Matične stanice iz mliječnih zuba: postupak pohrane i upotreba

Lomnicki, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:127:968792

Rights / Prava: Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

University of Zagreb School of Dental Medicine Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

STOMATOLOŠKI FAKULTET

Lucija Lomnicki

MATIČNE STANICE IZ MLIJEČNIH ZUBA: POSTUPAK POHRANE I UPOTREBA

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Rad je ostvaren u: Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za dječju i preventivnu stomatologiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Dubravka Negovetić-Vranić, dr. med. dent., Zavod za dječju i preventivnu stomatologiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Lektor hrvatskog jezika: Krunoslava Paripović, prof. povijesti i hrvatskog jezika i književnosti

Lektor engleskog jezika: Željka Zappalorto Pisk, dipl. anglist i dipl. germanist

Sastav Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. _____

2. _____

3. _____

Datum obrane rada: _____

Rad sadrži: 38 stranica

5 slika

1 CD

Osim ako nije drukčije navedeno, sve ilustracije (tablice, slike i dr.) u radu izvorni su doprinos autora diplomskog rada. Autor je odgovoran za pribavljanje dopuštenja za korištenje ilustracija koje nisu njegov izvorni doprinos, kao i za sve eventualne posljedice koje mogu nastati zbog nedopuštenog preuzimanja ilustracija odnosno propusta u navođenju njihova podrijetla.

Zahvala

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Dubravki Negovetić-Vranić na pomoći, strpljenju i korisnim savjetima tijekom izrade ovog diplomskoga rada.

Posebno hvala mojoj obitelji, a osobito majci, koja mi je tijekom studiranja davala podršku i ljubav.

Zahvaljujem svojoj teti Lidiji i bratiću Martinu koji su dolazili na moje vježbe.

Zahvaljujem također svim svojim prijateljima i kolegama na podršci i ugodnom druženju.

Matične stanice iz mliječnih zuba: postupak pohrane i upotreba

Sažetak

Istraživanjem matičnih stanica došlo je do novih spoznaja o mogućnosti liječenja stanicama koje se razlikuju od kirurške terapije i terapije lijekovima. SHED su matične stanice pronađene u tkivu mliječnih zuba kod djece. SHED su nezrele, nespecijalizirane stanice iz mliječnih zuba koje mogu rasti u specijalizirane vrste stanica pomoću postupka poznatog kao diferencijacija. SHED stanice se brzo razmnožavaju i rastu mnogo brže od odraslih matičnih stanica, sugerirajući da su manje zrele pa imaju potencijal razviti više vrsta tkiva nego druge vrste matičnih stanica. Vrste SHED-a su: adipociti, hondrociti, osteoblasti i mezenhimalne matične stanice.

Znanstvenici su dosadašnjim istraživanjima dokazali da se SHED mogu upotrebljavati za regeneraciju zubnih struktura i kosti, u terapiji tkiva neurodegenerativnih stanja kod Parkinsonove bolesti i multiple skleroze, bolesti jetre, dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti, autoimunih bolesti, poremećaja mišićno-koštanog sustava i živaca, regeneracija tkiva nakon ozljeda mozga ili leđne moždine. Povećanjem broja ljudi pogođenih degenerativnim bolestima, bit će sve više potrebe za novim mogućnostima liječenja zbog stalnog starenja populacije. Pohranjivanje SHED-a osigurat će njihovu dostupnost u budućnosti, onda kada to ljudima bude najviše potrebno. SHED će imati najveći budući učinak ako se pohrane dok su pacijenti mladi i zdravi.

Ključne riječi: matične stanice; SHED; vrste SHED-a; upotreba; pohrana

Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth: Banking Procedure and Usage

Summary

Stem cell research has led to new insights about the possibilities of cell therapy, which differ from surgical therapy and drug therapy. SHED are stem cells found in the exfoliated deciduous teeth of children. SHED cells are immature, unspecialized cells in the deciduous teeth that are able to grow into specialized cell types by a process known as differentiation. SHED cells multiply rapidly and grow much faster than adult stem cells, suggesting that they are less mature and they have the potential to develop into a wider variety of tissue types. Types of SHED are adipocytes, chondrocytes, osteoblasts and mesenchymal stem cells.

Scientists have proved by recent studies that SHED can be used for regeneration of dental tissues and bones, in the treatment of neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease and multiple sclerosis, liver disorders, diabetes, cardio-vascular diseases, autoimmune diseases, disorders of musculoskeletal system and neurological system, regeneration of tissue following brain and spinal cord injuries. As the number of people affected by degenerative diseases increases and well as due to overall aging of population the necessity for new therapeutical possibilities will grow. Banking of SHED shall ensure their availability in the future when they shall be most needed. Banking of SHED shall be the most efficient if they are banked while patients are young and healthy.

Key words: stem cells, SHED, types of SHED; usage, banking

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1. 1 Matične stanice 2

1. 2 Embrionalne matične stanice 3

1. 3 Somatske ili adultne matične stanice (ne-embrionalne) 5

2. DENTALNE MATIČNE STANICE 7

2. 1 Dentalne matične stanice iz pulpe zuba 9

2. 1. 1 Inženjering tkiva na stomatološkim matičnim stanicama 9

2. 2 Matične stanice parodontnog ligamenta 10

2. 3 Matične stanice apikalne papile 11

2. 4 Prekursorske stanice dentalnog folikula 12

2. 5 Matične stanice iz mliječnih zuba 12

3. MATIČNE STANICE IZ MLIJEČNIH ZUBA 13

3. 1 Vrste matičnih stanica iz ljudskih mliječnih zuba 15

4. POSTUPAK POHRANE 16

4. 1 Način prikupljanja mliječnih zuba u stomatološkoj ordinaciji 17

4. 2 Laboratorijski postupak za pohranu mliječnih zuba 18

4. 3 Izolacija matičnih stanica 20

4. 4.1 Krioprezervacija 20

4. 4. 2 Magnetsko zamrzavanje: 22

4. 5 Kriteriji prihvatljivosti zuba za SHED bankarstvo 22

5. UPOTREBA 23

5. 1 SHED za inženjerstvo tkiva dentalne pulpe 24

5. 2 SHED za inženjering neuronskih tkiva 25

5. 3. Diferencijacija SHED-a u odnosu na hormonske stanice 27

6. RASPRAVA 28

7. ZAKLJUČAK 31

8. LITERATURA 33

9. ŽIVOTOPIS 37

Popis skraćenica

DPSCs – dentalne matične stanice iz pulpe zuba (eng. dental pulp stem cells)

PDLSCs – matične stanice parodontnog ligamenta (eng. periodontal ligament stem cells)

PDL – parodontni ligament

SCAPs – matične stanice apikalne papile

DFPCs – prekursorske stanice dentalnog folikula (eng.dental follicle precursor cells)

SHEDs – matične stanice iz izvađenih mliječnih zuba (eng. stem cells from human exfoliated deciduous teeth)

MPC – mezenhimne progenitorske stanice

PBSA – Dulbeccova fosfatna puferirana otopina soli bez kalcijevih i magnezijevih iona

MSC – mezenhimalni stanični medij

CAS – sistem živih stanica (eng.cells alive system)

GFAP – glijalni kiseli fibrilarni protein

NeuN – neuronske jezgre

EGF – epidermalni faktor rasta

FGF – fibroblastični faktor rasta

GAD – glutaminska kiselina dekarboksilaze

NFM – neurofilament M

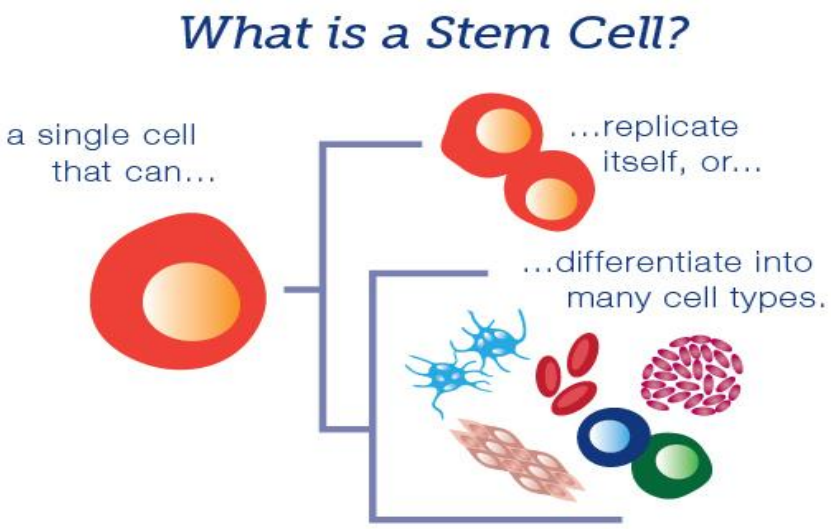
Apo E – Apolipoprotein E

ICA – stanice nalik otočićima

MIN6 – β-stanična linija pankreasa miša

1. UVOD

1. 1 Matične stanice



Slika 1. Shematski prikaz matične stanice, njenog samoobnavljanja ili diferencijacije. Preuzeto i prilagođeno iz (1).

Matične stanice jesu nediferencirane stanice u ljudskom tijelu koje imaju sposobnost razviti se u specijalizirane stanice s novom, specijaliziranom funkcijom. Mogu se razviti u različite tipove stanica u tijelu. Matične stanice imaju ulogu u obnavljanju i popravljanju oštećenih stanica i tkiva jer, zbog svoje mogućnosti neograničene diobe, mogu nadomjestiti druge stanice u tijelu i regenerirati oštećeno tkivo. Nakon što se matična stanica podijeli, svaka novonastala stanica ima potencijal ostati matična ili pretvoriti se u novi tip diferencirane stanice (2,3).

