

# Matične stanice i tkivni inženjering u stvaranju novog zuba

---

**Keretić, Leona**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:127:083127>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-23**



*Repository / Repozitorij:*

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





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Leona Keretić

**MATIČNE STANICE I TKIVNI INŽENJERING  
U STVARANJU NOVOG ZUBA**

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Rad je ostvaren u: Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za dentalnu antropologiju

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

Lektor hrvatskog jezika: Dragana Sever, prof. hrvatskog jezika i književnosti

Lektor engleskog jezika: Andreja Remar Vidrač, prof. engleskog jezika i književnosti

Sastav Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. \_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_

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

Rad sadrži: 34 stranica

6 slika

CD

Osim ako nije drugačije 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 doc. dr. sc. Ivani Savić Pavičin na divnoj suradnji, strpljenju, savjetima i podršci prilikom izrade ovog rada.

Posebnu zahvalu želim izraziti svojim roditeljima i obitelji, koji su mi tijekom mog cjelokupnog obrazovanja pružili neizmjernu ljubav, podršku i razumijevanje.

Također želim zahvaliti svojim prijateljima, kolegama i kolegicama koji su uvijek bili velika potpora i pomoć, ali i uz koje su studentski dani prošli u smijehu i veselju.

## **Matične stanice i tkivni inženjering u stvaranju novog zuba**

### **Sažetak**

Tkivni inženjering matičnih stanica nova je disciplina na području stomatologije čija je težnja pronaći postupak kojim bi se umjetnim putem mogao stvoriti zub koji bi kao nadomjestak izgubljenom zubu u potpunosti zadovoljio sve estetske i funkcionalne kriterije.

Matične stanice su stanice čija su dva svojstva ključna za upotrebu u tkivnom inženjeringu, a to su svojstvo neograničenog samoobnavljanja i diferencijacije. Postoje dva tipa matičnih stanica embrionalne izolirane iz blastociste embrija i odrasle matične stanice. Iako embrionalne stanice imaju puno veći diferencijacijski potencijal, njihova klinička upotreba nije moguća. Adultne matične stanice moguće je izolirati iz različitih tkiva ljudskog organizma pa tako razlikujemo i pet tipova adultnih matičnih stanica izoliranih iz dentalnih tkiva.

Sam proces tkivnog inženjeringa osmišljen je kao oponašanje procesa organogeneze kroz epitelno-mezenhimalnu interakciju. Da bi se proizveo zubni zametak, neophodna je interakcija epitelnih i mezenhimalnih stanica uz uvjet da jedan od ta dva tipa stanica ima mogućnost inducirati nastajanje dentalnih tkiva, a drugi tip stanica na taj poticaj odgovoriti.

Kroz istraživanja je pokazano da se pomoću embrionalnih stanica može proizvesti zub, no klinička praksa traži nova rješenja pa su do sada provedena ispitivanja s matičnim stanicama koštane srži, ali također i sa stanicama gingivalnog epitela, te keratinocita kao zamjene za epitelnu komponentu. Prekretnicu je također izazvalo otkriće induciranih pluripotentnih matičnih stanica čiji je diferencijacijski potencijal jednak embrionalnim matičnim stanicama.

**Ključne riječi:** tkivni inženjering; matične stanice; diferencijacija; interakcija

## **Stem cells and tissue engineering in new tooth production**

### **Summary**

Stem cells tissue engineering is a new discipline in dentistry that aims to find the way to produce an artificial tooth as a perfect aesthetic and functional replacement for a lost tooth.

Stem cells have two characteristics important for tissue engineering and these are self-renewal and differentiation. There are two types of stem cells: embryonal isolated from embryo blastocyst and adult stem cells. Although embryonal stem cells show better differentiation potential, their clinical use is not possible. It is possible to isolate adult stem cells from different human tissues, so there are five different types of dental adult stem cells.

The tissue engineering process is actually the mimic of organogenesis through the epithelial mesenchymal interaction. To produce a dental germ, an interaction is necessary with the condition that one cell type can induce dental tissue production and second can respond to that initial signal.

It has been shown that it is possible to produce a tooth using embryonal stem cells, but it is important to find new cell sources for clinical use. Experiments were made using bone marrow stem cells, gingival epithel cells, keratinocytes as replacement for epithelial component. The big milestone was the finding of induced pluripotent stem cells that have differentiation potential just like embryonal cells.

**Key words:** tissue engineering; stem cells; differentiation; interaction

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. MATIČNE STANICE DENTALNIH TKIVA .....	4
2.1. Epitelne stanice dentalnog podrijetla .....	4
2.2. Mezenhimalne stanice dentalnog podrijetla .....	4
2.2.1. Matične stanice zubne pulpe .....	5
2.2.2. Matične stanice mliječnih zubi .....	6
2.2.3. Matične stanice apikalne papile .....	7
2.2.4. Matične stanice parodontnog ligamenta .....	7
2.2.5. Prekursorske stanice dentalnog folikula .....	7
3. METODE IZOLACIJE I NAČINI POHRANE DENTALNIH MATIČNIH STANICA ..	9
4. MATIČNE STANICE U BIOINŽENJERINHU .....	11
5. TEHNIKE BIOINŽENJERINGA.....	16
5.1. Stvaranje zubnog zametka upotrebom biorazgradivog nosača.....	16
5.2. Stvaranje zubnog zametka metodom agregacije stanica .....	17
6. FUNKCIONALNI NADOMJESTAK IZGUBLJENOG ZUBA <i>IN VIVO</i> .....	19
7. RASPRAVA .....	21
8. ZAKLJUČAK .....	26
9. LITERATURA .....	28
10. ŽIVOTOPIS.....	33

## **Popis skraćenica**

BMSCs-matične stanice koštane srži

BMSSCs-stromalne matične stanice

CAS-cells alive system

DFPCs-prekursorske stanice dentalnog folikula

DPSCs-matične stanice zubne pulpe

GMSCs-gingivalne mezenhimalne matične stanice

HA-TCP-hidroksiapatit trikalcij fosfat

iPAPCs-progenitorske stanice upaljenog periapikalnog tkiva

iPSCs-inducirane pluripotentne matične stanice

MSCs-mezenhimalne matične stanice

OESCs-matične stanice oralnog epitela

PDLSCs-matične stanice parodontnog ligamenta

PGA-poliglikolat

PLGA-poli-L-laktat-ko-glikolat

PSCs-periostalne matične stanice

SCAPs-matične stanice apikalne papile

SGSCs-matične stanice žlijezda slinovnica

SHEDs-matične stanice mliječnih zuba

TGPCs-progenitorske stanice zubnog zametka



## **1. UVOD**

Gubitak zubi kao posljedica karijesa, parodontoloških problema ili traumatskih ozljeda uzrokuje gubitak oralne funkcije, artikulacije, mastikacije, okluzije te dovodi do narušenja sveukupnog oralnog zdravlja.

Koriste se različiti postupci nadoknade izgubljenih dentalnih tkiva kao to su krunice, mostovi, implantati, međutim navedena rješenja nisu biokompatibilna, te ne omogućuju idealnu fiziološku funkciju. Svi nedostaci ovakvih načina nadoknade izgubljenih zubi potaknuli su na pronalazak novih postupaka koji se temelje na upotrebi matičnih stanica u proizvodnji dentalnih tkiva. Zub proizveden pomoću matičnih stanica postupkom bioinženjeringa idealno je estetsko i funkcionalno rješenje kojem se teži u regenerativnoj stomatologiji (1).

Termin matične stanice prvi put koristi 1868. godine u svojim znanstvenim radovima njemački biolog Haeckel (2), a 1908. godine ruski histolog Alexander Maksimov potvrđuje postojanje hematopoetskih matičnih stanica na kongresu u Berlinu (3).

Matične stanice su nespecijalizirane stanice sa sposobnošću neograničenog samoobnavljanja i diferencijacije u zrelije stanice sa specijaliziranim funkcijama (4).

Dva osnovna obilježja matičnih stanica jesu sposobnost samoobnavljanja čak i nakon dugog perioda inaktivnosti, te sposobnost diferencijacije u specifične stanice sa specijaliziranom funkcijom bilo u fiziološkim ili eksperimentalnim uvjetima.

Možemo govoriti o dva osnovna tipa matičnih stanica: embrionalne matične stanice i matične stanice iz odraslog organizma. Embrionalne matične stanice najprije su izolirane iz embrija miševa 1981. godine, a 1998. iz humanog embrija te su nazvane humane embrionalne matične stanice. Do novih spoznaja došlo je 2006. kada su ostvareni uvjeti u kojima su specijalizirane adultne stanice genetski reprogramirane u novi tip stanica poznate kao inducirane pluripotentne matične stanice (iPSCs). Embrionalne matične stanice mogu se diferencirati u bilo koji tip stanica, no adultne su ograničene ovisno o tome kojem tipu tkiva pripadaju podrijetlom.

Jedinstvena regenerativna sposobnost matičnih stanica omogućuje njihovu upotrebu u liječenju brojnih bolesti, te primjenu u reparativnoj i regenerativnoj medicini i stomatologiji (5).

Tkivni inženjering je znanstvena disciplina koja primjenjuje inženjerske principe dizajna i analize bioloških sustava te biomedicinskih tehnologija. Primjeri područja bioinženjerskih istraživanja su inženjering bakterija da proizvode kemikalije odnosno lijekove, nova medicinska tehnologija, prijenosni uređaji za dijagnostiku bolesti, i inženjering tkiva i organa (6).

Područje tkivnog inženjeringa iznimno je multidisciplinarno te se oslanja na iskustvo kliničke medicine, mehaničkog inženjeringa, znanosti o materijalima, genetici, te druge povezane biomedicinske znanosti.

Sam termin tkivnog inženjeringa prvi se puta spominje na skupu Nacionalne znanstvene fondacije 1988. godine, a označava primjenu principa i metoda inženjeringa i znanosti o životu prema temeljnom razumijevanju strukturalno funkcionalnih odnosa u zdravim i patološki promijenjenim tkivima sisavaca, te razvoj bioloških nadomjestaka u svrhu popravka, nadomjeska ili unaprjeđenja funkcije tkiva. Iako je područje tkivnog inženjeringa relativno novo znanstveno područje, sama ideja nadomjeska tkiva seže gotovo u prvo stoljeće. Gasparo Tagliacozzi, profesor kirurgije i anatomije Sveučilišta u Bolonji, opisuje u svom radu objavljenom 1597. kako je nadomjestio nos režnjem s podlaktice (7). Dostignuća na području tkivnog inženjeringa u posljednjih nekoliko godina omogućila su proizvodnju umjetne kože za liječenje opekline (8), koštane nadomjeske za koštane defekte (9), arterije za liječenje arterosklerotskih promjena (10) te umjetne hrskavice za rekonstruktivnu kirurgiju (11).

