DENTALNOG PODRIJETLA

Zubna tkiva istražuju se već duže vrijeme kao potencijalni izvor za izolaciju matičnih stanica (10).

Izolirano je 5 različitih populacija u postnatalnim dentalnim tkivima:

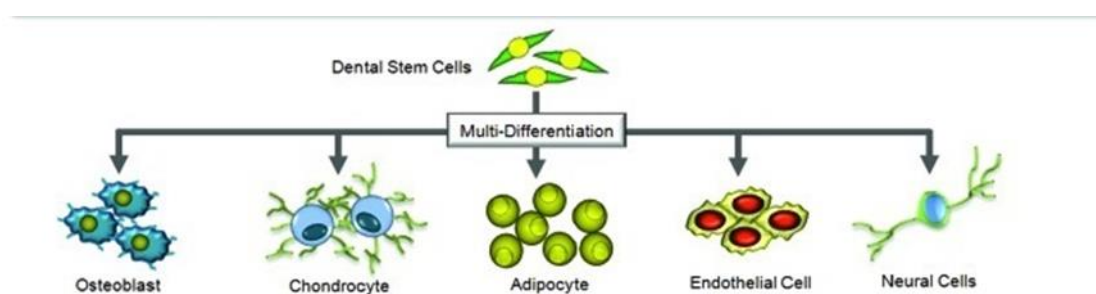
1. matične stanice zubne pulpe (DPSCs);
2. matične stanice mliječnih zuba (SHEDs);
3. matične stanice apikalne papile (SCAPs);
4. matične stanice parodontnog ligamenta (PDLSCs);
5. prekursorske stanice dentalnog folikula (DFPCs) (11).

3.1. Matične stanice zubne pulpe

Regenerativni potencijal humanog pulpodentinskog kompleksa koji se očituje stvaranjem reparatornog dentina usred karijesne lezije ili blaže traumatske ozljede, sugerira prisutnost dentinogenih progenitorskih stanica u zubnoj pulpi. Eksperimentalna izvješća pokazuju da pulpa sadrži populacije stanica na kojima se nalaze osteogeni markeri koji odgovaraju na induktore osteogene, tj. odontogene diferencijacije. Te populacije su ektomezenhimalnog podrijetla (12). DPSCs smještene su uglavnom u zoni pulpe bogate stanicama, u perivaskularnim i perineuralnim područjima (13).

Matične stanice zubne pulpe imaju multipotentni kapacitet diferencijacije u različite

loze stanica kao što su adipociti, osteociti, hondrociti i miociti in vitro (14) uključujući i in vivo istraživanja koja pokazuju diferencijaciju DPSCs u odontoblaste, neuralne stanice te stanice koje imaju ulogu u kardiogenom oporavku poboljšavajući angiogenezu (Slika 1) (15).



Slika 1. Sposobnost diferencijacije dentalnih matičnih stanica. Preuzeto: (16).

Postoji nekoliko studija na životinjama koje dokazuju potencijal DPSCs u regeneraciji kosti (17) i klinička studija koja pokazuje uspješno korištenje DPSCs za augmentaciju kosti u alveoli ekstrahiranog zuba (18). DPSCs pokazuju povišenu imunosupresivnu aktivnost u usporedbi sa odraslim mezenhimalnim matičnim stanicama izoliranim iz koštane srži (BM-MSCs) (19). DPSCs imaju izražene koštane markere kao što su koštani sijaloprotein, alkalna fosfataza, osteokalcin, osteonektin, te kolagen tip I i III. Prilikom njihova uzgoja u supstratima s dodatkom hidroksiapatita ili trikalcij fosfata formiraju tkiva nalik kosti i cementu. Laino i suradnici (20) pokazali su da se DPSCs mogu diferencirati u funkcionalne

osteoblaste in vitro i producirati ekstracelularni i mineralizirani matriks. Slična istraživanja pokazuju da, in vitro, većina DPSCs formira 3D koštanu trabakularnu strukturu, dok je 30 % populacije stanica imalo endotelne markere. Transplantacija tih osteoblastičnih/endotelnih konstrukcija u imunodeficientog miša dovela je do biološke integracije i generacije tkivne strukture s integralnom opskrbom krvi (17). Klinička studija d'Aquina i suradnika dala je kliničke i radiografske dokaze regeneracije kosti kod transplantacije DPSC nakon ekstrakcije mandibularnog trećeg molara. DPSCs dobivene su iz dentalne pulpe ekstrahiranih trećih mandibularnih molara. Oba molara izvađena su simultano te je u jednu ekstrakcijsku alveolu stavljen kolageni nosač koji sadrži DPSCs, a u drugu kolageni nosač bez stanica koji je koristio kao kontrola. Radiografski, nakon 3 mjeseca bilo je moguće uočiti potpunu regeneraciju područja u kojem je bio smješten kolageni nosač koloniziran sa DPSCs. Na kontrolnoj strani količina stvorene kosti bila je značajno manja (21). DPSCs, kultivirane u odgovarajućim uvjetima pokazale su sposobnost produkcije mineralnih depozita i diferencijacije u stanice nalik odontoblastima karakterizirane staničnom polarnošću i produkcijom struktura nalik mineraliziranom dentinu (22). Prema istraživanju Huang GT i suradnika, postavljanje DPSCs u mehanički proširene korijenske kanale miša, nakon uklanjanja pulpe, dovelo je do stvaranja nove vaskularizirane strukture slične pulpodentinskom kompleksu (14).

3.2. Matične stanice mliječnih zuba

Matične stanice nalaze se i u vitalnoj pulpi mliječnih zuba. To je heterogena

populacija stanica fibroblastične morfologije koja ima klonogeni kapacitet kao i sposobnost stvaranja adherentnih kolonija s ekstenzivnim proliferacijskim kapacitetom (23). U usporedbi s DPSCs rastu i proliferiraju puno brže i imaju veći broj dioba (9). Imaju izražene markere MSCs (STRO-1 i CD146). SHEDs se mogu diferencirati, in vitro, u adipogene, neurogene, osteogene, odontogene, miogene i hondrogene loze (24,25). In vivo pokazuju osteoinduktivni kapacitet. Prilikom transplantacije u imunodeficientnog miša, SHEDs potiču stvaranje nove kosti i organizaciju osteoinduktivnog matriksa (23). Prema istraživanjima, SHED se ne može diferencirati izravno u osteoblaste, ali potiču stvaranje nove kosti formiranjem osteoinduktivnog obrasca koji aktivira domaćinove osteogene stanice. Prema istraživanju Fernanda de SA Silva i suradnika, SHEDs mogu poslužiti kao imunološki modulator u kliničkoj praksi. Ovi podaci govore u prilog tome da mliječni zubi imaju ulogu i u induciranju formacije kosti tijekom nicanja trajnih zubi (26). Yamada i suradnici su u studiji sa psećim DPSCs i SHEDs pokazali da obje populacije stanica u kombinaciji sa plazmom bogatom trombocitima mogu tvoriti zrelo koštano tkivo dobro prokrvljeno novim krvnim žilama i povećati osteointegraciju - procijenjenu kontaktom kost/implantat kod dentalnih implantata obloženih hidroksiapatitom (27).