Znanstvenici su prvenstveno radili s dvije vrste matičnih stanica životinja i ljudi: embrionalne matične stanice i ne-embrionalne „somatske“ ili „adultne“ matične stanice. Ranija detaljna studija biologije mišjih matičnih stanica, 1998. godine, dovela je do otkrića metode za dobivanje matičnih stanica iz ljudskih embrija i rasta stanica u laboratoriju. Ove stanice nazivaju se ljudskim embrionalnim matičnim stanicama. Zametak koji se koristio u ovim istraživanjima stvoren je za reproduktivne svrhe postupcima in vitro oplodnje. Kada više nisu bile potrebne za tu svrhu, donirali su ih za istraživanje uz pristanak donora (4).

Matične stanice zadovoljavaju dva svojstva: prvo je da one same ne vrše nikakvu djelatnu ulogu u organizmu, ali su sposobne pretvoriti se (diferencirati) u djelatne stanice (npr. eritrocite, žljezdane stanice, mišićne stanice).

Drugo svojstvo matičnih stanica je sposobnost samoobnavljanja jer one osim stvaranja djelatnih stanica, moraju zadržati i mogućnost stvaranja novih matičnih stanica koje se mogu, ako je potrebno, ponovno iskoristiti. Matične stanice nužne su za normalno funkcioniranje odrasle osobe. Neke od njih dijele se ubrzano jer moraju zadovoljiti svakodnevnu potrebu za novim djelatnim stanicama (npr. krvotvorne matične stanice), dok druge miruju u tkivu i bit će potaknute na diferencijaciju samo po potrebi (npr. satelitske stanice u mišićnom tkivu). Matične su stanice pogotovo važne tijekom embrionalnog razvoja kada od nediferenciranih stanica nastaju nove djelatne stanice novog organizma. Diferencijacija obuhvaća niz promjena u kojima stanica postupno dobiva svoj identitet, prilagođava svoju građu i konačno počinje izvršavati svoju djelatnu ulogu. Stoga postoji vrlo složena hijerarhija matičnih stanica određena postupnošću diferencijacije koja je istovremeno praćena ograničavanjem mogućnosti navedenih stanica. Primjerice, od krvotvornih matičnih stanica mogu nastati sve krvne stanice, ali od eritroblasta samo eritrociti (5).

1. 2 Embrionalne matične stanice

Kada su Martin Evans i Matthew Kaufman prvi puta uspostavili kulturu embrionalnih matičnih stanica, njihova osnovna namjera bila je proučavati najranija događanja tijekom embrionalnog razvoja. Umjesto da za svaki pokus izoliraju nove mišje zametke, te stanice omogućile su uvid u najraniju diferencijaciju zametka. Ova prva primjena embrionalnih matičnih stanica važna je i danas te se ovim stanicama intenzivno proučavaju diferencijacijski putovi kojima se mogu dobiti one vrste stanica koje su predmet našeg interesa. Posebno je zanimljiva mogućnost dobivanja srčanih mišićnih i živčanih stanica jer se te stanice ne obnavljaju u našem tijelu, te bi se embrionalne matične stanice mogle iskoristiti kao nadomjestak izgubljenih stanica nakon oštećenja ili bolesti. Svojstvo totipotentnosti embrionalnih matičnih stanica (tj. svojstvo da od njih nastane bilo koja stanica odraslog organizma) istovremeno je i prednost i nedostatak – od njih se mogu dobiti sve potrebne stanice, ali će embrionalne matične stanice uvijek moći napraviti i razne druge vrste stanica, tako da je dosta teško usmjeriti ih isključivo u željenom smjeru.

Znanstvena primjena embrionalnih matičnih stanica vrlo je važna u molekularnoj genetici. Danas, kada poznajemo sekvencu cijelog genoma, pokušavamo razumjeti značenje genomskog zapisa koji sadrži nasljednu informaciju. Osnovni elementi nasljedne informacije jesu geni koji određuju bjelančevine kao djelatne molekule koje oživotvoruju genomski zapis.

Stoga, ako se razjasni što svaka pojedina bjelančevina čini, mogao bi se razumjeti cijeli djelatni mehanizam određen zapisom nasljeđa. Razotkrivanje značenja zapisanog u genomu nazivamo proučavanjem uloge gena i za to su nam potrebne embrionalne matične stanice.

Poznavanje svojstava matičnih stanica otvorilo je put potpuno novom pristupu u medicini koji se bitno razlikuje od kirurške terapije i terapije lijekovima. To je nadomjesna terapija stanicama kojom bi se zbog bolesti nedjelotvorne, oštećene ili izgubljene stanice nadomjestile novima. Kao i u spontanom procesu cijeljenja, osnovni izvor novih djelatnih stanica jesu matične stanice. Primjer ovakve nadomjesne terapije stanicama, a koji već danas predstavlja uhodanu medicinsku praksu, je presađivanje koštane srži. Zanimljivo je da nadomjesnom terapijom stanica možemo nazvati i transfuziju krvi koja je kao terapijski postupak poznata već stotinjak godina. Novost bi u ovom pristupu bila mogućnost nadomještanja stanica koje nemaju sposobnost cijeljenja, kao što su živčane i srčane mišićne stanice.
Mogućnost nadomještanja tih stanica otvorilo bi put rješavanju velikih zdravstvenih problema koji uključuju bolesti srca i krvnih žila te bolesti mozga.
S obzirom da su embrionalne matične stanice totipotentne one predstavljaju mogući izvor bilo kojih stanica koje bi bile potrebne našem tijelu. Ovladavanjem postupcima diferencijacije matičnih stanica one bi mogle biti unesene u bolesnika i u njegovu bi tijelu postale djelatne stanice koje bi zamijenile oboljele i na taj način izliječile bolest.

Pred mogućom upotrebom embrionalnih matičnih stanica stoji još niz tehnoloških i etičkih prepreka. Jedna od njih je sama totipotentnost embrionalnih matičnih stanica koje, osim što se diferenciraju u željeni tip stanica, također diferenciraju i u druge za terapiju nepotrebne stanice. Kao što zaostale matične stanice tijekom normalnog razvoja zametka uzrokuju teratome, tako je za očekivati i da bi presađivanje matičnih stanica moglo zbog nastanka neželjenih tipova stanica dovesti do stvaranja tumora u tako liječenih osoba.

Istraživanja embrionalnih matičnih stanica uspjela su postići ogroman napredak u zadnje vrijeme, a taj napredak ukazuje na sve veću opravdanost očekivanja njihove primjene u liječenju niza bolesti. Na tom putu stoje još mnoge tehnološke prepreke, ali i nužnost sveobuhvatne procjene etičkih pitanja koja se vežu uz primjenu matičnih stanica. Kako bi se te prepreke otklonile i etičke nedoumice razjasnile, potrebna je široka podrška znanstvenim istraživanjima matičnih stanica koja bi prikupila saznanja, iskustva i rezultate potrebne za što bržu primjenu matičnih stanica u liječenju ljudi (6).

1. 3 Somatske ili adultne matične stanice (ne-embrionalne)

Smatra se da adultna matična stanica predstavlja nediferenciranu stanicu koja se nalazi između diferenciranih stanica u tkivu ili organu. Adultna matična stanica može se obnoviti i može se diferencirati kako bi se dobila neka ili sve glavne specijalizirane vrste stanica tkiva ili organa. Primarne uloge adultnih matičnih stanica u živom organizmu jesu održavanje i popravak tkiva u kojem se nalaze. Znanstvenici također koriste termin somatske matične stanice umjesto adultne matične stanice, gdje se somatski odnosi na stanice tijela (ne na zametne stanice, spermu ili jaja). Za razliku od embrionalnih matičnih stanica, koje su definirane njihovim podrijetlom (stanice iz embrija u predimplantacijskom stadiju), podrijetlo adultnih matičnih stanica u nekim zrelim tkivima još se istražuje.

Istraživanje na adultnim matičnim stanicama izazvalo je veliko uzbuđenje. Znanstvenici su pronašli adultne matične stanice u mnogo više tkiva nego što je nekoć bilo moguće. Zbog tog su se znanstvenog rada istraživači i kliničari zapitali mogu li se adultne matične stanice koristiti za transplantaciju. Zapravo, matične stanice iz koštane srži adultne hematopoetske, ili krvne, koriste se u presađivanju više od 40 godina. Znanstvenici sada imaju dokaze da matične stanice postoje u mozgu i srcu, dvjema lokacijama na kojima se u početku nije očekivalo da postoje adultne matične stanice. Ako se diferencijacija adultnih matičnih stanica može kontrolirati u laboratoriju te stanice mogu postati osnova terapija koja se temelji na transplantaciji.

Adultne matične stanice identificirane su u brojnim organima i tkivima, uključujući mozak, koštanu srž, perifernu krv, krvne žile, koštani mišić, kožu, zube, srce, crijeva, jetru, epitel jajnika i testise. Smatra se da su prisutne u specifičnom području svakog tkiva (zvanom „niša matičnih stanica“). Trenutni dokazi upućuju na to da se u mnogim tkivima nalaze pericitne matične stanice, koje tvore vanjski sloj malih krvnih žila. Matične stanice mogu ostati neaktivne (nedjeljive) kroz duge periode sve dok se ne aktiviraju normalnom potrebom za održavanjem tkiva ili uslijed ozljede tkiva ili bolesti.