Ideja nadomjeska izgubljenog tkiva restorativnim materijalima prisutna je u stomatologiji otkad i sama struka (12). Međutim potreba za trajnim, biokompatibilnim, funkcionalnim nadomjeskom dentalnih tkiva odnosno cjelovite zubne jedinice u punoj funkciji dovela je do razvoja tkivnog inženjeringa na području stomatologije.

Huggins je 1934. uspješno proizveo ektopičnu caklinu i dentin nakon transplantacije zubnog zametka u abdominalni zid štenca. To je bilo važno istraživanje koje je ujedno dovelo do spoznaje da bez interakcije epitela i mezenhima izostaje stvaranje dentalnog tkiva. Mina i suradnici su 1987. godine proizveli zubnu papilu koristeći pritom neodontogene mezenhimalne stanice drugog luka u kombinaciji s epitelom mandibularnog luka miša do dvanaestog dana embrionalnog života, te potvrdili da je odontogeni potencijal prisutan kod epitela prije stadija pupoljka. Prijelomno je bilo otkriće Kollar-a i suradnika koji su koristili zubne zametke miša u stadiju kape i zvona te razjasnili naknadni prelazak potencijala na dentalnu papilu što kasnije utječe na razvoj zuba i njegov oblik. Uloga dentalnog mezenhima koji potiče razvoj zuba razjašnjena je 1970.-ih i 80.-ih kada su Kollar i suradnici regenerirali zub u prednjoj komorici oka rekombinacijom dentalne papile miša s epitelnim stanicama noge i njuške miša te kasnije pomoću kokošjeg oralnog epitela (13).

Tkivni je inženjering izvor novih rješenja u različitim granama stomatologije, a produkcija cjelovitog zubnog organa kao idealnog nadomjeska imperativ kojem se teži u budućnost kliničke stomatološke prakse.

Svrha ovog rada je iznijeti pregled dosadašnjih saznanja i dostignuća na području istraživanja tkivnog bioinženjeringa s ciljem stvaranja novog zuba korištenjem matičnih stanica.

## **2. MATIČNE STANICE DENTALNIH TKIVA**

### **2.1. Epitelne stanice dentalnog podrijetla**

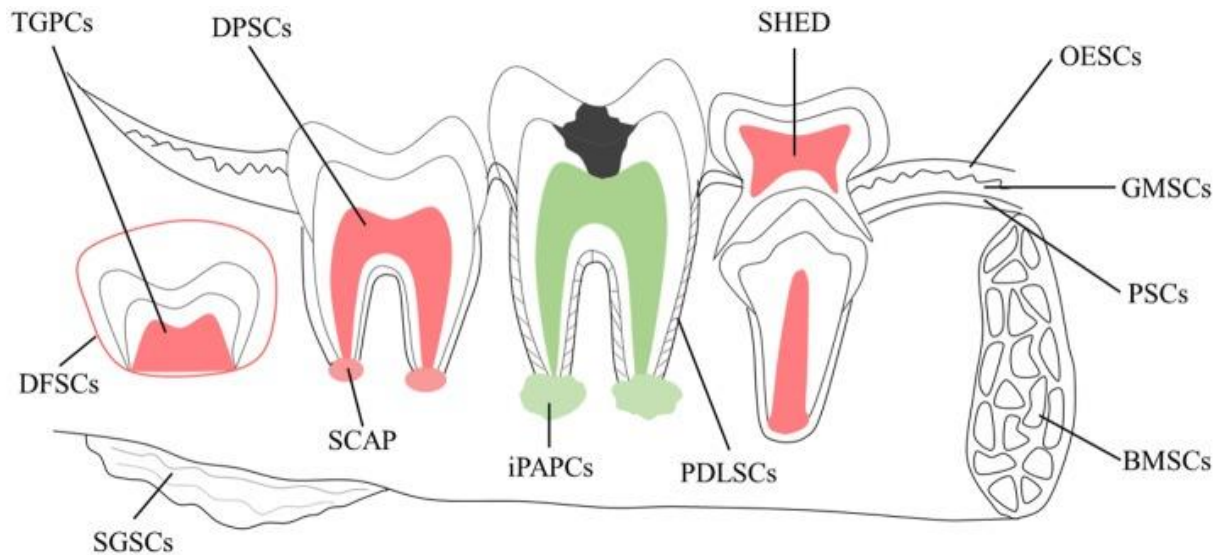
Dva su osnovna tipa stanica koja sudjeluju u formiranju dentalnih tkiva, ameloblasti epitelnog podrijetla i odontoblasti mezenhimalnog podrijetla. Caklina se formira pomoću ameloblasta koji nastaju iz epitelnih matičnih stanica i jedine su stanice ektodermalnog podrijetla koje sudjeluju u razvoju zubi. Ameloblasti kao i njihove preteče izgube se tijekom erupcije zubi te ne postoje kod trajnih zubi i ne mogu se stimulirati *in vivo* kako bi stvorili izgubljeni ili oštećenu caklinu (14). Zbog toga se traže alternativni izvori humanih postnatalnih matičnih stanica kao epitelna komponenta epitelno-mezenhimalne interakcije u bioinženjeringu zubi. Dosada su kao moguć izvor prepoznate stanice keratinocita, te stanice gingivalnog epitela (15).

### **2.2. Mezenhimalne stanice dentalnog podrijetla**

Mezenhimalne matične stanice prvi je opisao dr. Friedenstein kao specifičnu skupinu stanica koštane srži. Te su stanice pokazivale specifična svojstva kao što su morfologija nalik fibroblastima, mogućnost adherencije na plastične površine kulture tkiva te osteogeni potencijal (14). Mezenhimalne matične stanice su pluripotentne i mogu se diferencirati u osteoblaste, neuroblaste, hrskavicu, endotel, te stanice masnog tkiva i mišićja (16). Osim u koštanoj srži mogu se još izolirati iz masnog tkiva, skeletalnih mišićja, zglobne tekućine, amnionske tekućine, pupčane vrpce i zubi (14).

Postoji nekoliko tipova mezenhimalnih matičnih stanica koje možemo izolirati iz zuba (Slika 1.):

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) (17).



Slika 1. Vrste matičnih stanica dentalnog podrijetla: matične stanice zubne pulpe (DPSCs), paradontnog ligamenta (PDLSCs), mliječnih zubi (SHED), apikalne papile (SCAP), dentalnog folikula (DFSCs), te progenitorske stanice zubnog zametka (TGPCs) i progenitorske stanice upaljenog periapikalnog tkiva (iPAPCs). Na slici su također označene matične stanice koje nisu dentalnog podrijetla kao što su matične stanice žlijezda slinovnica (SGSCs), gingivalne mezenhimalne matične stanice (GMSCs), periostalne matične stanice (PSCs), matične stanice koštane srži (BMSCs) i progenitorske stanice oralnog epitela (OESCs). Preuzeto s dopuštenjem izdavača (18).

### 2.2.1. Matične stanice zubne pulpe

Zubna pulpa je vaskularizirano, inervirano vezivno tkivo bogato stanicama smješteno u pulpnoj komorici u središnjem dijelu zuba. Matične stanice zubne pulpe prvo su izolirane 2000. godine iz trećeg molara odrasle osobe, te su pokazivale tipičnu formu fibroblasta te ekspresiju proteinskih markera sličnih mezenhimalnim matičnim stanicama koštane srži (14). DPSCs pokazuju osteogeni i hondrogeni potencijal *in vitro*. Dobar su kandidat za upotrebu u inženjeringu dentalnih tkiva jer su lako dostupne za izolaciju, omogućuju puno bolje stvaranje tipičnog dentinskog tkiva u kratkom periodu nego nedentalne matične stanice, mogu se sigurno pohraniti te kombinirati s mnogim nosačima.

Četiri su tehnike identifikacije matičnih stanica pulpe:

1. pomoću fluorescentnih antitijela – stanice mogu biti izdvojene od ostalih tipova stanica bojenjem stanica specifičnim markerima i koristeći tekući citometar;
2. imunomagnetskom selekcijom;
3. imunohistokemijskim bojenjem;
4. fiziološkim i histološkim kriterijima kao što su fenotip, proliferacija, kemotaksija, mineralizacijska aktivnost, diferencijacija (19).

Zadaća DPSCs je osigurati izvor stanica koje se mogu diferencirati u stanice slične odontoblastima kao odgovor na oštećenje dentina. Relativno jednostavan uzgoj ovih stanica u uvjetima *in vitro* omogućuje korištenje u regenerativnoj endodontskoj terapiji. Testovi *in vitro* pokazuju da se relativno lako mogu stvoriti tkiva nalik pulpnom tkivu iz kulture stanica pulpe, a testovi *in vivo* također potvrđuju mogućnost restauracije pulpe i korijenskog dentina pomoću matičnih stanica (20).

### **2.2.2. Matične stanice mliječnih zubi**

Matične stanice mliječnih zubi prve je otkrio dr. Songtao Shi 2003., dok su Miura i njegovi suradnici potvrdili da se SHEDs mogu diferencirati u različite vrste stanice i to u širem opsegu nego DPSCs uključujući stanice nalik odontoblastima, osteoblastima, adipocite i neuralne stanice (19). Tipovi matičnih stanica koje se mogu izolirati iz mliječnih zubi su adipociti, hondrocti, osteoblasti te mezenhimalne matične stanice. Glavni zadatak ovih stanica izgledno je formiranje mineraliziranih tkiva (19). Transplantacijski eksperiment s mišem pokazao je također da imaju potencijal stvaranja dentina i kosti. Iako pokazuju veću stopu proliferacije i bolji osteoinduktivni potencijal *in vivo*, za razliku od DPSCs, nisu sposobne formirati dentinsko-pulpni kompleks (14).

Prednosti SHEDs-a je velika dostupnost, jednostavna tehnika izolacije, izostanak rizika od imunološke reakcije odbijanja te što ne predstavljaju etičke dileme kao embrionalne matične stanice. Preporuča se izolacija iz središnjih sjekutića ili očnjaka, a pohraniti se mogu krioprezervacijom ili magnetskim smrzavanjem (19).