3.3. Matične stanice apikalne papile

Matične stanice moguće je izolirati i iz apikalne papile, mekog tkiva koje okružuje vršak korijena trajnog zuba u razvoju. Apikalna papila je prekursor

radikularne pulpe (28). Prema tome, SCAPs predstavlja populaciju stanica u ranijim stadijima diferencijacije. Te stanice pokazuju kapacitet diferencijacije u stanice osteogenih, odontogenih, adipogenih i neurogenih loza (29,30). U usporedbi s DPSCs, SCAPs ima manje izražene markere kao što su dentinski sijaloprotein, fosfoglikoprotein ekstracelularnog matriksa, transformirajući čimbenik rasta, no imaju izražen marker CD23 koji nije pronađen kod DPSCs. Također, imaju sposobnost diferencijacije u funkcionalno vaskulariziran pulpodentinski kompleks prilikom transplantacije u imunodeficientnog miša (29). SCAPs imaju veću sposobnost za regeneraciju dentina od DPSCs (31). Smatra se da su SCAPs odgovorne za stvaranje primarnih odontoblasta koji su zaduženi za izgradnju korijenskog dentina dok je DPSCs izvor rezervnih odontoblasta koji su odgovorni za produkciju reparativnog dentina (32,33).

3.4. Matične stanice parodontnog ligamenta

Matične stanice parodontnog ligamenta heterogena su populacija stanica sa karakteristikama matičnih stanica (34). Ova populacija stanica nalazi se u ljudskom zdravom parodontnom ligamentu kao i u onom zahvaćenom parodontitisom. Lokalizirane su u koronarnom i apikalnom dijelu te oko furkacije korijena (35). PDLSCs imaju sposobnost diferencijaciju u stanice slične cementoblastima, osteoblastima, adipocitima, hondrocitima i fibroblastima (36,37). Prilikom in vivo transplantacije u imunokompromitiranog miša, PDLSCs su stvorile parodontnom ligamentu, tj. cementu, slične strukture karakterizirane insercijom vlakana kolagena

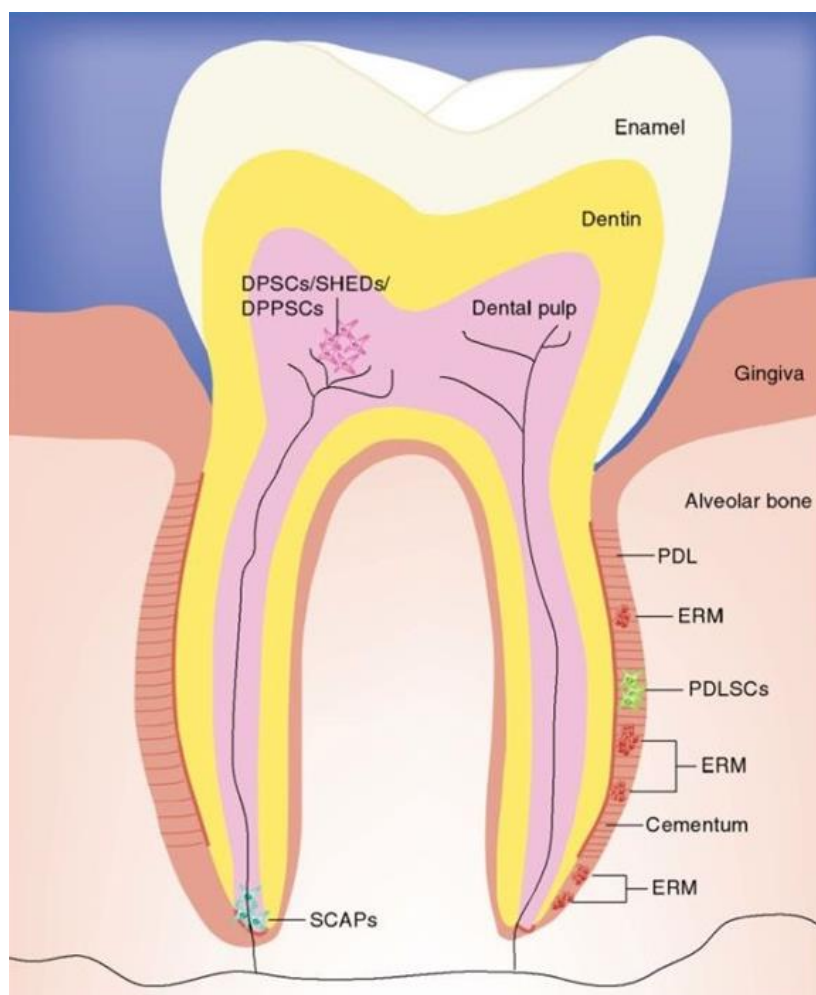
tipa I u strukture nalik cementu oponašajući na taj način Sharpeyeva vlakna. Osim toga, prilikom transplantacije tih stanica u parodontne defekte dolazi do pričvršćivanja parodontnog ligamenta na površinu zuba i regeneracije izgubljenog alveolarnog koštanog tkiva (34).

3.5. Prekursorske stanice dentalnog folikula

Prekursorske stanice dentalnog folikula nalaze se u dentalnom folikulu, ektomezenhimalnoj strukturi koja okružuje caklinski organ i dentalnu papilu zuba u razvoju prije nicanja (38). DFPCs tvore manji broj klonogenih kolonija sa tipičnom morfologijom fibroblasta i imaju izražene MSC markere uključujući including STRO-1, nestin, Notch-1, kolagen tip I, Runx-2 i osteokalcin (39). In vitro nakon adekvatne indukcije DFPCs pokazuju osteogenu, odontogenu i cementogenu sposobnost diferencijacije (40). In vivo implantacija DFPCs u imunodeficijentnog miša rezultirala je stvaranjem vlaknastog i rigidnog tkiva, bogatog osteokalcinom, koštanim sijaloproteinom i kolagenom tip I (41).

4. IZVORI I NAČINI IZOLACIJE MATIČNIH STANICA IZ ZUBA

Matične stanice izolirane su i uzgojene iz humane pulpe trajnih zuba (DPSCs), mliječnih zuba (SHEDs) te iz apikalne papile zuba s nezavršenim rastom i razvojem korijena (PDLSCs) (42). Identifikaciju i izolaciju matičnih stanica humane pulpe trajnih zuba prvi puta su opisali Gronthos i suradnici 2000. godine (Slika 2) (43). U svom istraživanju koristili su pulpno tkivo ekstrahirano iz impaktiranih trećih molara. Nešto kasnije, 2003. godine, Miura i suradnici izolirali su matične stanice mliječnih zuba (SHEDs) (44).