Obično u svakom tkivu postoji vrlo mali broj matičnih stanica i nakon što ih se ukloni iz tijela njihova je sposobnost dijeljenja ograničena, zbog čega je stvaranje velikog broja matičnih stanica teško. U brojnim laboratorijima znanstvenici pokušavaju pronaći bolji način uzgoja većih količina adultnih matičnih stanica iz staničnih kultura i manipulirati ih kako bi se stvorile specijalizirane stanice koje bi se koristile u liječenju ozljeda ili bolesti.

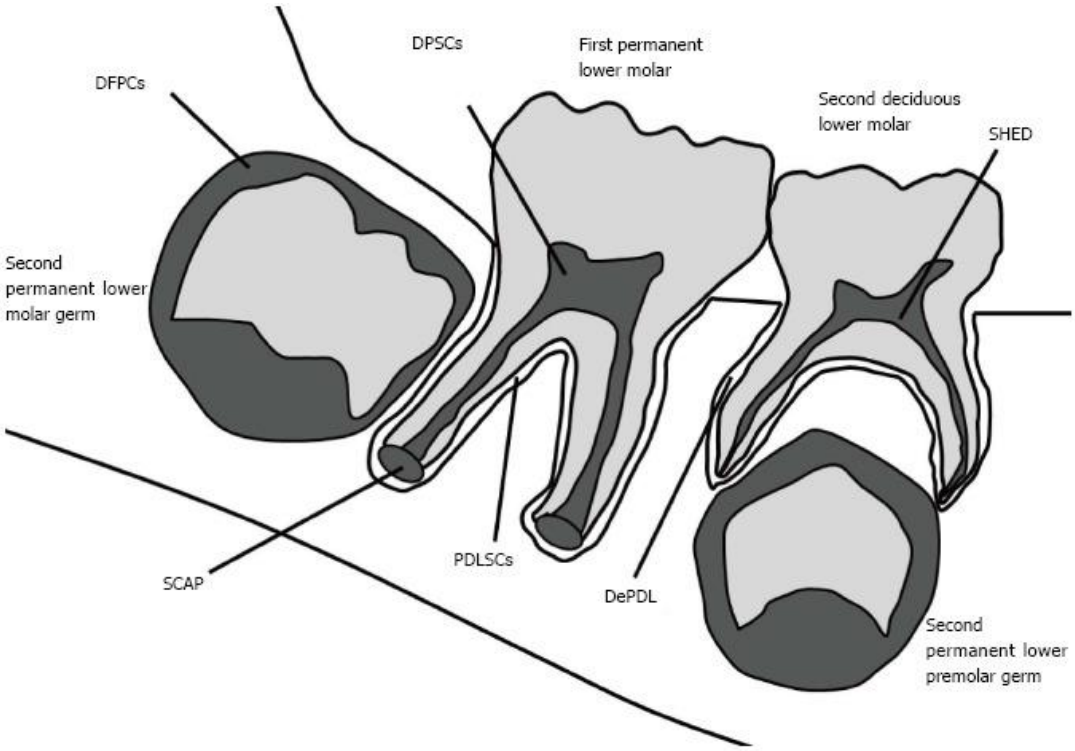
Neki primjeri mogućih tretmana uključuju regeneraciju kostiju koristeći stanice dobivene iz strome koštane srži, razvijanje stanica koje proizvode inzulin za dijabetes tipa 1 i regeneraciju oštećenog srčanog mišića nakon srčanog udara sa stanicama srčanog mišića (4).

Svrha ovog rada je osvrt na istraživanja matičnih stanica, njihove sposobnosti i uloge kod regeneracije oštećenih stanica i tkiva, s posebnim naglaskom na matične stanice iz mliječnih zuba, njihov postupak pohrane i upotreba.

2. DENTALNE MATIČNE STANICE

Matične se stanice mogu izolirati iz različitih dijelova zuba, bilo da su povezane s njegovim razvojem ili da su trenutačno njegov gradivni dio.

Trenutačno izvor za njihovu izolaciju može biti pulpa zuba (DPSCs), periodontalni ligament (PDLSCs), apikalna papila (SCAPs), folikul zuba u razvoju (DFPCs), ispali ili izvađeni mliječni zubi (SHEDs) (7).



Slika 2. Shematski prikaz izvora dentalnih matičnih stanica. Preuzeto i prilagođeno iz (8).

2. 1 Dentalne matične stanice iz pulpe zuba

Zubna pulpa meko je tkivo smješteno u središtu zuba. Ona stvara, podupire i sastavni je dio dentina koji je okružuje. Primarna funkcija pulpe je formativna, ona potiče odontoblaste ne samo da stvaraju dentin, nego i da stupaju u interakciju sa zubnim epitelom u ranom stadiju razvoja zuba kako bi došlo do stvaranja cakline. Nakon stvaranja zuba, pulpa pruža nekoliko sekundarnih funkcija povezanih s osjetljivošću, hidratacijom i obranom zuba.

Dentin i pulpa jedinstven su tkivni kompleks čiji histološki izgled varira s dobi i izloženošću vanjskim podražajima.

Pod svjetlosnim mikroskopom mladi, potpuno razvijeni trajni zubi pokazuju određene prepoznatljive aspekte pulpne arhitekture. U njihovim vanjskim (perifernim) područjima u neposrednoj blizini predentina leži odontoblastički sloj. Prema središtu nalazi se bestanična zona (Weilova zona). Ispod sloja bez stanica nalazi se sloj bogat stanicama. U središtu je područje koje sadrži uglavnom fibroblaste i glavne grane živaca i krvne žile, a naziva se pulpna jezgra.

Matične stanice nalaze se u cijeloj pulpi, iako su najgušće raspoređene u njezinoj jezgri.

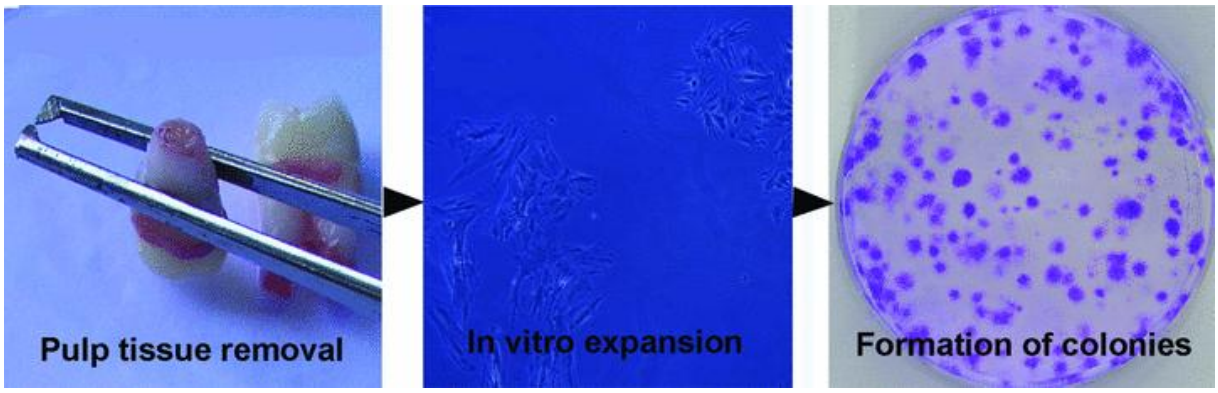
Pod utjecajem poticajnih molekula, oslobođenih kao odgovor na oštećenje i smrt stanice, matične stanice migriraju do mjesta oštećenja i diferenciraju se u odontoblaste.

Ključne poticajne molekule u ovom procesu jesu članice obitelji koštanih morfogenetskih proteina i transformirajućeg β faktora rasta (9).

Matične stanice iz zubne pulpe do sada su izdvojene iz umnjaka, mliječnih sjekutića i prekobrojnih zuba. DPSC se može reprogramirati u više staničnih linija kao što su: odontoblasti, osteoblasti, hondrociti, miociti, neurociti, adipociti, epitelne stanice rožnice, stanice melanoma, pa čak i inducirane pluripotentne matične stanice (10).

2. 1. 1 Inženjering tkiva na stomatološkim matičnim stanicama

Budući da zreli zub ne može popraviti ili napraviti novu caklinu, znanstvenici su se usredotočili na bioinženjering dentina iz celuloze i PDL kompleksa, uključujući cementnu i alveolarnu kost. Stomatološke matične stanice, izvorno izvedene iz ektomezenhima, smatraju se novim izvorom ljudskih adultnih matičnih stanica za regenerativnu medicinu. To se može dobiti iz mliječnih zuba ili ekstrahiranih trajnih zuba.



Slika 3. Prikaz inženjeringa tkiva pulpe. Preuzeto i prilagođeno iz (11).

Ove matične stanice mogu se koristiti za izvođenje autologne zamjene stanica. Mogućnost prikupljanja potrebnih stanica od pacijenta čini ovaj proces atraktivnim. Ključno pitanje koje treba riješiti je jesu li ove stomatološke stanice doista matične stanice. Različite studije dokazale su da stomatološka pulpa i PDL stanice imaju značajke mezenhimalnih matičnih stanica, temeljene na njihovoj sposobnosti razlikovanja u hrskavici, kostima, masnoći, mišićima i živčanom tkivu. Osim zubne pulpe i PDL-a, mezenhimalne matične stanice imaju raznoliku raspodjelu in vivo budući da mogu biti izvedene iz većine, ako ne i svih, vezivnih tkiva uključujući koštanu srž, periost, sinovijsku membranu, skeletni mišić, dermis, pericit, krv, trabekularne kosti, ljudske pupčane vrpce i pluća.