### **2.2.3. Matične stanice apikalne papile**

SCAPs su matične stanice izolirane iz dentalne papile. Važan izvor SCAPs-a su treći molari i zubi sa široko otvorenim apikalnim otvorom. Dokazano je da se mogu diferencirati u osteoblaste, odontoblaste i adipocite u uvjetima *in vitro*, dok se u uvjetima *in vivo* mogu diferencirati u osteoblaste i odontoblaste (14). Istraživanje je pokazalo da se matične stanice zubne papile diferenciraju u stanice slične odontoblastima koje stvaraju dentin nakon što se implantiraju subkutano u imunokompromitiranog miša koristeći hidroksiapatit–trikalcij-fosfat (HA-TCP) kao nosač. Također je pokazano da transplantacija matičnih stanica apikalne papile zajedno s matičnim stanicama parodontnog ligamenta na HA-TCP nosaču rezultira formiranjem dentina, cementa te Sharpejevih vlakana. Iz istraživanja je vidljivo da takva kombinacija matičnih stanica osigurava regeneraciju korijena i parodontnog ligamenta (21).

### **2.2.4. Matične stanice parodontnog ligamenta**

Parodontni ligament je vezivno tkivo koje povezuje zub s okolnom alveolarnom kosti. PDLSCs pokazuju sposobnost diferencijacije u osteoblaste, hondrocite, adipocite te neurone. Istraživanja su pokazala da PDLSCs transplantirane sa HA-TCP u imunokompromitiranog miša stvaraju tkiva nalik cementu, odnosno parodontu (22). Matične stanice parodontnog ligamenta nalaze se u perivaskularnom prostoru parodonta i imaju svojstva mezenhimalnih stanica koja pridonose njihovoj upotrebi u regenerativnoj terapiji. Iako se PDLSCs uglavnom izoliraju s površine korijena ekstrahiranih trajnih zubi, Wang i suradnici dokazali su kako nakon ekstrakcije dio parodontnog ligamenta zaostaje u alveoli te kako stanice izolirane iz tog dijela imaju viši proliferativni potencijal, te veći potencijal osteogene i adipogene diferencijacije (23). Kao izvor PDLSCs-a prepoznati su i mliječni zubi (24-26), te se smatra kako te stanice pokazuju također veću proliferaciju, te veći osteogeni i adipogeni potencijal nego matične stanice izolirane iz trajnih zubi (25, 26).

### **2.2.5. Prekursorske stanice dentalnog folikula**

Dentalni folikul je vezivno tkivo koje okružuje neiznikli zub, te je nužno za erupciju zuba jer kontrolira osteoklastogenezu i osteogenezu nužne za nicanje. Kako zub tijekom nicanja probija gingivu, dentalni folikul se diferencira u parodontni ligament odnosno fibroblaste. Također se smatra da se neke stanice dentalnog folikula diferenciraju u cementoblaste i

osteoblaste alveolarne kosti. Prema istraživanju opisanom u radu Yao-a i suradnika dokazana je prisutnost matičnih stanica u dentalnom folikulu prvog mandibularnog molara štakora, a upućuju i na nalaz takvih stanica kod drugih vrsta kao i kod ljudi. Da bi ispitali diferencijacijski potencijal, izolirane su stanice proveli kroz različite diferencijacijske postupke, odnosno korišteni su različiti diferencijacijski mediji. Kada su stanice postavljene u osteogeni diferencijacijski medij na dva tjedna, uočeni su osteoblasti i cementoblasti te mineralizirane nakupine. Također je uočeno da boravkom u adipogenom mediju nakon dva tjedna dolazi do stvaranja adipocita i da smještajem stanica u neuralno stimulatívni medij na 24 sata dolazi do nastanka stanica sličnih multipolarnim neuronima. Očita je sposobnost stanica da se diferenciraju u osteoblaste i nastaju različite nakupine stanica koje dovode do obojenja s Alizarin Red i Kossa bojanjem. Takvo obojenje je uočeno i kod stanica ljudskog dentalnog folikula. Bojanjem se mjeri proces kalcifikacije, detektira cement i osteoid. Do sada nisu otkrivena antitijela koja bi mogla detektirati cement kod štakora, međutim iz istraživanja je vidljivo da neke stanice dentalnog folikula postaju cementoblasti iako nije potvrđeno da su to isključivo matične stanice dentalnog folikula (27).



### 3. METODE IZOLACIJE I NAČINI POHRANE DENTALNIH MATIČNIH STANICA

Nakon definiranja tipova matičnih stanica pronađenih u dentalnim tkivima koje se koriste u postupcima regenerativne dentalne medicine i postupcima bioinženjeringa u svrhu produkcije novih dentalnih tkiva, potrebno je istaknuti i metode izolacije matičnih stanica te načine njihove pohrane. Nekoliko je metoda koje se trenutno koriste u tu svrhu.

1. Izolacija na temelju veličine (*Size-sieved isolation*)

Metoda kojom se matične stanice izoliraju od ostalih stanica na temelju veličine samih stanica. Cijelo se pulpno tkivo enzimatski razgradi korištenjem 3%tne otopine kolagenaze tip 1 na sat vremena na 37 °C. Nakon toga procesom filtracije izdvoje se stanica čiji promjer je u rasponu između 3 i 20 mikrometara te se takve stanice koriste za daljnje postupke. Ovom metodom moguće je izolirati malu populaciju stanica koja ima visoki udio matičnih stanica.

2. Kultiviranje kolonija matičnih stanica (*Stem cell colony cultivation*)

Druga metoda je definirana kao kultiviranje kolonija matičnih stanica. U ovoj metodi pulpa se također enzimatski razgradi kako bismo dobili suspenziju pojedinačnih stanica koje se koriste dalje u postupku formiranja kolonija koje sadrže 50 i više stanica te se koriste u svrhu istraživanja.

3. Magnetski aktivirano sortiranje stanica (*Magnetic activated cell sorting*)

Metoda magnetski aktiviranog sortiranja je imuno-magnetska metoda koja se koristi kako bismo izolirali matične stanice na temelju njihovih površinskih antigena (CD271, STRO-1, CD34, CD45 i c-Kit). Ova metoda pokazala se kao vrlo jednostavna, jeftina te omogućuje izolaciju velikog broja stanica međutim stupanj čistoće matičnih stanica je vrlo nizak.

4. Fluorescencijom aktivirano sortiranje stanica (*Fluorescence activated cell sorting*)

Ovo je konvencionalna vrlo uspješna metoda koja pouzdano izdvaja matične stanice iz suspenzije stanica koja se temelji na veličini samih stanica i na fluorescenciji. Nedostaci ove tehnike su to što ona zahtijeva vrlo skupu opremu i visoko stručno osoblje. Također primijećeno je da ova metoda smanjuje vijabilnost stanica (19).

Dva su primjenjivana pristupa pohrane matičnih stanica: krioprezervacija i magnetsko zamrzavanje.

Krioprezervacija je metoda pohrane matičnih stanica ili cjelovitih tkiva rashlađivanjem na temperaturu ispod ništice. Najbolji kandidati za ovakav način pohrane su stanice skupljene pred kraj log faze rasta (19). Log faza rasta je faza u kojoj broj stanica raste logaritmično i svaka se generacija stanica pojavljuje u istom intervalu kao ona prethodna što onda rezultira balansiranim rastom stanica (28). Dva su najčešća postupka krioprezervacije, to su vitrifikacija i sporo zamrzavanje. Vitrifikacijom dolazi do brzog smrzavanja stanica direktnim uranjanjem u tekući dušik. Iako je formiranje kristala potpuno prevenirano, postupak vitrifikacije zahtjeva visoku koncentraciju krioprotektivnih agenasa koji su toksični za većinu stanica. U kliničkoj primjeni stanice koji bi se transplantirale trebale bi proći intenzivno ispiranje kako bi se toksični agensi uklonili. Vitrifikacijska metoda zahtjeva posebne vještine i nije često korištena u kliničkim ispitivanjima.

Nasuprot vitrifikacijskoj, sporo smrzavajuća metoda koristi manje toksične reagense u postupku krioprezervacije. Ovom metodom stanice su postepeno smrzavane u zamrzivaču odnosno programiranom zamrzivaču uz vrlo nisku koncentraciju krioprotektivnih agenasa koja ne može dovesti do ozbiljnih toksičnih ili osmotskih oštećenja. Ipak ovom metodom dolazi do stvaranja veće količine ledenih kristala unutar stanica što dovodi do oštećenja stanične membrane, što se objašnjava nedovoljnim volumenom krioprotektivnih agenasa koji bi prevenirali formiranje kristala leda. Ovakva tehnika pohrane ne zahtijeva posebne vještine i omogućuje smrzavanje velikog broja stanica, te je zbog toga bolji izbor pohrane. Također provode se brojna istraživanja na ovom polju kako osigurati preživljavanje stanica, koristeći krioprezervacijske otopine koje su kemijski definirane i prikladne za kliničku upotrebu kao što je *Stem cell banker*.

Koristi se i nova metoda *Cells alive system* (CAS) koja koristi programirane sustave zamrzavanja i magnetskog polja. Stanice sadrže molekule vode i kada se stanica zamrzne dolazi do oštećenja stanice. Magnetsko polje i inducirano električno polje dobiveno CAS sustavom uzrokuje vibriranje molekula vode koje prevenira formiranje intracelularnih kristala. Potvrđeno je da CAS osigurava preživljavanje stanica te stanice imaju istu funkcionalnost kao ne zamrznute stanice (29).