Slika 2. Različite populacije dentalnih matičnih stanica unutar zuba. Preuzeto: (45).

Pretpostavlja se da u zubnoj pulpi postoje dvije različite loze DPSCs. Naime, tijekom odontogeneze zub se razvija iz dva embrijska sloja - ektomezenhimalnih stanica neuralnog grebena te ektoderma dentalne lamine. Smatra se da jedna populacija matičnih stanica zubne pulpe nastaje iz mezenhima neuralnog grebena, a druga iz derivata ektodermalne dentalne lamine. Međutim, točna lokalizacija DPSC unutar zubne pulpe još nije utvrđena (42).

Najčešće metode izolacije su sljedeće.

1. Korištenje enzima za razgradnju pulpnog tkiva u 3%-tnoj otopini kolagenaze tijekom jednog sata na 37 °C. Tijekom procesa filtracije stanice koje imaju promjer od 3 do 20 µm ostaju zadržane za daljnju kulturu i amplifikaciju. Ova metode omogućuje izolaciju male populacije koja sadrži visok postotak matičnih stanica.
2. Kultivacija kolonija matičnih stanica. Koristi se enzimatska razgradnja pulpnog tkiva u svrhu dobivanja suspenzije pojedinačnih stanica koje se dalje koriste za stvaranje kolonija. Kolonije se sastoje od 50 ili više stanica koje se umnažaju za daljnje istraživanje.
3. Magnetski aktivirano sortiranje stanica. Prilikom korištenja ove imuno-magnetske metode dolazi do odvajanja matičnih stanica temeljem njihovog površinskog antigena (CD271, STRO-1, CD34, CD45 i c-Kit). Metoda je tehnički jednostavna i jeftina, no stupanj čistoće matičnih stanica je nizak.
4. Florescencijom aktivirano sortiranje stanica. Ovom metodom izoliraju se stanice temeljem njihove veličine i florescencije. Zahtijeva skupu opremu, visoko educirano

osoblje i smanjena je vijabilnost stanica sortiranih ovom metodom (46).

Aktualne tehnike kao medij za uzgoj DPSCs koriste fetalni goveđi serum (FGS) (47). Uzgoj stanica u fetalnom goveđem serumu ima više nedostataka koji su povezani s nastankom mogućih alergijskih reakcija uzrokovanih proteinima fetalnog goveđeg seruma te rizik od prijenosa virusa, priona, bakterija i endotoksina prilikom transplantacije (48). Osim toga, koncentracija faktora rasta u FGS može varirati što dovodi do poteškoća u konstantnom održavanju protokola stanične kulture.

Razvijeno je nekoliko novih medija za uzgoj kao što su autogeni humani serum, alogeni humani serum, krvni serum pupčane vrpce i autologna plazma dobivena iz koštane srži (49). Zbog imuno-patogenih rizika koji postoje prilikom korištenja FBS-a u staničnoj kulturi humani se serum smatra sigurnijom alternativom jer isključuje mogućnost prijenosa infekcija i imunogenih reakcija. Pojavile su se i kulture koje sadrže kemijski definiran serumfree/xenofree medij (SF/XF-M) (47). Njihovom uporabom nastoje se izbjeći imunološke reakcije i uz to vezane komplikacije (50).

5. TERAPEUTSKA PRIMJENA MATIČNIH STANICA U DENTALNOJ MEDICINI

Langer i Vacanti prvi su opisali tkivni inženjering kao „interdisciplinarno područje koje primjenjuje načela inženjeringa i prirodnih znanosti prema razvoju bioloških nadomjestaka koji vraćaju, održavaju ili poboljšavaju funkcije tkiva" (51). Unatoč postojanju različitih definicija regenerativne medicine, u praksi pojam regeneracije predstavlja primjenu popravljenih ili zamijenjenih strukturnih i funkcionalnih tkiva kao što su kosti, hrskavice i krvne žile, među ostalim organima i tkivima.

5.1. Regenerativna parodontologija

Regenerativna parodontna terapija uključuje tehnike koje su dizajnirane za obnavljanje dijelova potpornih struktura zuba koje su izgubljene zbog parodontitisa ili gigivne traume. Zahvati koji se pri tome koriste imaju za cilj stvaranje novog pričvrstka uključujući i stvaranje novog parodontnog ligamenta sa vlaknima umetnutim u novostvoreni cement i alveolnu kost.

Parodontitis je jedna od najčešćih infektivnih bolesti kod ljudi. Uzrokuju ga mikroorganizmi koji se naseljavaju na površinu zuba te uzrokuju kroničnu upalu a s vremenom i uništenje parodontnih struktura. Istraživanja kod imunokompromitiranih miševa pokazuju da transplantirane PDLSCs mogu regenerirati parodont što govori o njihovom izrazitom potencijalu za primjenu u kliničkoj praksi. Međutim, teška oštećenja parodontnih tkiva često rezultiraju gubitkom zuba. Stoga je nužno razviti

nove strategije kojima bi se omogućilo korištenje u potpunosti regeneriranih zuba. Jedan od načina da se to postigne je stvaranje zubnog zametka in vitro prije njegove implantacije in vivo ili transplantacijom dentalnih matičnih stanica u usnu šupljinu. U ovom posljednjem načinu dentalne matične stanice trebale bi biti nošene na biomimetičkom nosaču koji ima oblik zuba. Korištenjem različitih nosača moguće je inducirati diferencijaciju PDLSCs i DPSCs u nekoliko staničnih tipova koji formiraju korijen i parodontna tkiva in vitro i in vivo. Kramer i suradnici demonstrirali su mogućnost razvoja tkiva nalik parodontnom ligamentu iz parodontnih progenitorskih stanica te iz mezenhimalnih matičnih stanica (52).

5.2. Regenerativna endodoncija

Zubna pulpa je visokospecijalizirano mezenhimalno tkivo koje ima ograničeni regeneracijski kapacitet. Mogućnost regeneracije pulpnog tkiva ograničava anatomska građa pulpne komorice. Zubna pulpa ima minimalnu kolateralnu krvnu opskrbu što ograničava sposobnost imunološkog sustava da se bori s infekcijom. Reparativna sposobnost zuba može se uočiti pojavom karijesa pri čemu dolazi do stimulacije sekretorne aktivnosti odontoblasta (53). Ukoliko prevladaju odgovarajući uvjeti odontoblasti stvaraju terciarni dentin koji služi kao zaštita pulpe od bakterija i njihovih produkata. No, prilikom dubljih karijesnih lezija (54) ili trauma može doći do odumiranja odontoblasta i ireverzibilnog pulpitisa ili nekroze (53). U takvim slučajevima indicirano je endodontsko liječenje zahvaćenog zuba. Pulpektomija i dezinfekcija pulpnog prostora te punjenje istog umjetnim

materijalima uzrokuje značajan gubitak dentina i posljedično slabljenje mehaničke otpornosti zuba (55).