2. 2 Matične stanice parodontnog ligamenta

Parodont, tkivo koje okružuje i podupire korijen zuba, sastoji se od cementa, PDL-a i alveolarne kosti.

Parodontni ligament je, kao i zubna pulpa, specijalizirano vezivno tkivo. Njegova funkcija je djelomično povezana s prisutnošću specijalno raspoređenih snopova kolagenih vlakana koja podupiru zub u alveoli i apsorbiraju sile okluzije koje se prenose na okolnu kost.

PDL prostor je malen i varira od prosječnih 0,21 mm kod mladih zuba do 0,15 mm kod starih zuba (9).

PDL je odavno prepoznat da sadrži populaciju progenitorskih stanica, a studije su nedavno identificirale matične stanice PDL sposobnog za diferenciranje uz mezenhimalne stanične linije za proizvodnju stanica poput cementoblasta, adipocita i vezivnim tkivima bogatim kolagenom I.

PDL matične stanice (PDLSC) pokazuju karakteristike markera stanične površine i potencijal diferencijacije sličan stromalnim matičnim stanicama koštane srži i DPSC.
Dokazano je da ove stanice zadržavaju svojstva matičnih stanica i sposobnost regeneracije tkiva. Rezultati istraživanja u laboratorijima sugeriraju da se ova populacija stanica može koristiti za stvaranje biološkog korijena koji bi se mogao koristiti na sličan način kao i metalni implantat, zatvarajući se umjetnom zubnom krunom (10).

2. 3 Matične stanice apikalne papile

Matične stanice iz apikalne papile (SCAP) jedinstvena su populacija zubnih mezenhimalnih matičnih stanica i također različite od matičnih stanica zubne pulpe. Studija i primjena ovog tipa stanica iznimno su važni u prirodnoj regeneraciji korijena zuba, a posebno u liječenju oralnih bolesti. One su sposobne formirati odontoblastno slične stanice i proizvode dentin in vivo i vjerojatno će biti izvor stanica primarnih odontoblasta za formiranje korijena dentina. Otkriće SCAP-a može također objasniti klinički fenomen koji je predstavljen u brojnim kliničkim slučajevima koji pokazuju da se apeksogeneza može pojaviti u zaraženim nezrelim trajnim zubima s apikalnim parodontitisom ili apscesom. Vjerojatno je da su SCAP koje borave u apikalnoj papili preživjele infekcije zbog blizine periapikalnih tkiva. Ovo tkivo može imati koristi od svoje kolateralne cirkulacije, što omogućava da preživi tijekom procesa pulpne nekroze. Nakon endodontske dezinfekcije, ove stanice dovode do primarnih odontoblasta za dovršetak stvaranja korijena (10).

2. 4. Prekursorske stanice dentalnog folikula

Dentalni folikul je labavo vezivno tkivo koje okružuje zub u razvoju. Dentalni folikul odavno se smatra multipotentnim tkivom, na temelju njegove sposobnosti stvaranja cementa, kosti i PDL-a izvedenog iz ektomezenhimskog fibroznog tkiva. Zubne stanice prekursora folikula (DFPC) mogu se izolirati i uzgajati pod određenim uvjetima kulture tkiva, a nedavna karakterizacija ovih matičnih stanica povećala je njihov potencijal za primjenu u inženjeringu tkiva, uključujući parodontnu i koštanu regeneraciju. DFPC oblikuje PDL diferenciranjem u PDL fibroblaste koji luče kolagen i interakciju s vlaknima na površinama susjedne kosti i cementa.

Zubne progenitorske stanice folikula izolirane iz ljudskog trećeg kutnjaka karakteriziraju njihovo brzo povezivanje u kulture i sposobnost stvaranja kompaktnih kalcificiranih čvorova in vitro. DFPC, zajedno sa SCAP-om, predstavljaju stanice iz tkiva u razvoju i mogu na taj način pokazati veću plastičnost od ostalih zubnih matičnih stanica. Međutim, na isti način kao i za SCAP, potrebna su daljnja istraživanja koja se provode na svojstvima i potencijalnom korištenju ovih stanica (10).

2. 5 Matične stanice iz mliječnih zuba (SHED)

SHED su postnatalne matične stanice sposobne za opsežnu proliferaciju i multipotencijalnu diferencijaciju. Mliječni zubi mogu biti idealan izvor postnatalnih matičnih stanica za regeneraciju zubnih struktura i kosti, te moguće liječenje ozljeda živčanog tkiva ili degenerativnih bolesti. SHED su visoko proliferativne stanice izvedene iz pristupačnog izvora tkiva i stoga zadržavaju potencijal za pružanje dovoljnog broja stanica za kliničke primjene.

Iako se SHED izdvaja iz zubne pulpe, njihov potencijal diferencijacije nije ograničen samo na odontoblaste. Zapravo, SHED se može razlikovati u nekoliko tipova stanica, uključujući neurone, osteoblaste, adipocite i endotelne stanice (12).

3. MATIČNE STANICE IZ MLIJEČNIH ZUBA

S dokumentiranim otkrićem SHED-a dr. Songtaoa Shija 2003. godine matične stanice mliječnih zuba postale su dostupan izvor matičnih stanica koje se lako mogu očuvati i koristiti za buduće liječenje bolesti.

SHED su nezrele, nespecijalizirane stanice u zubima koje mogu rasti u specijalizirane vrste stanica pomoću postupka poznatog kao „diferencijacija“. SHED se pojavljuju u 6. tjednu tijekom embrionalnog stadija čovjekova razvoja. Znanstvenici vjeruju da se te matične stanice ponašaju drukčije nego postnatalne (adultne) matične stanice.

SHED stanice se brzo razmnožavaju i rastu mnogo brže od odraslih matičnih stanica, sugerirajući da su manje zrele pa imaju potencijal razviti se u širu raznolikost tipova tkiva.

Abbas i sur. (2008) istraživali su moguće neuralno podrijetlo matičnih stanica dentalne pulpe iz mliječnih zuba (SHED). Neuronske krvne stanice jesu multipotentne stanice koje su sposobne samostalno obnavljati i višestruke diferencijacije te igraju važnu ulogu u razvoju zuba tako što omogućuju izgradnju mezenhimalnih komponenti zuba uključujući odontoblaste, pulpu, apikalne vaskulature i parodontni ligament.

SHED je heterogena populacija koja dijeli zajedničke molekularne karakteristike s neuralnim krvnim stanicama i matičnim stanicama in vitro. Takva sposobnost rasta i regeneracije tkiva fokus je nastajanja polja personalizirane medicine koja koristi pacijentove matične stanice za biološki kompatibilne terapije i individualno prilagođene tretmane.

Nadalje, SHED su sposobne za ekspresiju proteina na njihovim staničnim površinama koje im dozvoljavaju ne samo da se diferenciraju u zubnoj pulpi, kosti i dentinu, nego i u neuralne i masne stanice (adipocite). Činjenica je da se SHED diferenciraju u živčanim stanicama lakše nego odrasle matične stanice izolirane od trajnih zuba. SHED izražavaju različite neuronske i glijalne stanične markere koji izravno odražavaju embrionalno neuralno podrijetlo zubne pulpe.

Onkogeni potencijal matičnih stanica još se treba odrediti u opsežnim kliničkim studijama. Istraživanja su do danas uglavnom ograničena na životinjske modele i još uvijek istraživanja na ljudima treba dokumentirati istim rezultatima. Treba uzeti u obzir poteškoće u prepoznavanju, izoliranju, pročišćavanju i rastu ovih stanica u laboratoriju, kako bi se ove stanice terapeutski koristile u većim količinama. Imunološko odbacivanje je također jedno od pitanja koje zahtijeva temeljitu obradu.

Konačno, ove stanice su relativno manje potentne od embrionalnih matičnih stanica (13).

3. 1 Vrste matičnih stanica iz ljudskih mliječnih zuba

1) Adipociti su uspješno korišteni da bi popravili oštećenje srčanog mišića uzrokovano teškim srčanim napadom. Tu su i preliminarni podaci koji ukazuju na to da se mogu koristi za liječenje kardiovaskularnih bolesti, kralježnice i ortopedskih stanja, kongestivnog zatajenja srca, Crohnove bolesti, a moguće je korištenje kod plastičnih operacija.
2) Hondrociti i osteoblasti: oba su uspješno korištena za rast kosti i hrskavica prikladnih za transplantaciju. Također, korišteni su pri rastu zuba kod životinja.
3) Mezenhimalne matične stanice uspješno su korištene za popravak ozljeda leđne moždine i za vraćanje osjećaja i kretanja kod paraliziranih ljudskih pacijenata. Kako ove stanice mogu formirati neuronske nakupine, mezenhimalne matične stanice također imaju potencijal za liječenje neuronalnih degenerativnih poremećaja kao što su Alzheimerova i Parkinsonova bolest, cerebralnu paralizu, kao i niz drugih poremećaja. Mezenhimalne matične stanice imaju veći terapeutski potencijal od drugih vrsta odraslih matičnih stanica (13).