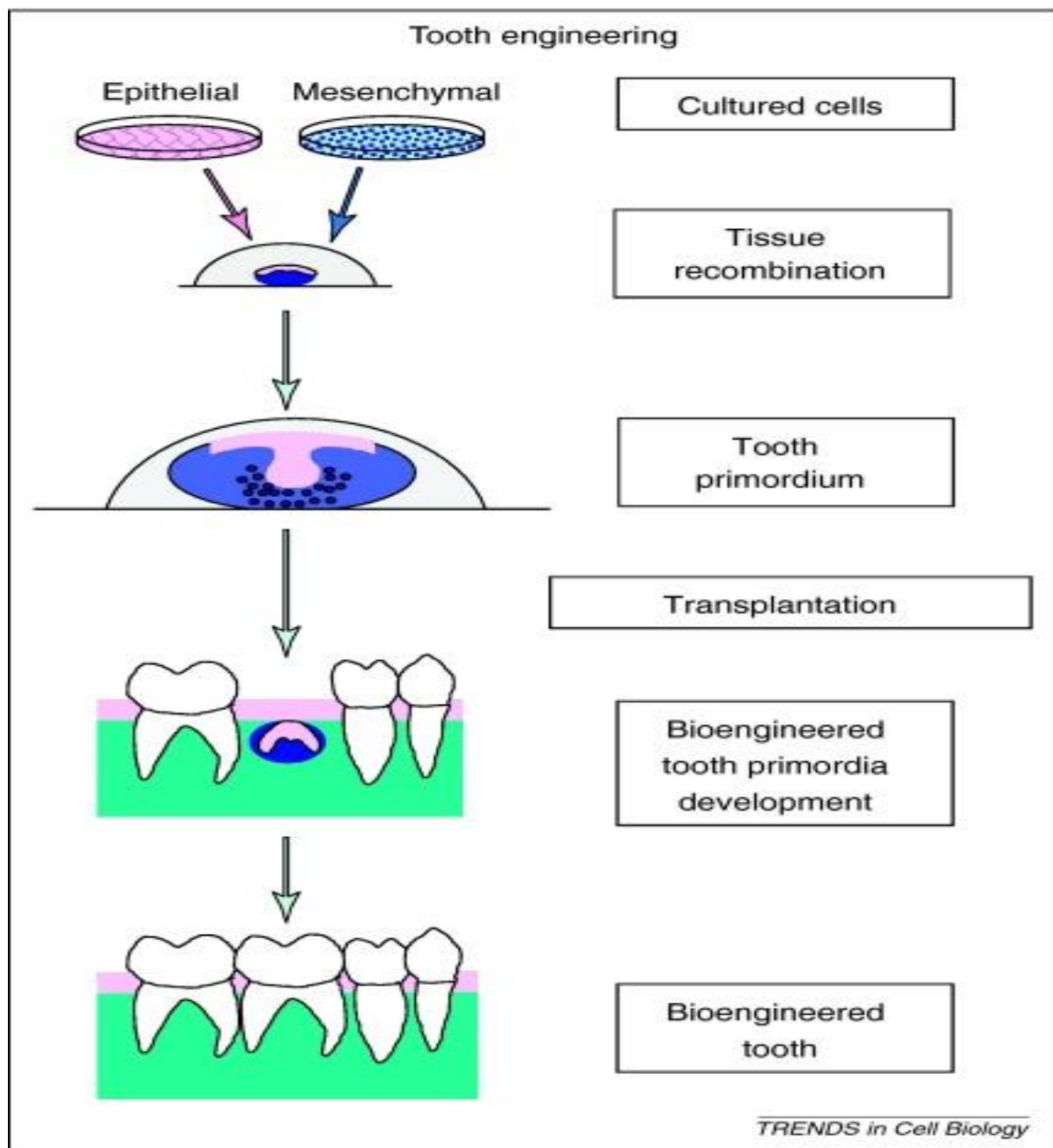
#### 4. MATIČNE STANICE U BIOINŽENJERINHU

Tkivni inženjering zubi je novo područje istraživanja koje koristi principe modernog tkivnog inženjeringa, razvojne biologije te stanične biologije (30).

Glavna težnja postupka bioinženjeringa proizvodnja je funkcionalnih tkiva i organa koji bi u potpunosti nadomjestili ona oštećena ozljedama, bolešću ili starosti. Jednako tako primjenom bioinženjeringa u dentalnoj praksi traži se pronalasku idealnog estetskog i funkcionalnog nadomjestak za izgubljeni zub.

Rekonstrukcija složenih organa kompleksna je zadaća, a na putu do tog cilja primjenjuju se razne metode. Jedan od pokušaja rekonstrukcija organa bio je proizvodnja umjetnih organa od plastike ili metala koji bi sadržavali kompjutorske čipove čime bi mogli reproducirati funkciju organa poput srca, oka, bubrega. Pristup koji se koristi pri proizvodnji ektodermalnih organa kao što su zubi, folikuli dlake ili salivarne žlijezde je oponašanje događaja za vrijeme organogeneze kroz epitelno-mezenhimalnu interakciju kojom se dobiva potpuno funkcionalan bioinženjeringom proizveden zub u *in vivo* uvjetima iz prethodno proizvedenog zubnog zametka (31) (Slika 2.).

Osnova bioinženjeringa leži u interakciji odnosno reasocijaciji izoliranih epitelnih i mezenhimalnih stanica pod uvjetom da jedan tip stanica ima sposobnost inducirati stvaranje zuba a drugi tip stanica odgovoriti na taj poticaj (32).



Slika 2. Osnova tkivnog inženjeringa. Preuzeto s dopuštanjem izdavača (33).

Tijekom embriogeneze recipročna interakcija oralnog epitela i ektomezenhima koji potječe od stanica neuralnog grebena dovodi do početnog formiranja dentalne plakode i kasnije prolazi kroz stadije morfogeneze, stadij pupoljka, kape, zvona. Ovakvo modeliranje zubnog organa zahtijeva strogu prostorno-vremensku kontrolu djelovanjem signalnih puteva koji održavaju nezavisnu induktivnu interakciju, tj. signalnu razmjenu između epitelnih i mezenhimalnih stanica. Tijekom organogeneze zubnog organa odontogeni signal potječe iz dentalnog epitela, a potom dentalni mezenhim odgovara signalima potičući sazrijevanje ameloblasta (34).

Matične stanice su klonogene, nediferencirane stanice sa sposobnošću samoobnavljanja i diferenciranja u različite stanične linije. Drugim riječima matične stanice imaju sposobnost propagacije stvaranja dodatnih stanica, a neke od stanica potomaka se diferenciraju i potiču sazrijevanje drugih staničnih linija što dovodi do nastanka specijaliziranih tipova stanica. Smatra se da postoje dva osnovna tipa stanica, a to su embrionalne i odrasle matične stanice.

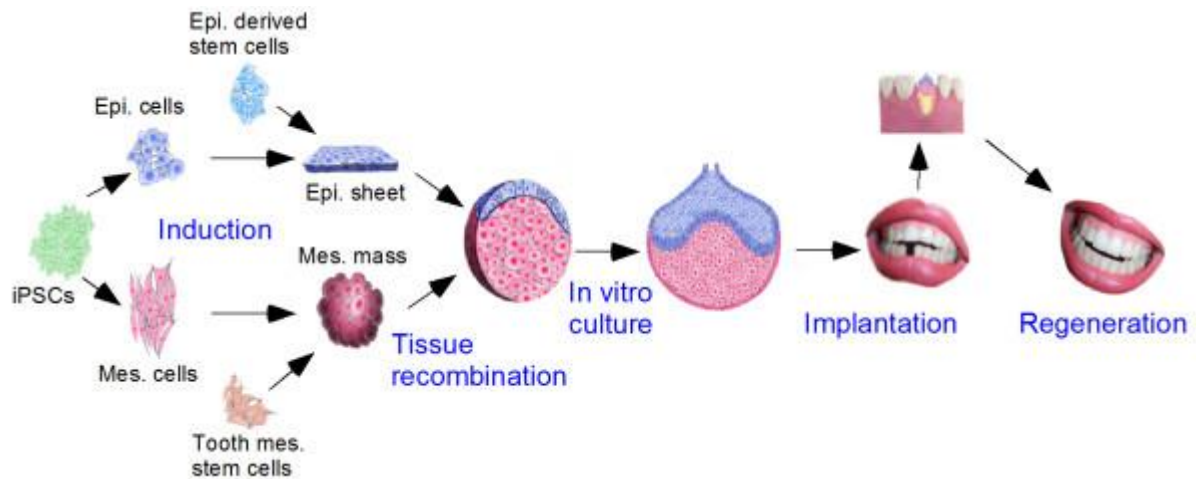
Embrionalne matične stanice su dobivene iz epiblasta blastociste embrija. Humane embrionalne matične stanice prvi su puta izolirane od strane Thomson-a i suradnika 1998. iz epiblasta 4 do 7 dana stare blastociste doniranog embrija. Embrionalne matične stanice imaju sposobnost diferencijacije u sve tipove stanica nastale iz jednog od tri zametna listića ektoderma, mezoderma ili endoderma (35). Iako su matične stanice pluripotentne i pobuđuju veliki interes na brojnim znanstvenim područjima, primjena u dentalnoj praksi ograničena je nedostupnošću embrija kao izvora matičnih stanica, ali i etičkom upitnošću korištenja istih. Također uz primjenu embrionalnih matičnih stanica veže se i mogućnost razvoja teratoma što je još jedna negativna konotacija (1). Istraživanja su uvelike fokusirana na upotrebu embrionalnih matičnih stanica čiji je diferencijacijski potencijal velik, no zbog nemogućnosti njihove kliničke primjene važno je otkriti nove izvore adultnih humanih epitelnih i mezenhimalnih stanica (32). Postoji čak pet tipova humanih mezenhimalnih matičnih stanica dentalnog podrijetla, problem je međutim to što epitelne stanice dentalnog podrijetla ne postoje jer se ameloblasti gube apoptozom tijekom erupcije zuba. Uloženi su brojni naponi ne bi li se pronašli alternativni izvori humanih postnatalnih matičnih stanica kao izvor epitelne komponente u regeneraciji zuba. Za sada je dokazano da keratinociti izolirani sa ljudskog čela te gingivalni epitel iz usne šupljine imaju sposobnost diferencijacije u ameloblaste kada su u interakciji sa embrionalnim mezenhimom miša koji posjeduje odontogeni potencijal (15).

Odrasle matične stanice, poznate kao somatske stanice su nediferencirane matične stanice izolirane iz specijaliziranih tkiva i organa odraslih jedinki. U usporedbi sa pluripotentnim gotovo imortalnim embrionalnim matičnim stanicama, adultne su zapravo zrele stanice s definiranim vijekom trajanja i multipotentnim kapacitetom diferencijacije (35). Njihov broj u tkivima uglavnom je vrlo mali, ali imaju važno svojstvo samoobnavljanja i diferenciranja u svrhu popravka oštećenog tkiva (36). Prvi tip pronađenih adultnih matičnih stanica bile su hematopoetske matične stanice koštane srži. Postoje također i druga vrsta adultnih ne hematopoetskih matičnih stanica pronađenih u koštanoj srži, a to su stromalne matične stanice (BMSSCs) i mezenhimalne matične stanice (MSCs) (35). Mezenhimalne matične stanice kao i stromalne stanice nalazimo i u mezenhimalnim tkivima usta i maksilofacijalne regije. Smatra se da su te stanice pohranjene u posebnim područjima tkiva koje nazivamo nišama matičnih

stanica. Izvori matičnih stanica navedenih regija su stanice koštane srži orofacijalnog skeleta, stanice dentalne pulpe, mliječnih zubi, parodontnog ligamenta, dentalnog folikula, apikalne papile i druge (36). Do danas nema uspješnog primjera stvaranja zubi pomoću humanih adultnih dentalnih stanica (37).