Dokazano je da DPSCs mogu proliferirati i adherirati u nosačima te se mogu diferencirati u odontoblaste. In vitro DPSC pokazuju visoku frekvenciju stvaranja kolonija stvarajući kalcificirane čvorove (12).

Primijenjene na mehanički i kemijski tretiranu dentinsku površinu, DPSC se diferenciraju u stanice nalik odontoblastima (56). In vivo, transplantacijom DPSC u imunokompromitiranog miša stvorena su tkiva nalik zubnim tkivima pri čemu su stanice ispoljavale gene konzistente s odontoblastičkom diferencijacijom (57). Prilikom smještaja DPSC u nosač s dentinom došlo je do nastanka tkiva sličnog pulpi (58). No, kada su iste stanice smještene na nosač bez dentina nije došlo do njihove diferencijacije u odontoblaste. SHED u kombinaciji s dermalnim mikrovaskularnim endotelnim stanicama (HDMEC) tvore dobro vaskularizirano pulpno tkivo sa morfologijom koja nalikuje ljudskoj zubnoj pulpi (59). Koristeći sličan pristup, Casagrande i suradnici (2010.) su pokazali da SHED imaju sposobnost diferencijacije u stanice nalik odontoblastima ispoljujući tri markera odontoblastičke diferencijacije. (DSPP, DMP1, MEPE). Autori su također dokazali da blokiranje utjecaja koštanog morfogenetskog proteina 2 (BMP-2) inhibira diferencijaciju SHED u odontoblaste (60). SHED također imaju sposobnost diferencijacije u funkcionalne endotelne stanice (61). Nadalje, uočena je formacija dobro organiziranog pulpnog tkiva unutar korijenskih kanala maksilarnih prvih molara koristeći SHED u kombinaciji s injicirajućim nosačem. SHED su se diferencirale u funkcionalne odontoblaste sposobne za stvaranje novog dentina (62).

Uspješni tkivni inženjering uključuje stvaranje učinkovite krvne mreže koja je sposobna opskrbljivati tkiva kisikom, nutrijentima i imunim stanicama te pritom uklanjati nusprodukte i stanični otpad. Nutrijenti i kisik su kritični faktori za održavanje visoke metabolične aktivnosti stanica koje su uključene u tkivnu regeneraciju (63). Zbog anatomskih karakteristika korijenskog kanala, razvoj strategija koje će povećati stvaranje novih krvnih žila čini se najvećim izazovom u polju tkivnog inženjerstva zubne pulpe. Iako je u posljednjih nekoliko godina učinjen značajan napredak u razumijevanju angiogenog potencijala matičnih stanica zubne pulpe, daljnja istraživanja usmjerena su bržem razvoju funkcionalne vaskularne mreže. Izgleda da je ovo kritični izazov koji mora biti ispunjen prije uobičajene primjene tkivnog inženjeringa pulpe u kliničkoj stomatologiji.

Međutim, stalnim napredovanjem regenerativna endodoncija daje obećavajuće rezultate korištenjem matičnih stanica u kombinaciji s odgovarajućim nosačima i signalnim molekulama (55).

5.3. Regenerativna kirurgija

Mezenhimalne matične stanice korištene su u augmentaciji alveolne kosti, maksilarnog sinusa, koštanoj regeneraciji nakon usađivanja implantata u različitim istraživanjima provedenima na ljudima i životinjama. Rezultati studija na životinjama (64,65) pokazali su kako mezenhimalne matične stanice povećavaju regeneraciju kosti u kraćem periodu u usporedbi s korištenjem samog biomaterijala. Kliničke studije na ljudima također su dokazale veću regeneraciju kosti kada su

korištene mezenhimalne matične stanice. Meijer i suradnici (66) su implantirali mezenhimalne matične stanice kako bi regenerirali defekte alveolne kosti u 6 pacijenata. Četiri mjeseca kasnije regeneracija kosti uočena je u 3 pacijenta. Autori su iznijeli da je samo u jednom slučaju regenerirano više od 7 mm, a za autora, samo u ovom slučaju, regeneracija je nastala zbog mezenhimalnih matičnih stanica. Od 11 implantata u 5 pacijenata jedan implantat nije uspio.

Shayesteh i suradnici (67) su proveli kliničku studiju na 6 pacijenata, pri čemu su korištene mezenhimalne matične stanice i beta tri kalcij fofat/hidroksiapatit kao materijali za podizanje sinusa sa manje od 3 mm rezidualne kosti. Tri mjeseca kasnije studije su pokazale 41 % regenerirane kosti. Od 30 postavljenih implantata 2 nisu uspjela.

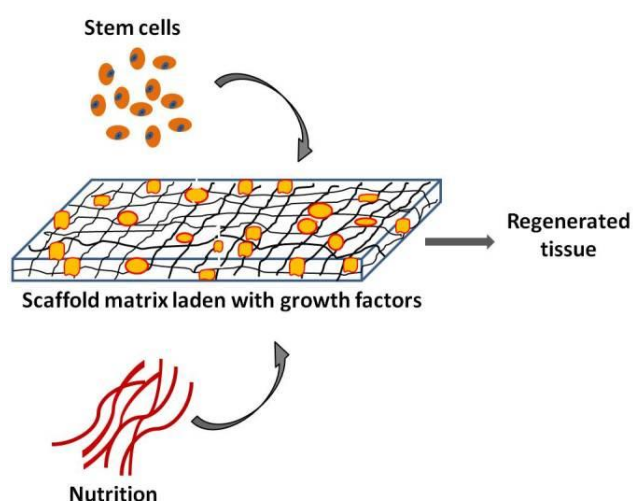
Drugi autori su izveli (68) sinus lifting i primijenili onlay graftove koristeći mezenhimalne matične stanice pomiješane sa ksenograftom ili alograftom u 5 pacijenata. Uočili su regeneraciju kosti u zonama grafta prema histološkoj i histomorfološkoj analizi. U kliničkoj studiji koju su proveli Rickert i suradnici korištene su matične stanice za podizanje maksilarnog sinusa u 12 pacijenata pri čemu je nasumičnim odabirom u jedan maksilarni sinus stavljen ksenograft matičnih stanica koštane srži, a u drugi ksenograft ili autograft. Petnaest tjedana kasnije histomorfološka studija pokazala je puno višu razinu stvaranja kosti prilikom primjene matičnih stanica (18 %) nego u kontrolnoj skupini (12 %). Različite studije procjenjivale su regeneracijski potencijal matičnih stanica dobivenih iz različitih izvora. Ito i suradnici (69) su usporedili oseointegraciju dentalnih implantata i kosti koja je manipulirana tkivnim inženjerstvom korištenjem DPSCs, MSC

mezenhimalne matične stanice koštane srži ili stanice pokosnice. U donjoj čeljusti defekti su ispunjeni stanicama iz jednog od ova tri izvora i plazmom bogatom trombocitima. Osam tjedana kasnije implantati su postavljeni, a nakon još 8 tjedana procijenjena je veličina dodirne površine kosti i implantata. Rezultati su pokazali 67 %, 62 % i 39 % kontakta kost-implantat za DPSC, mezenhimalne matične stanice koštane srži i stanice pokosnice. Razvijaju se i neke druge mogućnosti in vitro tkivnog inženjeringa za uzgoj matičnih stanica ili osteoblasta na površini titanskih konstrukcija implantata. Takav napredak dovest će do novih strategija za kranijalnu i maksilofacijalnu rekonstrukciju oštećene ili patološki promijenjene kosti (70).