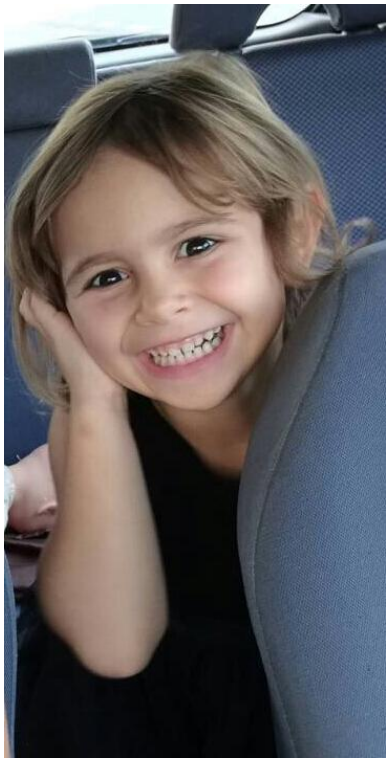
4. POSTUPAK POHRANE

Za liječenje mnogih stanja vrše se istraživanja na terapijama temeljenih na matičnim stanicama, uključujući neurodegenerativna stanja kod Parkinsonove bolesti i multiple skleroze, bolesti jetre, dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti, autoimunih bolesti, poremećaja mišićno-koštanog sustava i živaca, regeneracija nakon ozljeda mozga ili leđne moždine.

Trenutno, bolesnici se liječe primjenom matičnih stanica za kronične prijelome, rak (transplantacijom koštane srži) i kirurgijom spinalne fuzije. Nove terapije matičnih stanica neprestano se testiraju i neke je već odobrila Američka agencije za hranu i lijekove. Povećanjem broja ljudi pogođenih degenerativnim bolestima, rastu i potrebe za novim mogućnostima liječenja zbog stalnog starenja populacije. Pohranjivanje i bankarstvo SHED-a osigurat će njihovu dostupnost u budućnosti, onda kada im bude najviše potrebno.

Ovaj sveobuhvatan popis bolesti i stanja koje se liječe korištenjem matičnih stanica uključuje poremećaje matičnih stanica, akutnu i kroničnu leukemiju, mijeloproliferativne poremećaje, mijelodisplastične sindrome, limfoproliferativne poremećaje, nasljedne abnormalnosti eritrocita, liposomske poremećaje, histiocitne poremećaje, poremećaje fagocita, kongenitalne poremećaje imunološkog sustava, naslijeđene abnormalnosti trombocita, poremećaje plazma stanica i maligne bolesti (13).

4. 1 Način prikupljanja mliječnih zuba u stomatološkoj ordinaciji



Slika 4. Mliječni zubi

Budući da je SHED bankarstvo proaktivna odluka roditelja, prvi je korak upućen njima da ostave mliječni zub u sterilnoj otopini soli i nazovu banku za pohranu matičnih stanica iz zuba ili kontaktiraju stomatologa u banci.

Izvađeni zub trebao bi imati pulpu crvene boje, ukazujući na to da je pulpa dobila protok krvi sve do vremena uklanjanja zuba, što je indikativno za održivost stanica. Ako je pulpa sive boje, vjerojatno je da je protok krvi u pulpu bio ugrožen, a time su i matične stanice vjerojatno nekrotične i više se ne mogu oporaviti.

Zubi koji postaju klimavi, bilo kroz traumu ili bolest (npr. klasa III ili IV mobilnosti), često imaju odvojenu krvnu opskrbu i nisu kandidati za oporavak matičnih stanica. Zbog toga je oporavak matičnih stanica iz mliječnih zuba poželjniji nakon ekstrakcije, nego mobilni zub.

Matične stanice pulpe ne bi se smjele prikupljati sa zuba s apikalnim apscesom, tumorom ili cistom. U slučaju zakazanog postupka, stomatolog vizualno pregledava svježe izvađen zub da potvrdi prisutnost zdravog pulpalnog tkiva, a zub ili zubi prenose se u bočicu koja sadrži hipotonični fosfat s puferiranom otopinom soli koja pruža hranjive tvari i pomaže kako bi se spriječilo isušivanje tkiva tijekom transporta (do četiri zuba u jednoj bočici). Stavljanje zuba u ovu bočicu na sobnu temperaturu uzrokuje hipotermiju. Tada se bočica pažljivo zapečati i termički izolira, nakon čega se stavi u izoliranu metalnu transportnu posudu. Tako izolirana transportna posuda održava uzorak u hipotermalnom stanju tijekom prijevoza.

Tvrtka koja se bavi bankama matičnih stanica koristi isti uređaj kao i onaj koji se koristi za transport matičnih stanica iz stomatološke ordinacije do laboratorija. Kako bi matične stanice ostale sposobne za život, važno je pripaziti da vrijeme i temperatura uzorka budu u potrebnim granicama. Vrijeme od uzimanja uzorka do dolaska u stomatološku banku na obradu ne smije prijeći 40 sati. Takve korake poduzima asistent stomatološke banke, ako prethodno nije planirana ekstrakcija za prikupljanje uzorka (13).

4. 2 Laboratorijski postupak za pohranu mliječnih zuba

Međunarodne organizacije koje su uspostavile pravila i smjernice za rad banaka matičnih stanica krvi iz pupkovine i ostalih matičnih stanica prije svega jesu NETCORD (dio EUROCORD-a) u suradnji s FACT-om (Zaklada za akreditiranje stanične terapije). Postupci koje slijedi laboratorijska obrada za pohranu matičnih stanica potpuno su usklađeni s uputama navedenih organizacija:

1) aseptični uvjeti: vrlo važno pravilo za banke matičnih stanica je osigurati da se svi procesi u laboratorijima provode u sterilnim uvjetima i u potpuno kontroliranom i čistom okruženju sa sustavom koji održava aseptičke uvjete zraka u prostoru;
2) kodiranje uzoraka**:** svi se uzorci kodiraju crtičnim kodom, na jedinstven način, tako da je uvijek moguće prepoznati i identificirati uzorak i isključiti mogućnost miješanja uzoraka;
3) inicijalna procjena uzorka: uzorak se procjenjuje prema stanju i duljini sekcije tkiva koje je sakupljeno prije početka daljnje obrade;
4) izolacija i kultura mezenhimalnih matičnih stanica: tkivo je podvrgnuto dugom procesu u kojem se mezenhimalne stanice oslobađaju, a potom se uzgajaju u odgovarajućim medijima u optimalnim uvjetima koji pogoduju njihovu razvoju. Razvojni proces rastućih mezenhimalnih stanica nastavlja se sve dok ne osiguramo dovoljan broj održivih stanica bez kontaminacije, a koje će biti prikladne za buduće liječenje ili korištenje. Vrijeme koje će trebati da se postigne odgovarajući broj ovisi o samim stanicama i njihovoj stopi rasta. Na kraju ovog procesa i prije zamrzavanja sve su stanice podijeljene u zasebne poduzorke (ovisno o njihovu konačnom broju);
5) kontrola mikrobne kontaminacije: na matičnim stanicama provodimo kompletnu mikrobiološku kontrolu uzorka kako bismo provjerili prisutnost kontaminacije bakterijama i gljivicama. U slučaju mezenhimalnih stanica, ako se provodi mikrobna kontaminacija, to obično sprečava njihovo razvijanje pa se stoga cijeli proces usporava
6) kontrola broja i održivosti stanica: pažljiva kontrola provodi se kod broja i održivosti mezenhimalnih stanica prije zamrzavanja;
7) zamrzavanje uzorka: način na koji se najbolje postiže krioprezervacija je postupno zamrzavanje i koristi se upravo na isti način za sve različite vrste uzoraka. Krioprezervacija mezenhimalnih matičnih stanica izvodi se pomoću posebnog automatiziranog stroja koji kontroliraju računala i posebni programi;
8) pohrana uzorka: ukupan broj mezenhimalnih stanica dijeli se u dvije ili više bočica, ovisno o broju, za dodatnu sigurnost i svestranost uporabe. Pohranjuju se u posebnim spremnicima punjenim tekućim dušikom, na temperaturi ispod -150 °C u kontinuiranom 24-satnom nadzoru (14).

4. 3 Izolacija matičnih stanica

Kada stomatološka banka dobije bočicu s uzorkom, slijedi protokol:

1) površina zuba očisti se ispiranjem tri puta s Dulbeccovom fosfatnom puferiranom otopinom soli bez kalcijevih i magnezijevih iona (PBSA);
2) dezinfekcija se vrši s dezinfekcijskim reagensom kao npr. povidon jodom i ponovno ispire s PBSA-om;
3) tkivo pulpe je izolirano iz pulpne komore sa sterilnim malim pincetama ili stomatološkim instrumentom. Pulpa bogata matičnim stanicama također se može isprati slanom vodom od centra zuba;
4) kontaminirano pulpno tkivo, koje je najmanje tri puta isprano s PBSA-om, stavljeno je u sterilnu Petrijevu posudu;
5) tkivo se zatim digestira s kolagenazom tipa I i odstrani 1 sat na 37 °C;
6) izolirane stanice se propuštaju kroz 70 μm filtar da bi se dobile pojedinačne stanične suspenzije;
7) tada se stanice uzgajaju u mezenhimalnom staničnom mediju (MSC) koji se sastoji od alfa modificiranog minimalnog esencijalnog medija s 2 mM glutamina i dodatkom 15 % fetalnog goveđeg seruma (FBS), 0,1 M fosfata L-askorbinske kiseline, 100 U/ml penicilina i 100 ug/ml streptomicina na 37 °C i 5 % CO2 u zraku. Uobičajeno izolirane kolonije vidljive su nakon 24 sata;
8) mijenjanjem u MSC mediju mogu se dobiti različite stanične linije kao što su odontogene, adipogene i neuralne;
9) ako se kultura dobije s neodređenom pripremom, mogu se uspostaviti epitelne stanice ili endotelne stanice sa sličnom kolonijom stanica.