Jedan od prvih primjera korištenja nedentalnih stanica u stvaranju zubi bila je rekombinacija epitela zubnog zametka i adultnih stromalnih stanica koštane srži koje predstavljaju mezenhimalnu komponentu. Da bi se proizveo zubni zametak pomoću ne dentalnih stanica, neophodno je da bilo epitelne ili mezenhimalne stanice posjeduju induktivni signal. U ovakvoj heterotipnoj rekombinaciji rani dentalni epitel ima sposobnost inducirati formiranje zuba iz ne dentalnog mezenhima tako dugo dok mezenhimalne stanice imaju svojstva matične stanice. Jednako tako mezenhim zubnog pupoljka može potaknuti formiranje zuba iz ne dentalnog epitela tako dugo dok su epitelne stanice nediferencirane (32). Kod miševa dentalni epitel posjeduje odontogeni potencijal do 12-og dana embrionalnog života kada je u kombinaciji sa nedentalnim mezenhimom, nakon čega potencijal preuzima dentalni mezenhim kada je u kombinaciji sa nedentalnim epitelom (15).

Osim navedenih stanica koje su prirodno prisutne u organizmu umjetnim putem genetskom manipulacijom somatskih stanica dobiven je novi tip stanica inducirane pluripotentne stanice. Inducirane pluripotentne stanice se zajedno s embrionalnim stanicama smatraju pluripotentnim jer se i jedne i druge mogu diferencirati u bilo koji tip stanica nastalih iz zametnih listića (36). Pronalazak ovih stanica potaknuo je veliki interes jer je znatno olakšano dobivanje adultnih humanih matičnih stanica bez potrebe za humanim embrijima, zaobilazeći tako mnoge etičke prepreke (Slika 3.). Ovaj tip stanica pokazao je velike prednosti pred drugim adultnim dentalnim matičnim stanicama, a jedna od prednosti je i to što se mogu proizvesti iz stanica već dostupnih tkiva kao što je oralna mukoza te gingivalno tkivo. Inducirane pluripotentne matične stanice uspješno se mogu dobiti i iz adultnih mezenhimalnih stanica izoliranih iz dentalnih tkiva (38).



Slika 3. Diferencijacija induciranih pluripotentnih matičnih stanica. Preuzeto s dopuštenjem izdavača (15).

Istraživanja na mišu pokazala su da se iPSCs mogu diferencirati u dentalni mezenhim (1). Također je pokazano da se stanice nalik stanicama neuralnog grebena mogu dobiti iz pluripotentnih stanica kod miša te su potom kombinirane s dentalnim epitelom i nasadene te kultivirane na dva tjedan. Dobiveni rezultat pokazuje da se dobivene stanice nalik stanicama neuralnog grebena mogu diferencirati u stanice nalik odontoblastima.

Novije studije traže dodatne izvore stanica koje bi se mogle primjenjivati u procesu bioinženjeringa cjelovitog zuba. Provedena su istraživanja u kojima se koriste matične stanice ljudske pupčane vrpce. Ispitivanje je pokazalo da stanice mogu biti inducirane u stanice koje nalikuju odontoblastima u uvjetima *in vitro* i *in vivo* (1).

## 5. TEHNIKE BIOINŽENJERINGA

Da bismo proizveli trodimenzionalan ektodermalni organ poput zuba, potrebno je u potpunosti replicirati organogenezu stimulacijom epitelno-mezenhimale interakcije kako se ona odvija za vrijeme prirodnog razvoja zuba (39). Trenutno se koriste dva pristupa od kojih se u jednom stanice zubnog zametka nasade na biorazgradivi nosač u formi zuba, dok drugi pristup rekonstruira zub reagregacijom zubnog zametka iz disociranih pojedinačnih stanica epitela i mezenhima (40).

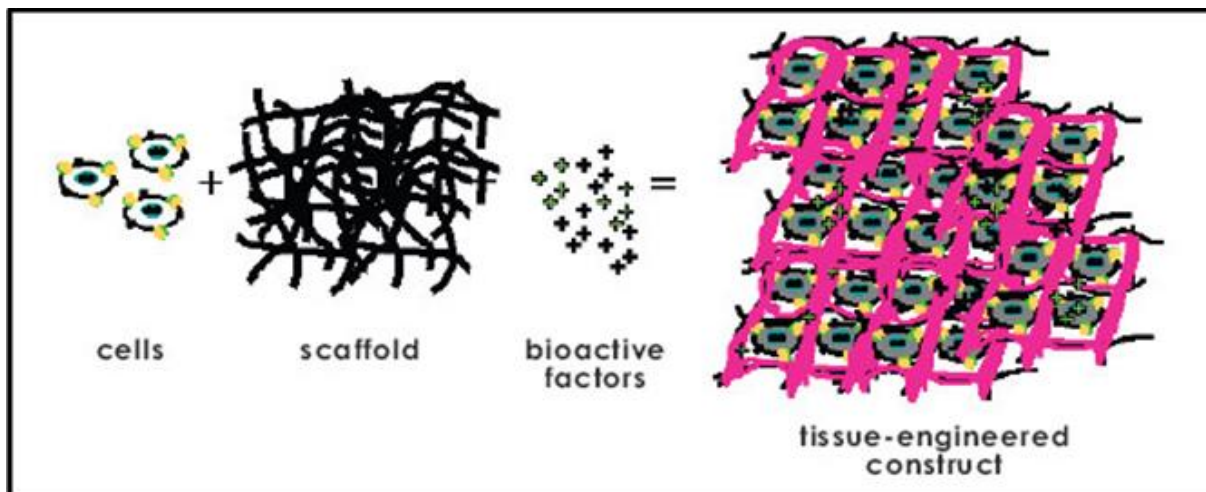
### 5.1. Stvaranje zubnog zametka upotrebom biorazgradivog nosača

Nosači (*scaffold*) osiguravaju odgovarajuće okruženje potrebno za regeneraciju tkiva i organa. Služe kao predlošci prilikom oblikovanja tkiva te su na njih nasadene stanice i faktori rasta. Podvrgnuti su biofizičkom stimuliranju bioreaktorima, napravama ili sustavima koji primjenjuju različite oblike mehaničkih ili kemijskih poticaja stanica. Nosači s nasadenim stanicama mogu se kultivirati *in vitro* kako bi sintetizirali tkivo ili se mogu transplantirati u živi organizam te se kultivirati *in vivo*. Stanice, nosač i signale zajedničkim imenom nazivamo trijadom tkivnog inženjeringa u kojoj nosač omogućuje stanicama slobodnu migraciju, adherenciju i produkciju tkiva (Slika 4.). Najvažnije svojstvo koje nosač korišten u tkivnom inženjeringu mora pokazivati je svojstvo biokompatibilnosti a to upravo znači adheriranje, normalno funkcioniranje te migriranje na površinu te kroz sam nosač (7). Nosači su također i bioaktivni, ulaze u interakcije sa staničnim komponentama proizvedenih tkiva kako bi regulirali njihovu aktivnost. Služe i kao prijenosni vehikul ili pak spremište egzogenih signala poput faktora rasta koji ubrzava regeneraciju. Njihova mehanička uloga je osigurati stabilnost i oblik (41). Najčešće vrste materija korištene za izradu nosača koji se koriste u tkivnom inženjeringu su keramika, sintetički polimeri te prirodni polimeri (7).

Tkiva željenog oblika mogu se regenerirati ovom metodom na način da se stanice postave u biorazgradive nosače napravljene od prirodnih materijala ili sintetičkih polimera. Ova metoda našla je svoju kliničku primjenu u regenerativnoj terapiji kosti i hrskavice, njome su također stvorene male zubne strukture koje sadrže pulpu, dentin, caklinu, ali ne i parodontni ligament. Iako se ovom metodom može kontrolirati veličina i oblik, postoje nedostaci u formiranju tvrdih tkiva (31). Yelick i suradnici u svom istraživanju koristili su eksplantat koji je sadržavao stanice izolirane iz neizniklog trećeg molara svinje ili zubnog pupoljka molara štakora. Epitelne



i mezenhimalne stanice nasadili su na nosač oblika zuba napravljen od poliglikolata (PGA) i poli-L-laktat-ko-glikolata (PLGA). Rezultat koji su dobili na ovaj način je zubna kruna koja je sadržavala dentin i caklinu (42,43). Honda i njegovi suradnici također prikazuju uspješni rezultat istraživanja u kojem su koristili kolagenu spužvu kao nosač (44,45).



Slika 4. Trijada tkivnog inženjeringa. Preuzeto s dopuštenjem izdavača (46).

## 5.2. Stvaranje zubnog zametka metodom agregacije stanica

Drugi pristup rekonstrukciji zubnog zametka je metoda reagregacije stanica. Prvi korak u višestaničnoj agregaciji epitelnih i mezenhimalnih stanica je formiranje višestaničnog skupa (agregata) nastalog samoorganizacijom stanica. Agregat nastaje kao posljedica stanične migracije i selektivne stanične adhezije sve dok stanice ne dosegnu ekvilibrij. Potom slijedi recipročna interakcija između epitelnih i mezenhimalnih stanica kojom se inicira organogeneza koja pak kontrolira daljnju diferencijaciju i morfogenezu. Smatra se da potencijal stanica da se samoorganiziraju i induciraju organogenezu uvelike varira među različitim stanicama (40). Da bismo stvorili zubni zametak, epitelne stanice povežemo s mezenhimalnim stanicama, a dobiveni zubni zametak koristimo kako bismo stvorili zub s pravilnom strukturom nakon transplantacije *in vivo* (47). Također je pokazano da agregat stanica izoliranih iz zubnog zametka miša u 15.-om danu embrionalnog razvoja ima sposobnost stvoriti potpuni zub bez stanične kompartmentalizacije. Istraživanja su pokazala da zubni zametak dobiven iz epitelnih i mezenhimalnih stanica izoliranih iz zubnog zametka miša u petnaestom danu embrionalnog života uspješno dao potpuni zub s okolnim tkivom nalik parodontom (40).

Također uočeno je da epitelne stanice izolirane iz molara imaju sposobnost samosortiranja te induktivni potencijal, što pak potvrđuje Steinbergovu teoriju staničnog pomaka i organizacije u ranoj organogenezi (48).