5.4. Signalne molekule

Za razvoj terapije matičnim stanicama u stomatologiji važno je i korištenje signalnih molekula. Nekoliko molekula koje sudjeluju u razvoju parodonta već se koriste u kliničkoj praksi. Trenutne studije usmjerene su na identifikaciju određene populacije stanica, prikladnih signalnih molekula i poželjnih materijala koji će se koristiti kao nosači za specifične tipove stanica. Ponašanje matičnih stanica pod kontrolom je specijaliziranog mikrookoliša koji zovemo «niša matične stanice» (71). Ovaj mikrookoliš regulira vitalitet, proliferaciju i diferencijaciju matičnih stanica. Primjena matičnih stanica u ozlijeđenom ili patološki promijenjenom tkivu ograničava njihovo širenje i ne osigurava dobre uvjete za njihovu instalaciju. Stanice mogu odumrijeti zbog odsutnosti određenih lokalnih faktora kao što je kisik ili zbog neprikladnog ekstracelularnog matriksa koji je potreban za njihovu adheziju. To se

može izbjeći primjenom matičnih stanica u biokompatibilni i biorazgradiv nanovlaknasti nosač koji privremeno zamjenjuje vlaknastu 3D mrežu ekstracelularnog matriksa i oponaša strukturne aspekte niše matičnih stanica. Nosači su 3D strukture koje predstavljaju inicijalni kostur za stanice. Nakon što ispune svoju ulogu, vezanjem stanica, što omogućuje njihov rast i diferencijaciju, trebalo bi doći do razgradnje nosača (72). Dakle, matične stanice se usidre u nanovlaknasti kostur koji se ponaša kao umjetna niša stanica koje se nakon toga transplantiraju na mjesto lezije. Time se poboljšava preživljenje, diferencijacija i migracijski potencijal matičnih stanica, a osim toga i njihova prostorna organizacija (Slika 3) (73). Transplantirane matične stanice mogu se pratiti kroz duže razdoblje korištenjem neinvazivnih tehnika snimanja (74). Vizualizacija označenih matičnih stanica zahtijeva različite sustave snimanja kao što su magnetska rezonanca, kompjutorizirana tomografija te PET.



Slika 3. Trijada tkivnog inženjerstva: uzgoj matičnih stanica na nosačima uz potporu faktora rasta. Preuzeto: (75).

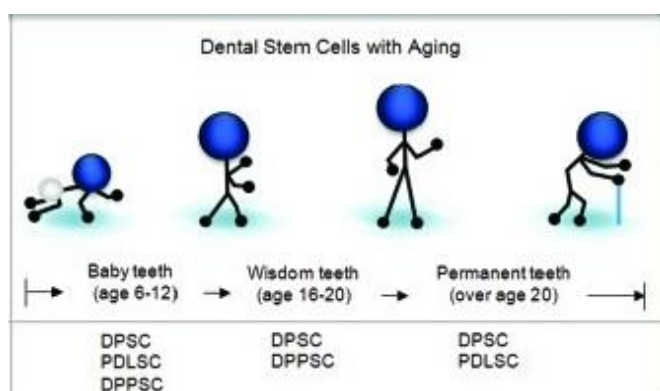
6. RASPRAVA

Zubi se sastoje od različitih tvrdih tkiva uključujući caklinu, dentin i cement, a okružuje ih integrirani kompleks koji čini alveolna kost i parodontni ligament. Imaju višestruke funkcije uključujući prehranu, izgovor i estetiku, a njihov gubitak može uzrokovati fizičku i psihološku patnju koja ne ugrožava samo kvalitetu života pojedinca već i njegovo samopoštovanje.

Današnja stomatologija klinički problem gubitka zuba rješava protetskim nadomjestcima ili implantatima napravljenima od sintetskih materijala. Iako ovi nadomjestci služe svrsi, korištenje proteza povezano je s komplikacijama kao što su protetski stomatitis i traumatski ulkusi. Uporaba zubnih implantata također ima nedostatke te može dovesti do neuspjeha zbog mnogih čimbenika koji ometaju oseointegraciju. S obzirom na napredak u tkivnom inženjerstvu i biologiji matičnih stanica, za prevladavanje tih nedostataka predložena je regeneracija zuba matičnim stanicama. Glavni koncept regeneracije je oponašanje procesa razvoja prirodnih zuba in vitro ili in vivo pomoću matičnih stanica.

U organizmu postoji više izvora matičnih stanica. Pupčana vrpca, koja se uklanja prilikom rođenja, može pružiti neiscrpan izvor matičnih stanica kroz neinvazivan, bezbolan i etički nekontroverzan postupak sakupljanja. Matične stanice dobivene iz pupkovine (hUCMSCs) primitivnije su i imaju veću stopu proliferacije, veću potentnost i veću sposobnost ekspanzije u usporedbi s odraslim mezenhimalnim matičnim stanicama te ne izazivaju stvaranje teratoma (76). Iako su mliječni zubi najdostupniji izvor dentalnih matičnih stanica, vrlo malo pacijenata ima pohranjene SHEDs jer je njihova izolacija i skladištenje relativno nova usluga (Slika 4).

Dentalne matične stanice imaju različit kapacitet diferencijacije, stoga svaka vrsta dentalnih matičnih stanica predstavlja izvor stanica za određeno područje primjene. Najveći broj članaka o ovoj temi usmjeren je na DPSCs koje su dobar kandidat za primjenu u regenerativnoj endodonciji za regeneraciju pulpe kao i za poticanje stvaranja reparatornog dentina kod otvorene pulpe. Nakon DPSCs otkrivene su SCAP i SHED koje se također može koristiti u regenerativnoj endodonciji. DPSCs, SHED, SCAPs, PDLSCs i DFPCs dobri su kandidati za poboljšanje postojećih regenerativnih postupaka kraniofacijalnih koštanih defekata primijenjene s nosačima i faktorima rasta. PDLSCs i DFPCs mogu se koristiti u regenerativnoj parodontologiji kao dodatak određenim postupcima, npr. vođenoj regeneraciji tkiva. Nadalje, dentalne matične stanice mogu pružiti inovativna rješenja i u drugim medicinskim granama zahvaljujući svojoj sposobnosti diferencijacije i imunomodulacijskim svojstvima.