Potvrda trenutnog zdravlja i održivosti ovih stanica daje se roditeljima donatora (13).

4. 4 Pohrana SHED-a

U svjetlu sadašnjih istraživanja, koriste se sljedeća dva pristupa za pohranu matičnih stanica:
a) krioprezervacija
b) magnetno zamrzavanje.

4. 4. 1 Krioprezervacija

To je proces očuvanja stanica ili cijelog tkiva hlađenjem na niskim temperaturama.
Na temperaturi zamrzavanja, biološka aktivnost je zaustavljena, tj. bilo koji stanični procesi koji dovode do stanične smrti. SHED se mogu dugoročno uspješno pohraniti krioprezervacijom i još uvijek će ostati održive za upotrebu. Ove stanice mogu biti krioprezervirane na duže vrijeme i, kada je to potrebno, treba ih pažljivo odmrznuti kako bi ostale održive.
Stanice koje se skupljaju blizu kraja faze rasta (oko 80 – 90 %) najbolje su za krioprezervaciju. Uzorak je podijeljen u četiri krio-tube i svaki je dio pohranjen u zasebnu lokaciju u kriogenom sustavu, tako da čak i ako postoji problem s jednom od jedinica za pohranu, bit će još drugi uzorak dostupan za upotrebu. Stanice su sačuvane u tekućoj dušičnoj pari pri temperaturi manjoj od -150 ºC. To čuva stanice i održava njihovu latenciju i potenciju. Optimalan broj smrznutog medija u jednoj bočici je 1-2x 1 000 000 stanica u 1,5 ml.
Premali ili previsoki broj stanica može smanjiti stopu oporavka.
Suchánek J. i suradnici su 2007. godine uspostavili protokol dentalnih pulpnih matičnih stanica (DPSC) i kultiviranje DPSC od odraslih i izvađenih zuba i usporedili ih s kulturama mezenhimnih progenitorskih stanica. U usporedbi s MPCs-om koštane srži, DPSC-ovi imaju slične biološke osobine i svojstva matičnih stanica. Rezultati su dokazali da su DPSC i MPC bile visoko proliferativne, klonogene stanice koje mogu ostati citogenetički stabilne
Zhang i suradnici su još 2006. godine procijenili diferencijalni potencijal matičnih stanica iz krioprezervirane pulpe ljudskog trećeg molara i zaključili da tkivo pulpe trećeg molara može poslužiti kao prikladan izvor multipotentnih matičnih stanica za buduće strategije inženjerstva tkiva i terapije na temelju stanica, čak i nakon krioprezervacije.
Papaccio G. i suradnici su također 2006. godine proučavali diferencijaciju i morfo-funkcionalna svojstva stanica dobivenih iz matičnih stanica nakon dugotrajne krioprezervacije da bi ocijenili njihov potencijal za dugotrajno pohranjivanje s namjerom kasnijeg korištenja u terapiji. Zaključili su da zubna pulpa, matične stanice i stanice izvedene iz osteoblasta mogu biti dugoročno krioprezervirane, što se može pokazati atraktivnim za kliničke rezultate (13).

4. 4. 2 Magnetsko zamrzavanje:

Sveučilište u Hirošimi radije koristi magnetsko zamrzavanje nego kriogeno zamrzavanje. Ova tehnologija pod nazivom CAS iskorištava malo poznate pojave koje primjenom čak i slabog magnetskog polja na vodu ili stanično tkivo smanjuju točku smrzavanja tog tijela do 6 – 7 °C
Ideja CAS-a je da se potpuno ohladi objekt ispod točke smrzavanja, bez zamrzavanja osiguravajući distribuiranu nisku temperaturu bez oštećenja stanične stjenke uzrokovane širenjem leda i smetnji za dospijeće hranjivih tvari do kapilara, što je obično uzrokovano konvencionalnim metodama zamrzavanja.
Zatim, kada se objekt ravnomjerno ohladi, magnetsko polje se isključuje i objekt se zamrzne. Sveučilište u Hirošimi prvo je ukazalo na ovu novu tehnologiju. Koristeći CAS, tvrdi da može povećati stopu preživljavanja stanica u zubima do 83 %. Ovo se uspoređuje sa 63 % za tekući dušik (-196°C), 45 % za ultrahladno zamrzavanje (-80 °C) i samo 21,5 % za zamrzivače u kućanstvu (-20 °C). Održavanje CAS sustavom puno je jeftinije od krioprezervacije i mnogo pouzdanije (13).

4. 5 Kriteriji prihvatljivosti zuba za SHED bankarstvo

Svi zubi nemaju isti potencijal. Zubi, a posebno mliječni sjekutići i očnjaci bez patologije i barem jedna trećina ostataka korijena sadrže ove jedinstvene vrste stanica u dovoljnom broju. Mliječni zubi distalno od očnjaka ne preporučaju se za prikupljanje. Mliječni molari imaju širi korijen, i stoga se zadržavaju u ustima dulje vrijeme od prednjih zuba. Erupcija stražnjih trajnih zuba obično traje dulje vrijeme dok se resorbira mliječni molarni korijen, što može rezultirati odstranjenom pulpnom komorom koja ne sadrži pulpu i stoga nema matičnih stanica. U nekim slučajevima, rano uklanjanje mliječnih kutnjaka za ortodontsko razmatranje (npr. rana intervencija za održavanje prostora) daje mogućnost da se ovi zubi sačuvaju za bankarstvo matičnih stanica (13).

5. UPOTREBA

5. 1 SHED za inženjerstvo tkiva dentalne pulpe

Unatoč uvođenju novih materijala, lijekova i alata za kliničko liječenje bolesti zubnih pulpa, načela liječenja korijenskoga kanala nisu se značajno udaljila od paradigme dezinfekcije i obturiranja. Ovaj dobro uspostavljeni pristup predstavlja visoke stope uspjeha u ordinacijama, ali samo se temelji na zamjeni organskih tkiva sa sintetskim i, u mnogim slučajevima, inertnim materijalima To često ograničava završetak razvitka korijena u nezrelim zubima. Dakle, razvoj klinički pristupačnih tehnika koje dopuštaju regeneraciju funkcionalne zubne pulpe koja je sposobna za polaganje organizirane i mineralizirane matrice vrlo je značajan. Pomak prema regenerativnoj endodonciji može dovesti do spašavanja vitalnosti dentalnog živca i daljnjeg razvoja korijenskih struktura.

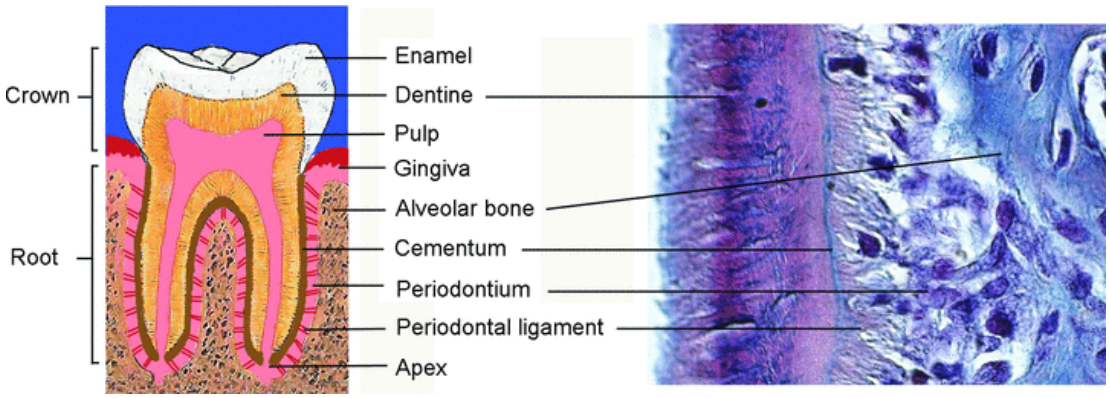
Prvi dokaz da se SHED može koristiti za obnavljanje tkiva pulpe prikazan je u referentnom dokumentu koji je objavio Miura sa suradnicima 2003. godine: SHED su bili pomiješane s hidroksiapatitom/trikalcijevim fosfatom i ugrađeni u potkožni prostor imunokompromitiranih miševa. Nakon osam tjedana, SHED iz jedne ili više kolonija bile su sposobne za preživljavanje i proliferaciju unutar nosača te su formirale dentinu slično tkivo (15).

Površina stanica koje oblažu dentin morfološki podsjeća na odontoblaste koji predstavljaju ekscentrični polarizirani položaj jezgre na bazalnom dijelu staničnog tijela i ekspresiju pozitivnog proteina za dentin sialoprotein (DSP). Kasnije je zamijećen kapacitet SHED-a da se diferencira u potpuno funkcionalne odontoblaste sposobne za taloženje mineralizirane strukture usporedive s dentinom in vivo. Prijenos inženjeringa pulpnog tkiva u klinički postavljene uvjete zahtijeva regeneraciju dentalne pulpe unutar pune dužine korijenskog kanala.