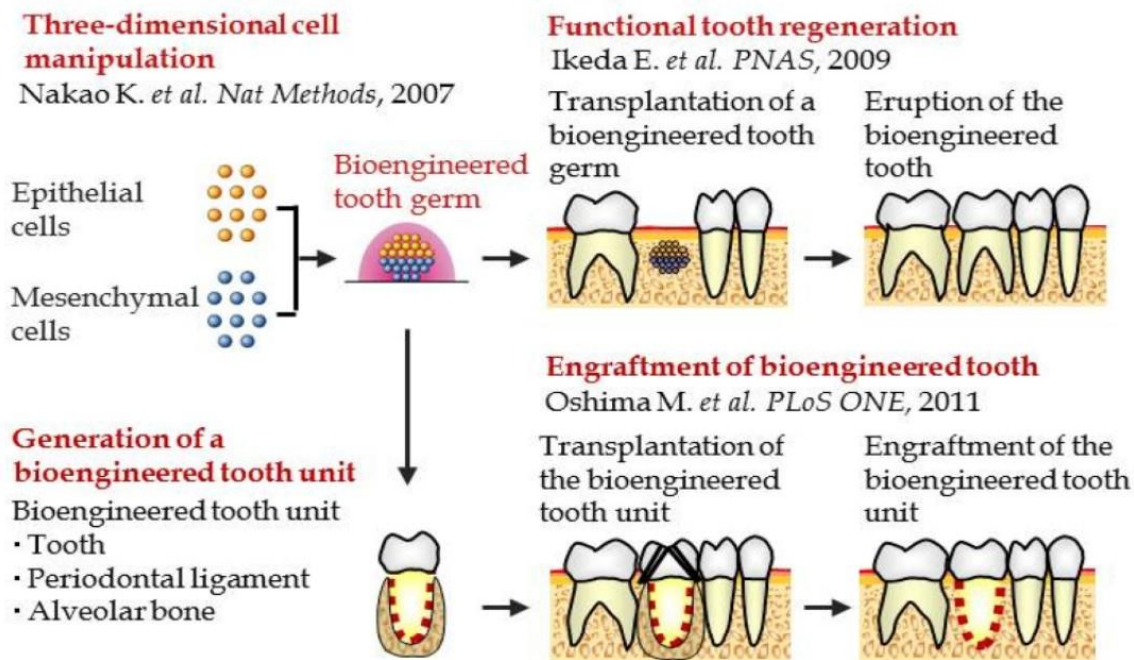
Različite metode manipulacije stanicama zahtijevaju poznavanje određenih stadija u kojima se zubni zametak nalazi. U ranim fazama razvoja, kada tkiva još nisu mineralizirana, recipročna interakcija između epitelnih i mezenhimalnih stanica regulira diferencijaciju progenitorskih stanica kroz direktnu međusobnu interakciju i proizvodnju citokina što spontano dovodi do razvoja organa. U kasnom stadiju zvana kada su zubna tkiva mineralizirana epitelno-mezenhimalni spoj formira dentinsko-caklinskog spojište (40). Metoda agregacije stanica može oponašati međustanične te epitelno-mezenhimalne interakcije kakve se odvijaju u zubnom zametku u ranim induktivnim fazama zbog visoke gustoće stanica u bioinženjeringom dobivenom zametku. Nasuprot tome metoda koja koristi nosač je pogodna za stvaranje zrelog zuba ili zubnog zametka u kasnom stadiju diferencijacije gdje se polarizirane stanice poput ameloblasta i odontoblasta pomoću nosača mogu prostorno organizirati u strukturu koja morfološki odgovara zubu (48).

Idealan smještaj stanica postiže se pomoću nosača što rezultira polarizacijom i pravilnim smještajem stanica. Nosač možemo koristiti u već uznapredovaloj fazi razvoja kako bismo rekonstruirali zametak i u tom slučaju vrijeme razvoja zuba iz transplantiranog zametka u usnoj šupljini biti će kraće (40).

U novije vrijeme otkrivena je metoda rekonstruiranja trodimenzionalnog zametka u ranom stadiju razvoja nazvana metoda bioinženjeringom dobivenog zubnog zametka (bioengineered organ germ method) (48). Ovom metodom također se pokušava dobiti zubni zametak oponašajući epitelno-mezenhimalne interakcije na način kako se one odvijaju za vrijeme razvoja zuba. Metoda podrazumijeva disocijaciju epitelnih i mezenhimalnih stanica embrionalnog zametka miša u stadiju kape te njihovu kompartmentalizaciju pri visokoj gustoći stanica u kolagen tip I gelu. Dobiveni zubni zametci stvaraju strukturalno pravilan zub nakon 14 dana kada se transplantiraju u subrenalnu kapsulu *in vivo* te također u kulturi organa *in vitro* (31). Nadalje, kada je dobiveni zametak kultiviran *in vitro*, epitelne su stanice invaginirale i umnožile se u mezenhimalnim agregatima te potakle rast brojnih zametaka s periferije graničnih površina između epitelnih i mezenhimalnih stanica. Takvi zametci kasnije rastu u pojedinačne zube, te se ova metoda može koristiti u stvaranju različitih zubi. Direktna interakcija između stanica kao posljedica velike gustoće stanica i kompartmentalizacija ključne su u organogenezi zubi, a vjerojatno i ostalih organa (48).

## 6. FUNKCIONALNI NADOMJESTAK IZGUBLJENOG ZUBA *IN VIVO*

Na mjesto izgubljenog zuba u usnoj šupljini odrasle jedinke možemo transplantirati ili dobiveni zubni zametak ili dobiven zrela zub stvoren procesom bioinženjeringa matičnim stanicama (Slika 5.).

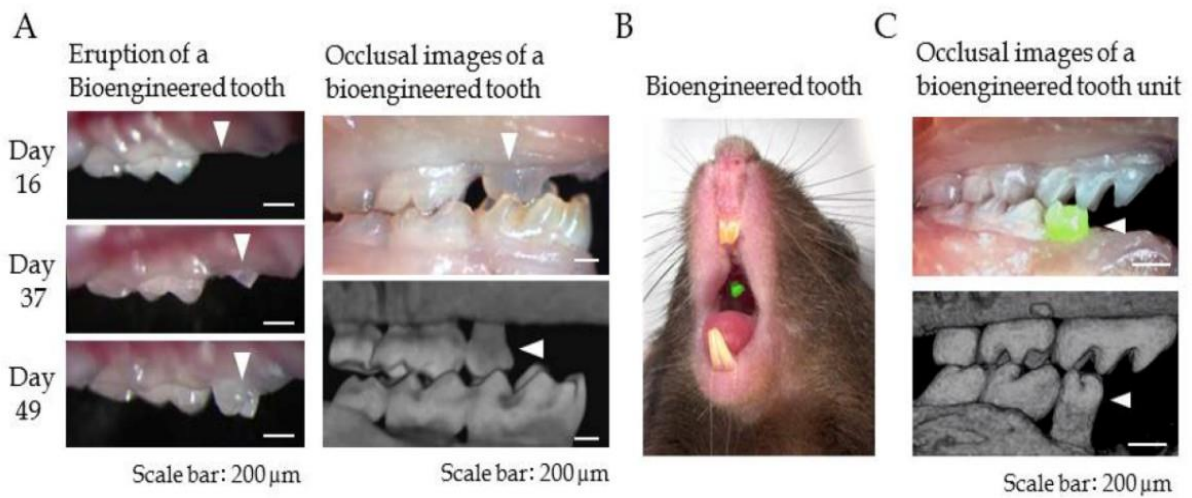


Slika 5. Prikaz dva modela transplantacije zubnog zametka i zrelog zuba. Preuzeto s dopuštenjem izdavača (49).

Ključno je pitanje može li dobiveni zubni zametak transplantiran u bezubu regiju čeljusti pravilo niknuti i okludirati s antagonističkim zubom. Erupcija zubi je kompleksan strogo reguliran proces koji uključuje i stanice zubnog organa i stanice okolne alveolarne kosti. Tijekom same erupcije aksijalni je pomak rezultat lokalne resorpcije kosti koja nadsvoduje zametak i apozicije kosti koja se nalazi ispod zuba. U miševa je dokazano da stvoreni zubni zametak može uspješno niknuti 37 dana nakon transplantacije te dosegnuti okluzalnu ravninu i ostvariti okluzalni kontakt sa zubom antagonistom (Slika 6.). Zub dobiven kao rezultat bioinženjeringa sadrži caklinu, dentin, odontoblaste, pulpu te alveolarnu kost. Prema Knoopovom testu tvrdoće caklina pokazuje odgovarajuće vrijednosti.

Druga mogućnost je transplantacije zubne jedinice koja uključuje zreli zub, parodontni ligament i alveolarnu kost. Ključno pitanje je može li takva zubna jedinica usađena u bezubu regiju ostvariti osteointegraciju koja bi uključivala remodelaciju kosti domaćna. Praksa je do sada

pokazala da u miševa transplantirana zubna jedinica doseže okluzalnu ravninu te da je transplantat prihvaćen kroz 40 dana osteointegracijom. Također je primijećeno kod miševa da stvorena zubna jedinica obnavlja vertikalne koštane gubitke (31).



Slika 6. Dobiveni zub u uvjetima *in vivo*. Preuzeto s dopuštenjem izdavača (49).

## **7. RASPRAVA**

U ranije opisanim poglavljima istaknuti su principi tkivnog inženjeringa, karakteristike matičnih stanica i njihova uloga, te metode i postupci koji se koriste u želji za produkcijom nadomjesne zubne jedinice. U nastavku rasprave istaknut ću nekoliko radova, postupke istraživanja te dobivene rezultate kako bih prikazala dosadašnja dostignuća u ovom relativno novom području te istaknula koje su trenutne prepreke u laboratorijskom stvaranju zuba.

Zbog nemogućnosti korištenja embrionalnih matičnih stanica radi njihove teratogenosti i etičkih dilema te teške dostupnosti (1), provedena su istraživanja u kojima su korištene adultne humane stanice. Kraljevski fakultet u Londonu svojim je istraživanjem želio dokazati da je moguće proizvesti biozub kombiniranjem adultnog humanog gingivalnog epitela te mezenhimalne stanice mišjeg embrionalnog molara (32).

Postupak započinje kirurškim uzimanjem uzorka gingivalnog tkiva, zatim slijedi obrada uzorka i enzimatska separacija nakon koje je epitelni sloj odvojen je od donjeg fibroznog tkiva. Da bi se dobio eksplantat, stanice su nastanjene u uvjetima bez prehrane i seruma u ciljanom mediju. Nakon dva dana vidljive su nakupine stanica, a trećeg dana stanice su skupljene pipetom kako bi se dobile pojedinačne mezenhimalne stanice koje su koristili su reasocijaciji. Mezenhimalne stanice su izolirali iz zubnog zametka donjeg molara mišjeg embrija starog 14,5 dana. Potom su injektirali epitelne stanice na površinu mezenhima dok mezenhim nije bio u potpunosti prekriven epitelnim stanicama u kapljici kolagena. Kombinirane stanice su potom kultivirane i nakon trećeg dana formirale su se nakupine stanica, dok su petog dana bile vidljive strukture nalik zubu koje odgovaraju kasnom stadiju kape. Sedmog dana presadak je kirurški transplantiran u renalnu kapsulu odraslog imunokompromitiranog miša te promatran šest tjedana. Mikro CT analiza potvrdila je postojanje tvrdih tkiva, a 3D rekonstrukcija očitu strukturu koja nalikuje zubu. Veća gustoća mineralizacije vidljiva je u koronarnom dijelu i odgovara caklini krune zuba dok područje niže gustoće odgovara dentinu u području korijena i okružuje pulpnu komoru. Histološki je potvrđeno postojanje cakline, dentina, vaskularizirane pulpe s odontoblastima sličnim stanicama te epitelnim kuboidnim stanicama koje upućuju na stanice slične ameloblastima.