Slika 4. Različita dentalna tkiva moguće je upotrijebiti kao izvor matičnih stanica ovisno o dobi. Preuzeto: (16).

Regenerativna endodoncija daje sve više izgleda za pretvaranje avitalnog zuba u vitalni zub. Cilj joj je zamijeniti patološki promijenjenu pulpu funkcionalnom pulpom. Postupci koji se danas koriste u kliničkoj praksi uspješno potiču razvoj korijena, ali još uvijek ne uspijevaju uspostaviti pravo pulpno tkivo. Postoji nekoliko nedostataka koje treba premostiti kako bi se poboljšala kvaliteta i učinkovitost ove terapije. Izolacija DPSCs u odraslih ljudi ograničena je na treći kutnjak, osim toga ne dolazi do obnavljanja DPSCs nakon ekstrakcije zuba kao, npr. koštane srži (77). Smjernice koje je dala American Dental Association za evaluaciju uspješnosti regeneracije uključuju klinički asimptomatski i funkcionalan zub. Radiološka procjena nakon 6 do 12 mjeseci treba pokazati periapikalna prosvjetljenja. Također, većinom je moguće vidjeti povećanu debljinu dentinskih stijenki. Nakon 12 do 24 mjeseca radiogram bi trebao pokazati povećanu dentinsku debljinu stijenke zajedno s povećanom duljinom korijena.

Na temelju tih smjernica mnogo je uspješnih pokušaja zabilježeno u literaturi (78). Torabinejad i Faras (79) predstavili su klinički, radiografski i histološki nalaz koji pokazuje "vezivno vitalno tkivo nalik pulpi" iz zuba nakon regenerativnog endodontskog liječenja pomoću plazme bogate trombocitima (PRP) kao nosača. Slično histološko izvješće predstavili su i Shimizu i suradnici iz zuba izvađenog nakon završetka regenerativnog endodontskog liječenja u kojemu je pronađeno labavo vezivno tkivo nalik pulpi koje je ispunjavalo više od polovice kanala (80). Ovi nalazi ukazuju na uspjeh regenerativnih endodontskih zahvata.

Nasuprot tome, u literaturi su opisani i slučajevi u kojima nije došlo do regeneracije pulpe i razvoja korijena. Lenzi i Trope (81) pronašli su prazan prostor korijenskog

kanala nakon liječenja nezrelog gornjeg središnjeg sjekutića s nekrotičnom pulpom. Nosrat i suradnici (82) pokazali su odsutnost vitalnih tkiva unutar korijenskog kanala liječenih nezrelih gornjih sjekutića s nekrotičnom pulpom nakon 6 godina. Nosrat i suradnici predstavili su još jedan slučaj u kojemu je došlo do sazrijevanja korijena gornjeg središnjeg sjekutića, iako je krajnji rezultat primijenjene regenerativne endodoncije bio prazan korijenski kanal.

Ovi rezultati možda se ne smatraju "kliničkim neuspjehom", ali pokazuju da ishod protokola za regeneraciju pulpe može biti nepredvidljiv.

Kako bi bilo moguće stvoriti „biozub“ jedna od prepreka koje treba prevladati je dostupnost dentalnih epitelnih matičnih stanica jer je njihova kombinacija sa zubnim mezenhimalnim matičnim stanicama, čini se, tehnika koja daje najbolje rezultate za tu svrhu. Iako je izolacija zubnih epitelnih matičnih stanica novorođenčeta izvediva, njihova upotreba u ljudi nosi određeni rizik budući da može uzrokovati imunološke reakcije i odbijanje. Zubne epitelne matične stanice mogu se izolirati iz trećeg kutnjaka djeteta i koristiti odmah ili pohraniti za buduću uporabu. Budući da ovaj postupak zahtijeva operaciju, nije etički i stoga nije primjenjiv. Kod odraslih sam izvor ostaje problem jer su dentalne epitelne matične stanice već izgubljene nakon erupcije zuba (83).

Identifikacija nekoliko vrsta epitelnih i mezenhimskih matičnih stanica značajno je postignuće. Ipak, kontrola morfogeneze i citodiferencijacije je izazov koji zahtijeva temeljito razumijevanje staničnih i molekularnih događaja koji su uključeni u razvoj, popravak i regeneraciju zuba.

7. ZAKLJUČAK

Matične stanice imaju sposobnost samoobnavljanja te sposobnost diferencijacije u različite vrste stanica. Upravo zato zauzimaju važno mjesto u regenerativnoj medicini. Potraga za alternativnim izvorima matičnih stanica dovela je do pronalaska dentalnih matičnih stanica. Izolirano je 5 različitih vrsta stanica: DPSCs, SHEDs, SCAPs, PDLSCs, i DFPCs.

Razvoj u istraživanju matičnih stanica napreduje vrlo brzo, no postoje određene prepreke koje je potrebno prevladati prije korištenja matičnih stanica u kliničkoj praksi. Matične stanice donijet će velik napredak u liječenju zubnog karijesa, bolesti parodonta, regeneraciji oralne sluznice, zubne pulpe, žlijezda slinovnica kod pacijenata s kserostomijom i ostalih kranofacijalnih struktura. U budućnosti ordinacija dentalne medicine može postati „bankom matičnih stanica“ za pacijenta koji kasnije u životu zatreba novu kost, zub ili neko dugo oralno tkivo. Doktor dentalne medicine može biti uključen u ekstrakciju, sakupljanje i pohranu matičnih stanica iz zuba svog pacijenta. No, da bi u potpunosti sudjelovali u ovoj novoj ulozi potrebna je edukacija o mogućnostima primjene, kliničkoj upotrebi i pohrani matičnih stanica.

8. SAŽETAK

Potraga za novim načinima liječenja dovela je do istraživanja matičnih stanica. Postoje dva tipa matičnih stanica: embrionalne matične stanice i odrasle mezenhimalne matične stanice. Embrionalne matične stanice izolirane su iz unutrašnje stanične mase blastociste, dok su odrasle matične stanice pronađene u različitim tkivima kao što je koštana srž, masno tkivo, potkožno tkivo, mišići i periferna krv. Različite metode koriste se za izolaciju stanica. One uključuju izolaciju uz pomoć enzima, magneta, florescencije ili uzgoja stanica.