Pokazano je da su SHED sposobne pričvrstiti se na zidove dentina i proliferirati unutar korijenskih kanala in vitro (16). 2013. godine transplantirane SHED punom duljinom korijenskih kanala s injekcijskim nosačima bile su sposobne proliferirati se unutar korijenskoga kanala i prikazati markere odontoblastičke diferencijacije nakon 28 dana in vitro. Iznimno, nakon 28 dana od implantacije, ljudsko tkivo poput pulpe zauzima većinu prostora korijenskog kanala bez obzira na vrstu injekcijskih nosača koji se koriste. Inženjeringom nastala dentalna pulpa bila je sposobna položiti novi dentin, kako se pokazalo s tetraciklinskim injekcijama, po stopi od približno 10 μm/dan. Promatrana stopa rasta je unutar raspona za primarni dentin koji varira prema stadiju razvoja i dobi zuba (4 do 15 μm/dan).

Iako su ovi nalazi zanimljivi, oni su povezani sa stvaranjem abnormalnog tkiva. Nužno je provesti studije u budućnosti koje bi procijenile sposobnost SHED-a da generira funkcionalnu zubnu pulpu u usnoj šupljini (17).

5. 2 SHED za inženjering neuronskih tkiva



Slika 5. Shematski prikaz ljudskog molara i histologije zubnog korijena koji pokazuje različita zubna tkiva. Preuzeto i prilagođeno iz (11).

Neurodegenerativni poremećaji okarakterizirani su gubitkom ili degeneracijom neurona, što dovodi do funkcionalnog oštećenja. Iako neki od njih, kao što su Parkinsonova i Alzheimerova bolest, uglavnom utječu na starije osobe, one nisu dio prirodnog procesa starenja. Parkinsonova bolest pogađa 9,7 do 13,8 od 100 000 stanovnika, dok je Alzheimerova bolest postala veliki problem koji se odnosi na javno zdravlje stanovništva zbog starenja svjetskog stanovništva. Osim ovih bolesti, samo u Sjedinjenim Američkim Državama živi približno pet milijuna ljudi koji žive s traumatskim oštećenjima mozga. Ostala oštećenja kao što su moždani udar, oštećenja perifernih živaca i leđne moždine također predstavljaju ogroman teret društvu. Zbog ograničene mogućnosti regeneracije živčanog sustava, terapije na bazi matičnih stanica iskristalizirale su se kao terapijski potencijal. Živčane krvne stanice koje potječu od zubne pulpe čine SHED zanimljivim modelom stanica za istraživanje neuronske regeneracije tkiva (18).

U uvjetima ne-neuronske indukcije SHED izražavaju nestin, glijalni kiseli fibrilarni protein (GFAP), dvostruki kortin, neuronske jezgre (NeuN) i druge markere kako na genetskom tako i na proteinskom nivou. Iako SHED prikazuju neuronske karakteristike u njihovu nediferenciranom stanju, te su stanice sklone diferencijaciji neurona i in vitro i in vivo.

SHED tretiran s medijem kulture koji je dopunjen s epidermalnim faktorom rasta (EGF) i fibroblastičnim faktorom rasta (FGF) nakon četiri tjedna iskazao je veliki udio proteina

neuronskih markera uključujući βIII-tubulin, glutaminsku kiselinu dekarboksilaze (GAD) i NeuN. Ipak, nije bilo povećanja u izrazu nestina, GFAP i neurofilament M (NFM). Sličan je trend uočen u drugoj studiji gdje su diferencirani SHED pokazale pozitivnu ekspresiju glijalnih i neuronskih markera nakon 21 dana. U toj su studiji neke od diferenciranih stanica predstavljale depozite antimijelinskog bazičnog proteina, dok je većina stanica iskazala pozitivne nalaze neuronskog markera βIII-tubulina. Osim toga, diferencirane SHED iskazale su pozitivan izraz Apolipoproteina E (Apo E), koji je prisutan unutar glija okolnih motornih i osjetilnih neurona u perifernom živčanom sustavu. Diferencijalne stanice također su bile pozitivne što se tiče intermedijarnih perifernim filamentna i Brn3a (19).

Prvi je protein prisutan u perifernom živčanom sustavu, dok je drugi faktor transkripcije koji regulira perifernu diferencijaciju senzornog neurona. Neuronski razvojni potencijal SHED-a in vivo demonstrirali su Miura i kolege ubrizgavanjem SHED-a u dentalni girus hipokampusa miševa. Stanice koje su preživjele u okruženju osigurale su i nastavile izražavati neuronske markere kao što je NFM tijekom više od deset dana.

Sposobnost SHED-a da se podvrgne neurogenskoj diferencijaciji in vivo otvorila je putove za korištenje tih stanica kao alternativa za liječenje različitih stanja povezanih s neuronima poput fokalne cerebralne ishemije, ozljeda kralježničke moždine, Alzheimerove bolesti i drugih.

Fokalna cerebralna ishemija javlja se kada nema dovoljnog dovoda kisika uslijed ograničenog dotoka krvi u određeno područje mozga što može dovesti do cerebralnog infarkta ili ishemičnog moždanog udara. SHED mogu izlučivati spojeve koji pozitivno utječu na oporavak ove vrste lezije (20).

Ozljeda leđne moždine je doživotno stanje koje izaziva nepovratni gubitak motoričkih i senzorskih funkcija. Procjenjuje se da godišnje širom svijeta do 500 000 ljudi pretrpi ozljedu leđne moždine, a neke su i teške vrste (npr. C4 ili veće lezije) što može negativno utjecati na disanje budući da lezija negativno utječe na autonomni živčani sustav. SHED imaju izvanredna neuroregenerativna svojstva i mogu poticati funkcionalni oporavak nakon ozljede leđne moždine. Štakori kojima je ubrizgan SHED između 9. i 11. torakalnog kralješka pokazali su bolje rezultate prema Bassovoj, Beattiejevoj i Bresnahanovoj ljestvici lokomotornih sustava u usporedbi s onima koje su transplantirane sa stromalnim stanicama koštane srži ili fibroblastom. Također je i očuvanje lokomotorne funkcije bilo bolje kod štakora koji su primili SHED. Bili su u mogućnosti koordinirano pomicati tri zgloba stražnje noge i hodati, a liječenje stromalnim stanicama koštane srži omogućuje samo suptilne kretnje jednog ili dva zgloba. Poboljšanja promatrana sa SHED-om mogu biti povezana s njihovom

diferencijacijom u zrele oligodendrocite koji zamjenjuju izgubljene stanice i regeneraciju cijepanih aksona (21).

Poboljšana regeneracija koja je uočena sa SHED-om odnosi se ne samo na lezije u središnjem živčanom sustavu, već je primijećena i kod ozljeda perifernih živaca. Bilo je moguće poboljšati regeneraciju oštećenog živca kod štakora liječenjem lezija uz pomoć medija dobivenog SHED-om. Gustoća aksona i broj regeneriranih mijeliniranih vlakana uočeni u grupi tretiranoj medija dobivenog SHED-om bili su nalik onima dobivenim autograftom kao kontrolom. Ovi obećavajući rezultati koji se odnose na diferencijaciju potencijala neurona SHED-a u nekoliko in vitro pokusa i modela sa životinjama povećavaju interes za upotrebu tih stanica kao alternative u liječenju različitih neuronskih bolesti i ozljeda (22).

5. 3 Diferencijacija SHED-a u odnosu na hormonske stanice

Uz njihovu terapijsku upotrebu u zubnoj pulpi i regeneraciji neurona SHED također imaju potencijala za upotrebu u liječenju bolesti jetre i dijabetesa.

Transplantacija organa može biti izbor metode liječenja za bolesnike koji pate od fatalnih bolesti jetre kao što su ciroza i hepatocelularni karcinom. Međutim, nestašica donora potiče razvoj terapijskih alternativa. Nedavne studije pokazuju da se SHED može diferencirati u hepatijske linije stanica. Uz ispravnu stimulaciju, SHED izražava skup hepatoloških markera kao što su hepatički nuklearni faktor -4α, α-fetoprotein i faktor rasta-1 nalik inzulinu. Značajno je da je 90 % dobivenih hepatocita pozitivno za ekspresiju albumina (23,24). Osim toga, uočeno je značajno povećanje koncentracije uree u mediju i količina citoplazmatske pohrane glikogena unutar stanica nakon diferencijacije. Razina diferencijacije može biti dodatno pojačana dodavanjem ekstrakta sline ili tretiranjem pomoću vodikovog sulfida (25).

Dijabetes je jedna od najčešćih kroničnih endokrinih bolesti povezanih s uništenjem i disfunkcijom pankreasne β-stanice. Kao što se SHED mogu diferencirati in vitro u (stanice nalik otočićima) ICA, pojavljuju se kao alternativa staničnoj nadomjesnoj terapiji za dijabetes. Pokazalo se da ICA koja potječe iz SHED-a može in vitro otpustiti inzulin i C-peptide na način sličan ovisnom hormonu glukoze. Inkubacija MIN6 (β-stanična linija pankreasa miša) uz pomoć medija dobivenog SHED-om pojačala je izlučivanje inzulina na način sličan ovisnosti o koncentraciji glukoze. Kod miševa s dijabetesom uzrokovanim streptozotocinom u koje su transplantirane stanice nalik otočićima dobivenim od SHED-a zaustavljen je dijabetes i obnovljena je normalna glikemija nakon tri do četiri tjedna (26).