Kao kontrolni postupak korištene su epitelne i mezenhimalne stanice u istim uvjetima, ali svaka zasebno, bez kombinacije dva tipa stanica. Nakon šest tjedana epitelne stanice su formirale strukture nalik cisti, a mezenhimalne mineralizirano tkivo, dok je nastanak dentalnih tkiva izostao (32).

U potrazi za alternativnim izvorima epitelnih stanica provedena su različita istraživanja, jedno od istraživanja u kojima se koriste iPSCs proveli su kineski znanstvenici. Ovo je ujedno i prvi primjer korištenja humanih iPSCs (15).

Cai i suradnici ispitali su sposobnost induciranih pluripotentnih matičnih stanica dobivenih iz slobodnog humanog urina da se diferenciraju u ameloblaste (15). Na početku postupka dobivene su iPSCs diferencirane u epitelne stanice, a potom i rekombinirane s mezenhimalnim stanicama izoliranima iz molara miša u 15-om danu embrionalnog života. Nakon tri tjedna provedenih u subrenalnoj kapsuli vidljiva je struktura nalik zubnoj. Histološka i molekularna analiza pokazuju da je došlo do diferencijacije epitela dobivenog iz iPSCs u ameloblaste. Pozitivni rezultat korištenja humanih iPSCs daje nadu za ovaj tip stanica da bi mogao biti izvor za postupke *in vitro*. Također je primijećeno kako je za nastanak ove cakline potrebno tri tjedna dok razvoj prirodnog zuba traje 400 dana od inicijalnog formiranja do nicanja. Ova spoznaja govori nam da je došlo do bržeg razvoja i diferencijacije humanog epitela induciranog embrionalnim mezenhimom miša, što bi se potencijalno moglo koristiti u kliničkom radu kako bi se ubrzala diferencijacija tkiva i organa dobivenih iz humanih iPSCs-a. Također u radu ističu kako bezobzira što se pokazalo da se epitelne stanice dobivene iz humanih iPSCs ili iz humanih keratinocita i gingivalnog epitela mogu diferencirati u ameloblaste koji proizvode caklinu kao odgovor na induktivni signal embrionalnog mezenhima miša, nijedna od tih stanica ne posjeduje odontogeni potencijal. Isto tako sve humane postnatalne mezenhimalne stanice dentalnog podrijetla nemaju induktivno svojstvo. Naglašavaju kako je vrlo važno otkriti osnove odontogenog potencijala te kako je on jedinstvena kombinacija faktora rasta u različitim slojevima tkiva u određenom stadiju razvoja zuba. Također smatraju kako je moguće pretpostaviti da bi se adultne stanice s odontogenom sudbinom te signalnim molekulama sličnim embrionalnim dentalnim tkivima i sa kapacitetom inducirati nastanak zuba, također mogle ponašati kao induktori. Iako bi bilo bolje da su induktori mezenhimalne stanice budući da one utječu na oblik i veličinu zuba. Posebnu manipulaciju mezenhimalnih stanica dentalnog podrijetla ili dobivenih iz iPSCs postiglo bi se posjedovanje odontogenog potencijala. Rekombinacijom epitela dobivenog iz iPSCs i mezenhima dobio bi se zametak zuba u kasnom stadiju pupoljka ili ranom stadiju kape i implantirao bi se u ekstrakcijsku alveolu (15).

Ranije je spomenuto kako postoji mogućnost transplantacije zubnog zametka u odraslu čeljust jedinice ili pak transplantacije cijele zrele zubne jedinice.

Japansko istraživanje iz 2011-te ističe uspješno dobiven zreli organ, odnosno zubnu jedinicu kontrolirane dužine i oblika kao rezultat rada njihovih znanstvenika. Zubna jedinica sastoji se od zrelog zuba, parodontnog ligamenta i alveolarne kosti. Zubnom jedinicom regenerirana je fiziološka funkcija zuba, djelovanje parodontnog ligamenta, odgovarajući odgovor na određene podražaje te postignuta osteointegracija. Ističu kako 3D tehnologija uzgoja organa *in vitro* jos nije poznata, te se koriste tehnikom u kojoj se zub razvija iz bioinženjeringom proizvedenog

zubnog zametka te procesom *in vivo* (50). Postupak započinje ekstrakcijom zubnog zametka molara miša te potom slijedi izolacija tkiva i priprema pojedinačnih stanica epitela i mezenhima. Trodimenzionalnom tehnikom manipulacije stanica dobiven je zubni zametak molara. Nakon pet dana kultiviranja *in vitro* zubni se zametak postavi u posebnu napravu koja je korištena u ovom istraživanju s ciljem osiguravanja prostora za razvoj zub te je transplantiran u subrenalnu kapsulu ženke miša stare 7 tjedana na 60 dana. Nakon tog perioda dobivena zubna jedinica transplantirana je u ekstrakcijski prostor donjeg molara kod miša starog 4 tjedna. Problem ovakvog načina dobivanja zuba je spljoštenost samog zuba zbog pritiska renalne kapsule što je rezultiralo potrebom za korištenjem posebne prstenaste naprave u koju je umetnut zametak te tako transplantiran u subrenalnu kapsulu. Naprava osigurava dovoljno prostora za pravilan razvoj zuba te omogućuje kontrolu širine i dužine zuba. U daljnjem tijeku istraživanja japanski znanstvenici ispitivali su svojstva dobivene zubne jedinice, odnosno zrelog zuba, osteointegraciju, svojstva dentalnih tkiva, funkciju parodonta i odgovor na mehanički stres. Dobivena zubna jedinica transplantirana je u bezubi prostor 4-6 dana nakon ekstrakcije, na način da zub ostvaruje okluzalni kontakt sa zubom antagonistom. Kroz 30 dana nakon transplantacije uočena je resorpcija površine kosti zubne jedinice, koja je postepeno napredovala te je oko 40-og dana od transplantacije zub zapravo bio u potpunosti okružen kosti domaćina, čime je potvrđeno da dolazi do osteointegracije što je važan preduvjet pravilne funkcije cijele zubne jedinice (50). Da bi se ispitalo zadovoljava li transplantirani zub mastikatornu funkciju te odgovor na mehanički stres provedeno je testiranje čvrstoće cakline i dentina. Provedeni je Knoopov test tvrdoće te su dobivene vrijednosti za proizveden zub uspoređene sa vrijednostima prirodnog odgovarajućeg zuba. Rezultati su pokazali da caklina i dentin bioinženjeringom proizvedenog zuba pokazuju odgovarajuće vrijednosti tvrdoće potrebne za ispunjavanje svoje funkcije u procesu mastikacije. Provedeno je ispitivanje fiziološke funkcije zuba odnosno odgovor parodontnog ligamenta na mehanički stres u vidu ortodontskog pomaka. Testiranje je provedeno induciranim ortodontskim pomakom koji zahtjeva odgovarajuću remodelaciju kosti na mjestima pritiska odnosno tenzije. Transplantat je pokazao odgovarajući odgovor pravilnom lokalizacijom osteoklasta odnosno osteoblasta kao odgovor na mehaničku silu primjenjenu na zubnu jedinicu. Gubitak zuba često je popraćen opsežnim gubitkom alveolarne kosti, te je u svrhu istraživanja zub transplantiran u pripremljen koštani defekt ne bi li se dokazalo da transplantirani zub potiče regeneraciju kosti. Kroz 14 dana od transplantacije uočena je vertikalna formacija kosti, te u konačnici potvrđena regeneracije kosti u vertikalnom i horizontalnom smjeru. Iako nije moguće u potpunosti nadomjestiti izgubljenju koštanu masu, koštani defekt značajno je umanjen na mjestu



transplantacije zuba u usporedbi s mjestom gdje nema transplantata. Svojim su istraživanjem pokazali uspješnu transplantaciju bioinženjeringom proizvedene zubne jedinice kao primjer zrelog organa. To je ujedno i prvi primjer potpune regeneracije nekog organa proizvedenog na ovaj način (50). Autori smatraju da će se u budućnosti nadomjesna terapija razvijati u smjeru transplantacija bioinženjeringom proizvedenih zrelih zubi s potpunom fiziološkom funkcijom i dugom održivošću (51,52). Također ističu kako je za kliničku primjenu zubi stvorenih u regenerativnoj terapiji potrebno istražiti mogućnosti proizvodnje u 3D kulturi organa *in vitro* što zasad nije moguće te pronaći odgovarajuće izvore adultnih matičnih stanica (50).

## **8. ZAKLJUČAK**

Tkivni inženjering matičnih stanica sa svrhom produkcije novih dentalnih tkiva relativno je nova, dinamična multidisciplinarna grana znanosti. Osnovna ideja inženjeringa je stvaranje zubne jedinice kao idealnog nadomjeska prirodnog zuba izgubljenog uslijed karijesa, parodontne bolesti ili traume. Nasuprot dosadašnjim konvencionalnim načinima zbrinjavanja bezubosti u vidu protetskih krunica, mostova, dentalnih implantata, proizvodnja zuba tkivnim inženjeringom osigurala bi trajno biološko, estetsko i potpuno funkcionalno rješenje.

Ovo područje svoj rad temelji na poznavanju vrsta te svojstava matičnih stanica, njihovih interakcija, ali također i složenih procesa prirodnog razvoja zuba. Osnova tkivnog inženjeringa je reprodukcija organogeneze, te epitelno-mezenhimalna interakcija koja dovodi do stvaranja dentalnih tkiva.

Tijekom godina provedena su brojna istraživanja koja pokazuju stalan razvoj ovog područja, a prate ga i sve impresivniji rezultati. Međutim, unatoč tome što određena istraživanja potvrđuju mogućnost stvaranja najprije zubnog zametka pa u konačnici i razvoj zubne jedinice, uglavnom se uvijek nameću ista pitanja koja onemogućuju širu primjenu ovakvog postupka, a posebice kliničku primjenu kod ljudi.

Kao prvi istaknula bih potrebu za pronalaskom odgovarajućih tkiva koja bi osigurala dostatan izvor adultnih humanih matičnih stanica. Iako embrionalne matične stanice imaju najveći diferencijacijski potencijal i bile bi najbolji izbor, njihova klinička upotreba zbog teratogenosti, ali i brojnih etičkih dilema nije moguća. Također upitna je i dostupnost takvih stanica. Kao rješenje traže se alternativni izvori adultnih humanih epitelnih i mezenhimalnih stanica.