Matične stanice predmet su istraživanja različitih grana dentalne medicine. Provedena su brojna klinička istraživanja koja pokazuju dobre rezultate primjene matičnih stanica u kirurgiji prilikom korištenja implantata i sinus liftinga, za regeneraciju parodontnog ligamenta, oralne sluznice, a napreduje čak i razvoj funkcionalnog pulpodentinskog kompleksa. Novija istraživanja koriste signalne molekule i posebno dizajnirane nosače kako bi ciljano usmjerili ponašanje matičnih stanica. Njihov razvoj dovest će do novih rješenja mnogih kliničkih problema koja predstavljaju izazov čak i u današnjoj, modernoj dentalnoj medicini.

9. SUMMARY

Stem cells and their use in dental tissue regeneration

The quest for alternative ways of treatment led to stem cells research. There are two types of stem cells: embryonic stem cells and adult mesenchymal stem cells. Embryonic stem cells constitute cells isolated from the inner cell mass of blastocysts whereas adult stem cells were found in various tissues like bone marrow, adipose tissue, dermis, muscles and peripheral blood. Different methods, which include the use of enzymes, magnets, fluorescence or cell cultivation, are used for stem cell isolation. Stem cells have been researched by many dentistry branches. There are numerous clinical studies that show good results in the application of stem cells in surgery, when using implants and sinus lifting, for the regeneration of the periodontal ligament, the oral mucosa and even the development of a functional pulpo dentinal complex has showed great progress. More recent research has demonstrated the necessity to influence stem cells using signal molecules and specially designed scaffolds. Their development will lead to solving many clinical conditions that even contemporary dentistry finds challenging.

10. LITERATURA

1. Mummery C, van de Stolpe A, Roelen B, Clevers H. Stem cells. Scientific facts and fiction. 2nd ed. London: Elsevier; 2014.
2. Hirschi KK, Li S, Roy K. Induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Annu Rev Biomed Eng.* 2014;16:277–94.
3. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell.* 2007;131(5):861-72.
4. Lee RH, Kim B, Choi I, Choi H, Suh K, Bae YC et al. Characterization and Expression Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow and Adipose Tissue. *Cell Physiol Biochem.* 2004;14(4-6):311-24.
5. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1965: 2323–8.
6. Suchanek J, Soukup T, Ivancakova R, Karbanova J, Hubkova V, Pytlik R, et al. Human Dental Pulp Stem Cells—Isolation and Long Term Cultivation. *Acta Medica.* 2007;50:195–201.
7. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(4):568-84.
8. Mountford JC. Human embryonic stem cells: origins, characteristics and potential for regenerative therapy. *Transfus Med.* 2008;18:1–12.
9. Potten CS. Stem Cells. San Diego: Elsevier; 1997.
10. Silva FdS, Ramos RN, Almeida DCd, Bassi EJ, Gonzales RP, Harumi Miyagi SP et al. Mesenchymal stem cells derived from human exfoliated

deciduous teeth (SHEDs) induce immune modulatory profile in monocyte-derived dendritic cells. PLoS ONE. 2014;9(5):e98050. doi:10.1371/journal.pone.0098050.

11. Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH, et al. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. Tissue Eng. 2007;13:767-73.
12. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:13625-30.
13. Chen K, Conti PS. Target-specific delivery of peptide-based probes for PET imaging. Adv. Drug Del. Rev. 2010;62(11):1005–22.
14. Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. Tissue Eng. 2006;12:2813-282.
15. 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;26:2654-63.
16. Papaccio G, Graziano A, d'Aquino R, Graziano MF, Pirozzi G, Menditti D et al. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. J Cell Physiol. 2006;208:319-25.

17. d'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L, Graziano A et al. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cell Mater.* 2009;18:75-83.
18. Pierdomenico L, Bonsi 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.
19. d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, et al. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ.* 2007;14:1162-71.
20. Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res.* 2005;20:1394-402.
21. Krebsbach PH, Robey PG. Dental and skeletal stem cells: potential cellular therapeutics for craniofacial regeneration. *J Dent Educ.* 2002;66:766-73.
22. Yen AH, Yelick PC. Dental tissue regeneration—a mini-review. *Gerontology.* 2011;57:85-94.
23. Huang GT, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, et al. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with

newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng A* 2010;16:605-15.

24. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes-Massironi SM, Pereira LV, et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs*. 2006;184:105-16.
25. Morsczeck C, Völlner F, Saugspier M, Brandl C, Reichert TE, Driemel O, et al. Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation in vitro. *Clin Oral Investig*. 2010;14:433-40.
26. Bansal R, Jain A. Current overview on dental stem cells applications in regenerative dentistry. *J Nat Sci Biol Med*. 2015; 6(1): 29–34.
27. Yamaza T, Kentaro A, Chen C, Liu Y, Shi Y, Gronthos S, et al. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Res Ther*. 2010;1:5.
28. Abe S, Yamaguchi S, Amagasa T. Multilineage cells from apical pulp of human tooth with immature apex. *Oral Sci Int*. 2007;4:45-58.
29. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod*. 2008;34:166-71.

30. Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod.* 2008;34:645-51.
31. Chadipiralla K, Yochim JM, Bahuleyan 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.
32. 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.
33. Seo BM, Sonoyama W, Yamaza T, Coppe C, Kikuri T, Akiyama K, et al. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Dis.* 2008;14:428-34.
34. Morsczeck C, Schmalz G, Reichert TE, Völlner F, Galler K, Driemel O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Investig.* 2008;12:113-8.
35. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 2004;364:149-55.
36. Chen SC, Marino V, Gronthos S, Bartold PM. Location of putative stem cells in human periodontal ligament. *J Periodontal Res.* 2006;41:547-53.

37. Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res.* 2007;10:149-60.
38. Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* 2005;24:155-65.
39. Morsczeck C. Gene expression of runx2, Osterix, c-fos, DLX-3, DLX-5, and MSX-2 in dental follicle cells during osteogenic differentiation in vitro. *Calcif Tissue Int.* 2006;78:98-102.
40. Morsczeck C, Moehl C, Götz W, Heredia A, Schäffer TE, Eckstein N, et al. In vitro differentiation of human dental follicle cells with dexamethasone and insulin. *Cell Biol Int.* 2005;29:567-75.
41. 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.
42. Sedgley CM, Botero TM. Dental stem cells and their sources. *Dent Clin North Am.* 2012;56:549-61.
43. Gronthos S, Mankani M, Brahmin J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:13625-30.
44. Morsczeck C, Reichrt TE, Völlner F, Gerlach T, Driemel O. The state of the art in human dental stem cell research. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2007;11(5):259-66.