6. RASPRAVA

U svojoj studiji su Miura i suradnici ustanovili da izvađeni mliječni zub sadrži multipotentne matične stanice. SHED su identificirani kao populacija visoko proliferativnih klonogenih stanica koje mogu diferencirati u različitim tipovima stanica, uključujući neuronske stanice, adipocite i odontoblaste. Nakon in vivo transplantacije, pronađeno je da SHED može inducirati formiranje kostiju, generirati dentin i preživjeti u mišjem mozgu zajedno s ekspresijom neuronskih markera. Ovdje pokazujemo da ljudski organ prirodno odstranjen sadrži populaciju matičnih stanica koje su potpuno različite od prethodno identificiranih matičnih stanica. SHED nisu izvedene samo iz vrlo dostupnog resursa tkiva, već također mogu pružiti dovoljno stanica za potencijalnu kliničku primjenu. Stoga, mliječni zub može biti neočekivani jedinstveni resurs za terapije matičnim stanicama, uključujući autolognu transplantaciju matičnih stanica i inženjering tkiva (15).

Uloga stomatoloških matičnih stanica u budućnosti vrlo je velika. Eksperimentalne studije na životinjama pokazale su da dentalne matične stanice, posebice SHED, imaju više vrsta. Studije su također pokazale da se SHED mogu diferencirati u aktivne neurone koji dokazuju njihovu korisnost u upravljanju degenerativnim poremećajima kao što su Alzheimerova i Parkinsonova bolest. Također je u eksperimentalnim istraživanjima dokazano da stomatološke matične stanice mogu regenerirati ozlijeđeno područje na pokusnim štakorima nakon induciranog miokardijalnog infarkta s angiogenezom i pogoršanom ventrikularnom funkcijom.

Dentalne matične stanice mogu se diferencirati u osteoblaste, što može biti dobar izvor za ponovni rast kostiju u koštanim defektima. Osim adipocita i hondrogena, zubna pulpa bila je u stanju formirati stanice nalik otočićima, što može biti velika prednost za bolesnike s dijabetesom tipa 1. Dentalne matične stanice mogu se koristiti za regeneraciju zuba što je eksperimentalno dokazano na životinjskim modelima.

Dentalne matične stanice imaju neka ograničenja poput ograničene dostupnosti, a do sada nije učinjeno dovoljno istraživanja na ljudima u kliničkoj primjeni, što će se svakako unaprijediti za regeneraciju različitih tjelesnih tkiva u budućnosti (27).

Matične stanice dentalnog podrijetla imaju više primjena. Posebno se treba proučiti štetni onkogeni potencijal tih stanica u dugotrajnim kliničkim studijama. Štoviše, istraživanje je uglavnom ograničeno na životinjske modele i njihova opsežna klinička primjena tek se treba ispitati. Druga ograničenja jesu poteškoće da se te stanice u laboratorijima identificiraju, izoliraju, pročiste i rastu. Jedno od pitanja koje zahtijeva temeljito istraživanje je imunološko odbijanje. Zubne strukture ne mogu zamijeniti stvarne zube pa su potrebni znatni istraživački i razvojni napori za unapređivanje stomatoloških regenerativnih terapija. Istraživači još uvijek trebaju razviti takve zalihe krvi i živaca koje bi bile potpuno funkcionalne. Iako trenutno nisu dostupni, ti se pristupi mogu jednog dana koristiti kao biološke alternative sintetičkim materijalima koji se trenutno koriste. Poput drugih moćnih tehnologija, istraživanje zubnih matičnih stanica izaziva i rizike. Istraživanje matičnih stanica mora se provesti pod učinkovitim, odgovornim sustavima društveno odgovornog nadzora i kontrole, kako na nacionalnoj tako i na međunarodnoj razini, kako bi ispunilo izazove i izbjeglo sve moguće rizike (28).

7. ZAKLJUČAK

Dosadašnja istraživanja pokazala su da su SHED vrsta stomatoloških matičnih stanica koje su sposobne za opsežnu proliferaciju i multipotencijalnu diferencijaciju.

U budućnosti treba vršiti daljnja istraživanja kako bi se mogao istražiti biološki značaj i primjena SHED-a u regenerativnoj medicini i stomatologiji kod ljudi.

Dosadašnje načine i metode prikupljanja, pohrane i izolacije SHED-a trebalo bi unaprijediti i uvoditi u stomatološke ordinacije, te razmotriti načine za smanjivanje njihovih troškova, kako bi pohranjene SHED postale dostupne širokoj populaciji pacijenata, kada im budu potrebne.

U budućnosti se puno očekuje od upotrebe SHED-a u liječenju mnogih stanja i bolesti.

8. LITERATURA

1. CariCord. The stem cell bank at the University of Colorado. What are stem cells? [place unknown]: University of Colorado; c2014. [Internet]. [cited 2017 Aug 21]. Available from: https://www.caricord.com/stem-cells-and-what-they-do
2. Hirschi KK, Li S, Ray K. Induced pluripotent stem cell for regenerative medicine. Annu Rev Biomed Eng. 2014;16:277-294.
3. Takashashi K. Tarabe K, Ohunk M, Narita M, Ischisaka T, Tomoda K et al. Iduction of pluripotent stem cell from adult human fibroblast by defined factors. Cell. 2007;31(5):861-872.
4. NIH stem cell information home page. In stem cell information. Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services; c2016. [Internet]. [cited 2017 Aug 26]. Available from: https://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics6.aspx
5. Gajović S. Embrionalne matične stanice: prvi dio. Medicinar. 2009;50(2):44-46.
6. Gajović S. Embrionalne matične stanice: drugi dio. Medicinar. 2009;51(1):32-34.
7. Jurić H. i sur. Dječja dentalna medicina. Jastrebarsko: Naklada Slap; 2015. 512p.
8. Saito MT, Silvério KG, Casati MZ, Sallum EA, Humberto F. Tooth-derived stem cells: update and perspectives. World J Stem Cells. 2015;7(2):399–407.
9. Walton RE, Torabinejad M. Endodoncija: načela i praksa. Zagreb: Naklada Slap; 2009. 475p.
10. Estrela C, Alencar AHG, Kitten GT, Vencio EF, Gava E. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. Braz Dent J. 2011;22(2):91-98.
11. Caton J, Bostanci N, Remboutsika F, De Bari C, Mitsiadis TA. Future dentistry; cell therapy meets tooth and periodontal repair and regeneration. J Cell Mol Med. 2011;15(5):1054-1065.
12. Telles PD, Machado MA, Saka VT, Nör JE. Pulp tissue from primary teeth: new source of stem cells. J Appl Oral Sci. 2011;19(3):189–194.
13. Arora V, Arora P, Munshi AK. Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): Saving for the Future. J Clin Pediatr Dent. 2009;33(4):289–294.
14. Mycells. Laboratory procedure for deciduous teeth. [place unknown]: Cord blood storage bank; c2017. [Internet]. [cited 2017 Aug 28]. Available from: https://www.mycells.gr/en/services/deciduous-teeth/laboratory-procedures
15. Miura M, Gronthos S, Zhao M, LU B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cell from human exfoliated deciduons teeth. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100(10):5807-5812.

16. Gotlieb EL, Murray PE, Namerow KM, Kuttler S, Garcia-Godoy F. An ultrastructural investigation of tissue-engineered pulp constructs implanted within endodontically treated teeth. Jada. 2008;139(4):457-465.
17. Kawasaki K, Tanaka S, Ishikawa T. On the incremental lines in human dentine as revealed by tetracycline labeling. J Anat. 1977;123(2):427–436.
18. Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, Sugito T, Ito K, Ueda M. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. J Endod. 2009;35(11):1536–1542.
19. Pavan WJ, Raible DW. Specification of neural crest into sensory neuron and melanocyte lineages. Dev Biol. 2012;366(1):55–63.
20. 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.
21. Balkaya M, Kröber JM, Rex A, Endres M. Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 2013;33(3):330-338.
22. Y. Sugimura-Wakayama Y, Katagiri W,Osugi M et al. Peripheral nerve regeneration by secretomes of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Stem Cells Dev. 2015;24(22):2687–2699.
23. Ishkitiev N, Yaegaki K, Imai T et al. High-purity hepatic lineage differentiated from dental pulp stem cells in serum-free medium. J Endod. 2012;38(4):475-480.
24. Vasanthan P,Gnanasegaran N, Govindasamy V et al. Comparison of fetal bovine serum and human platelet lysate in cultivation and differentiation of dental pulp stem cells into hepatic lineage cells. Bioch Eng J. 2014;88:142–153.
25. Ishkitiev N, Yaegaki K, Calenic B et al. Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional features in vitro. J Endod. 2010;36(3):469-474.
26. Kanafi MM, Rajeshwari YB, Gupta S et al. Transplantation of islet-like cell clusters derived from human dental pulp stem cells restores normoglycemia in diabetic mice. Cytotherapy. 2013;15(10):1228–1236.
27. Sunil PM, Manikandan R, Muthumurugan, Yoithapprabhunath TR, Sivakumar M. Harvesting dental stem cells: Overview. J Pharm Bioallied Sci. 2015;7(2):384-386.

28. Yo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HN, Park JY, Cgung JH, et al. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. Tissue Eng. 2007;13(4):767-773.

9. ŽIVOTOPIS

Lucija Lomnicki rođena je 30. studenog 1989. godine u Zagrebu. Nakon završene Osnovne škole Malešnica i Gimnazije Lucijana Vranjanina u Zagrebu, studij Dentalne medicine Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2009. godine. Tijekom studiranja povremeno je asistirala u ordinaciji dr. med. dent Mirjane Baričević. U travnju 2016. godine završila je tečaj pod nazivom „Najnovije tehnike instrumentacije i 3D aktivacijska dezinfekcija korijenskog kanala“ pod vodstvom prof. dr. sc. Ivice Anića. Tijekom školovanja pohađala je satove klavira i tečajeve engleskog i njemačkog jezika.