Nove mogućnosti otvorene su otkrićem induciranih pluripotentnih matičnih stanica čiji je diferencijacijski potencijal jednak onom embrionalnih matičnih stanica.

Dosadašnja iskustva također pokazuju kako zasada nije bilo uspješnog pokušaja proizvodnje cjelovitog zuba u uvjetima *in vitro*. Potpuna reprodukcija organogeneze u uvjetima *in vitro* zahtjeva poznavanje tog složenog procesa, ali i svih čimbenika koji u njemu sudjeluju što za sada nije ostvareno. Vrlo je važno definirati odontogeni potencijal te faktore rasta koji dominiraju u određenom razdoblju razvoja zuba.

Tkivni inženjering cjelovitog zuba ima veliki potencijal, ali kao multidisciplinarna znanost napredak ovog područja uvelike ovisi o napretku ostalih znanstvenih disciplina. Zajedničkim radom na području inženjeringa, prirodnih i medicinskih znanosti može se očekivati skoro rješenje istaknutih problema, te povećati stopa uspješnosti stvaranja zubi odgovarajućeg oblika.

## **9. LITERATURA**

1. Jamal HA. Tooth organ bioengineering: cell sources and innovative approaches. *Dent J.* 2016;4(18):1-12.
2. Yamaizum M, Mekada E, Uchida T, Okada Y. One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell.* 1978;15(1):245-50.
3. Maksimov A. The lymphocyte as a stem cell, common to different blood elements in embryonic development and during the post fetal life of mammals. *Folia Haematol.* 1909;8(12):123-34.
4. Hirschi KK, Li S, Roy K. Induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Annu Rev Biomed Eng.* 2014;16:277-94.
5. National institutes of health. Stem cell information [Internet]. Bethesda: U.S. Department of Health & Human Service; 2018 [cited 2018 Jul 31]. Available from: <https://stemcells.nih.gov/info/basic/1.htm>.
6. College of engineering. Berkeley bioengineer [Internet]. Berkeley: College of engineering; 2018 [cited 2018 Aug 10]. Available from: [bioeng.berkeley.edu/about-us/what-is-bioengineering](http://bioeng.berkeley.edu/about-us/what-is-bioengineering).
7. O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater today.* 2011;14(3):88-95.
8. Hohlfeld J, de Buys Roessingh A, Hirt-Burri N, Chaubert P, Gerber S, Scaletta C, et al. Tissue engineered fetal skin constructs for paediatric burns. *Lancet.* 2005;366(9488):840-42.
9. Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmoeller M, et al. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet.* 2004;364(9436):766-70.
10. Niklason LE, Gao J, Abbott WM, Hirschi KK, Houser S, Marini R, et al. Functional arteries grown in vitro. *Science.* 1999;284(5413):297-302.
11. Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg.* 1997;100(2):297-302.
12. Majumdar SK. History of dentistry: an overview. *Bull Indian Hist Med Hyderabad.* 2002;32(1):31-42.
13. Bhanja A, D'Souza DSJ. Mapping the milestones in tooth regeneration: Current trends and future research. *Med J Armed Forces India.* 2016;72(1):24-30.
14. Lympieri 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.

15. Zhang Y, Chen Y. Bioengineering of a human whole tooth: progress and challenge. *Cell Regen.* 2014;3(8):1-3.
16. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997;276(5309):71-4.
17. Gothi R, Sangwan N, Kaushik A, Sikka N. Periodontal ligament stem cells – the regeneration front. *Dentistry.* 2015;5(1):1-7.
18. Yang B, Qiu Y, Zhou N, Ouyang H, Ding J, Cheng B, et al. Application of stem cells in oral disease therapy: progresses and perspectives. *Front Physiol.* 2017;8:197.
19. Bansal R, Jain A. Current overview on dental stem cells applications in regenerative dentistry. *J Nat Sci Biol Med.* 2015;6(1):29-34.
20. Yu T, Volponi AA, Babb R, An Z, Sharpe PT. Stem cells in tooth development, growth, repair, and regeneration. In: Chai Y, editor. *Craniofacial development: Current topics in developmental biology.* Vol. 115. Amsterdam: Academic press; 2015. p. 187-212.
21. Sonoyama W, Liu Y, Fango D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One.* 2006;1(1):e79.
22. Song IS, Han YS, Lee JH, Um S, Kim HY, Seo BM. Periodontal ligament stem cells for periodontal regeneration. *Curr Oral Health Rep.* 2015;2:236-44.
23. Zhu W, Liang M. Periodontal ligament stem cells: current status, concerns and future prospects. *Stem Cells Int.* 2015;2015:972313.
24. Song JS, Kim SO, Kim SH, Choi HJ, Son HK, Jung HS, et al. In vitro and in vivo characteristics of stem cells derived from the periodontal ligament of human deciduous and permanent teeth. *Tissue Eng Part A.* 2012;18(19-20):2040-51.
25. Silverio KG, Rodrigues TL, Coletta RD, Benevides L, Da Silva JS, Casati MZ, et al. Mesenchymal stem cell properties of periodontal ligament cells from deciduous and permanent teeth. *J Periodontol.* 2010;81(8):1207-15.
26. Ji K, Liu Y, Lu W, Yang F, Yu J, Wang X, et al. Periodontal tissue engineering with stem cells from the periodontal ligament of human retained deciduous teeth. *J Periodontal Res.* 2013;48(1):105-16.
27. Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE. Differentiation of stem cells in the dental follicle. *J Dent Res.* 2008;87(8):767-71.
28. Encyclopaedia Britannica [Internet]. London: Encyclopaedia Britannica, Inc; c2018. Growth of bacterial populations; 2018 [cited 2018 Aug 25]; [about 3 screens]. Available from: <https://www.britannica.com/science/bacteria/Growth-of-bacterial-populations#ref955458>.

29. Nishiyama Y, Iwanami A, Kohyama J, Itakura G, Kawabata S, Sugai K et al. Safe and efficient method for cryopreservation of human induced pluripotent stem cell-derived neural stem and progenitor cells by a programmed freezer with a magnetic field. *J neurones*. 2015;107:20-9.
30. Keller L, Kuchler-Bopp S, Lesot H. Whole-tooth engineering and cell sources. In: George T, Huang J, Thesleff I, editors. *Stem cells in craniofacial development and regeneration: Stem cell-mediated craniofacial tissue bioengineering*. Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell; 2013. p. 431-43.
31. Tsuji T. Bioengineering of functional teeth. In: George T, Huang J, Thesleff I, editors. *Stem cells in craniofacial development and regeneration: Stem cell-mediated craniofacial tissue bioengineering*. Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell; 2013. p. 447-59.
32. Volponi AA, Kawasaki M, Sharpe PT. Adult human gingival epithelial cells as a source for whole-tooth bioengineering. *J Dent Res*. 2013;92(4):329-34.
33. Volponi AA, Pang Yvonne, Sharpe PT. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends Cell Biol*. 2010;20(12):715-22.
34. Baudry A, Uzunoglu E, Schneider B, Kellermann O, Goldberg M. From pulpal stem cells to tooth repair: an emerging field for dental tissue engineering. *Evidence-Based Endodontics*. 2016;1(2):1-5.
35. Lin NH, Gronthos S, Bartold PM. Stem cells and periodontal regeneration. *Aust Dent J*. 2008;53:108-21.
36. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry-part I: Stem cell sources. *J Prosthodont Res*. 2012;56(3):151-65.
37. Honda MJ, Tsuchiya S, Shinohara Y, Shinmura Y, Sumita Y. Recent advances in engineering of tooth and tooth structures using postnatal dental cells. *Jpn Dent Sci Rev*. 2010;46(1):54-66.
38. Hynes K, Menichanin D, Bright R, Ivanovski S, Hutmacher DW, Gronthos S, et al. Induced pluripotent stem cells: A new frontier for stem cells in dentistry. *J Dent Res*. 2015;94(11):1508-15.
39. Zheng Y, Du X, Wang W, Boucher M, Parimoo S, Stenn S, et al. Organogenesis from dissociated cells: Generation of mature cycling hair follicles from skin-derived cells. *J Invest Dermatol*. 2005;124(5):867-76.
40. Ikeda E, Tsuji T. Growing bioengineered teeth from single cells: potential for dental regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther*. 2008;8(6):735-44.

41. Chan BP, Leong KW. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J.* 2008;4:467-79.
42. Yelick PC, Vacanti JP. Bioengineered teeth from tooth bud cells. *Dent Clin North Am.* 2006;50(2):191-203.
43. Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS, Bartlett JD, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res.* 2004;83(7):523-8.
44. Honda MJ, Sumita Y, Kagami H, Ueda M. Histological and immunohistochemical studies of tissue engineered odontogenesis. *Arch Histol Cytol.* 2005;68(2):89-101.
45. Honda M, Morikawa N, Hata K, Yada T, Morita S, Ueda M. Rat costochondral cell characteristics on poly (L-lactide-co- $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds. *Biomaterials.* 2003;24(20):3511-9.
46. Thakur L, Goel M, Sachdeva GS, Katoch K. Regenerative endodontics: A comprehensive review. *EC Dent Sci.* 2016;3 (4):556-67.
47. Yamamoto H, Kim EJ, Cho SW, Jung HS. Analysis of tooth formation by reaggregated dental mesenchyme from mouse embryo. *J Electron Microsc.* 2003;52(6):559-66.
48. Nakao K, Tsuji T. Dental regenerative therapy: Stem cell transplantation and bioengineered tooth replacement. *Jpn Dent Sci Rev.* 2008;44(1):70-5.
49. Oshima M, Tsuji T. Whole Tooth Regeneration Using a Bioengineered Tooth. In: Hibi H, editor. *New Trends in Tissue Engineering and Regenerative Medicine.* Nagoya: IntechOpen; 2014. p.109-119.
50. Oshima M, Mizuno M, Imamura A, Ogawa M, Yasukawa M, Yamazaki H, et al. Functional tooth regeneration using a bioengineered tooth unit as a mature organ replacement regenerative therapy. *PLoS ONE.* 2011;6(7):e-21531.
51. Gridelli B, Remuzzi G. Strategies for making more organs available for transplantation. *N Engl J Med.* 2000;343:404-10.
52. Sharpe PT, Young CS. Test tube teeth. *Sci Am.* 2005;293:34-41.



## **10. ŽIVOTOPIS**

Leona Keretić rođena je 24.4.1993. godine u Varaždinu. Pohađala je Drugu osnovnu školu Varaždin, te nakon toga završila Prvu gimnaziju Varaždin, opći smjer. Po završenom srednjoškolskom obrazovanju i položenoj državnoj maturi, upisuje Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Aktivno se služi engleskim jezikom.