45. Caton J, Bostanci N, Remboutsika 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.
46. Chase LG, Lakshmipathy U, Solchaga LA, Rao MS, Vemuri MC. A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2010;1:8.
47. Heiskanen A, Satomaa T, Tiitinen S, Laitinen A, Mannelin S, Impola U et al. N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. *Stem Cells*. 2007;25:197-202.
48. Aghayan HR, Arjmand B, Norouzi-Javidan A, Saberi H, Soleimani M, Tavakoli SA et al. Clinical grade cultivation of human Schwann cell, by the using of human autologous serum instead of fetal bovine serum and without growth factors. *Cell Tissue Bank*. 2011;13:281-5.
49. Ang LP, Do TP, Thein ZM, Reza HM, Tan XW, Yap C et al. Ex vivo expansion of conjunctival and limbal epithelial cells using cord blood serum-supplemented culture medium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:6138-47.
50. Lin HT, Tarng YW, Chen YC, Kao CL, Hsu CJ, Shyr YM et al. Using human plasma supplemented medium to cultivate human bone marrow-derived mesenchymal stem cell and evaluation of its multiple-lineage potential. *Transplant Proc*. 2005;37:4504-5.

51. Ramseier CA., Rasperini G., Batia S, Giannobile WV. Advanced reconstructive technologies for periodontal tissue repair. *Periodontology* 2000. 2012;59:185–202.
52. Murphy WL, Mooney DJ. Controlled delivery of inductive proteins, plasmid DNA and cells from tissue engineering matrices. *J Periodontal Res.* 1999;34:413–9.
53. Huang GT. Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress. *Regen Med.* 2009;4:697–707.
54. Smith AJ, Lumley PJ, Tomson PL, Cooper PR. Dental regeneration and materials: a partnership. *Clin Oral Investig.* 2008;12:103–8.
55. Kramer PR, Nares S, Kramer SF, Grogan D, Kaiser M. Mesenchymal stem cells acquire characteristics of cells in the periodontal ligament in vitro. *J Dent Res.* 2004;83:27–34.
56. Mjor IA. Dentin permeability: the basis for understanding pulp reactions and adhesive technology. *Braz Dent J.* 2009;20:3–16.
57. Huang GT, Shagramanova K, Chan SW. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. *J Endod.* 2006;32:1066–73.
58. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002;81:531–35.

59. Demarco FF, Casagrande L, Zhang Z, Dong Z, Tarquinio SB, Zeitlin BD, et al. Effects of morphogen and scaffold porogen on the differentiation of dental pulp stem cells. *J Endod*. 2010;36:1805–11.
60. Casagrande L, Demarco FF, Zhang Z, Araujo FB, Shi S, Nor JE. Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *J Dent Res*. 2010;89:603–8.
61. Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado MA, Shi S, et al. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res*. 2010;89:791–6.
62. Rosa V. Engenharia de tecidos com células-tronco de dentes decíduos e scaffolds injetáveis e a formação de polpa dental funcional.[Doctoral Thesis] São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo; 2010. p. 98.
63. Brey EM, Uriel S, Greisler HP, McIntire LV. Therapeutic neovascularization: contributions from bioengineering. *Tissue Eng*. 2005;11:567–84.
64. 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.
65. Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Iezzi G, Piattelli A, Giardino R. Mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma enhance bone formation

- in sinus grafting: a histomorphometric study in minipigs. *J Clin Periodontol*. 2008;35:539–46.
66. Meijer GJ, de Bruijn JD, Koole R, van Blitterswijk CA. Cell based bone tissue engineering in jaw defects. *Biomaterials*. 2008;29:3053–61.
 67. Shayesteh YS, Khojasteh A, Soleimani M, Alikhasi M, Khoshzaban A, Ahmadbeigi N. Sinus augmentation using human mesenchymal stem cells loaded into a beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffold. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;106:203–9.
 68. Smiler D, Soltan M, Lee JW. A histomorphogenic analysis of bone grafts augmented with adult stem cells. *Implant Dent*. 2007;16:42–53.
 69. Ito K, Yamada 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.
 70. Ramalingam M, Ramakrishna S, Best S. *Biomaterials and Stem Cells in Regenerative Medicine*. Boca Raton: CRC Press; 2012.
 71. 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.
 72. Barnes CP, Sell SA, Boland ED, Simpson DG, Bowlin GL. Nanofiber technology: designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59:1413–33.

73. Mooney DJ, Vandenburgh H. Cell delivery mechanisms for tissue repair. *Cell Stem Cell*. 2008;2(3):205–13.
74. Lewin M, Carlesso N, Tung CH et al. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol*. 2000;18(4):410–4.
75. Sharma S, Srivastava D, Grover S, Sharma V. Biomaterials in Tooth Tissue Engineering: A Review. *J Clin Diagn Res*. 2014; 8(1): 309–15.
76. Taghizadeh RR, Cetrulo KJ, Cetrulo CL. Wharton's Jelly stem cells: future clinical applications. *Placenta*. 2011;32(Suppl 4):S311–S315. doi: 10.1016/j.placenta.2011.06.010.
77. Ravindran S, Huang CC, George A. Extracellular matrix of dental pulp stem cells: Applications in pulp tissue engineering using somatic MSCs. *Front Physiol*. 2014;4:395.
78. Thibodeau B. Case report: Pulp revascularization of a necrotic, infected, immature, permanent tooth. *Pediatr Dent*. 2009;31:145–8.
79. Torabinejad M, Faras H. A clinical and histological report of a tooth with an open apex treated with regenerative endodontics using platelet-rich plasma. *J Endod*. 2012;38:864–8.
80. Shimizu E, Jong G, Partridge N, Rosenberg PA, Lin LM. Histologic observation of a human immature permanent tooth with irreversible pulpitis after revascularization/regeneration procedure. *J Endod*. 2012;38:1293–7.

81. Lenzi R, Trope M. Revitalization procedures in two traumatized incisors with different biological outcomes. *J Endod.* 2012;38:411–4.
82. Nosrat A, Homayounfar N, Oloomi K. Drawbacks and unfavorable outcomes of regenerative endodontic treatments of necrotic immature teeth: A literature review and report of a case. *J Endod.* 2012;38:1428–34.
83. Lymperi S, Ligoudistianou C, Taraslia V, Kontakiotis E, Anastasiadou E. Dental stem cells and their applications in dental tissue engineering. *Open Dent J.* 2013;7:76–81.

Monika Medved rođena je 28. siječnja 1990. godine u Zagrebu. Nakon završene srednje škole 2008. godine upisuje studij dentalne medicine na Stomatološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Dobitnica je Rektorove nagrade za znanost u akademskoj godini 2013./2014. na temu: Procjena citotoksičnog i genotoksičnog učinka hijaluronske kiseline, preparata na bazi kalcij hidroksida i dentinskih adheziva na staničnu liniju V79. Sudjelovala je u radu Geronto projekta. Sudjelovala je u radu Colgate preventivnog programa edukacije u dječjim vrtićima grada Zagreba. Prisustvovala je prvom European visiting programu koji se održao u Lyonu u veljači 2015. Aktivno se služi engleskim jezikom i pasivno francuskim jezikom.