

UNIVERZITET U BEOGRADU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Mladen M. Vuković

**„ANALIZA UTICAJA ACETILSALICILNE
KISELINE NA DIFERENCIJACIJU MATIČNIH
ĆELIJA ZUBNE PULPE U ZRELE
ODONTOBLASTE I EKSPRESIJU GENA
ODGOVORNIH ZA STVARANJE DENTINA *IN*
VITRO“**

doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Mladen M. Vukovic

**"ANALYSIS OF THE INFLUENCE OF
ACETYLSALICYLIC ACID ON THE
DIFFERENTIATION OF DENTAL PULP STEM
CELLS INTO MATURE ODONTOBLASTS
AND THE EXPRESSION OF GENES
RESPONSIBLE FOR DENTIN FORMATION *IN
VITRO*"**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

MENTOR

Prof. Dr Jelena Milašin
Redovni profesor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE

Prof. Dr Jelena Roganović
Vanredni profesor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. Dr Miroslav Andrić
Vanredni profesor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Dr Verica Milošević, naučni savetnik u penziji

DATUM ODBRANE: _____

Mladen Vuković

**„ANALIZA UTICAJA ACETILSALICILNE KISELINE NA DIFERENCIJACIJU
MATIČNIH ĆELIJA ZUBNE PULPE U ZRELE ODONTOBLASTE I EKSPRESIJU
GENA ODGOVORNIH ZA STVARANJE DENTINA *IN VITRO*“**

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena u laboratorijama OJ Institutski predmeti u Laboratorijama za ćelijske kulture i za molekularnu genetiku, Stomatološkog fakulteta u Beogradu, u saradnji sa Klinikom za oralnu hirurgiju, Stomatološkog fakulteta u Beogradu, Univerziteta u Beogradu.

Može se reći da su ove doktorske studije bile dio epskog putovanja. Sada shvatam da oni koji pokušaju da unaprede svoje znanje moraju sopstveni razum i intelekt napregnuti do ivice! Takođe, dve godine pandemije korona virusa, vakcinacija, izolacija, testiranja, otežanog putovanja, kontrola, itd., u značajnoj su meri otežale ovo epsko putovanje, koje sada uspešno privodim kraju. Jedno takvo putovanje nije se moglo preživeti samostalno i zahtevalo je pomoć i podršku velikog broja ljudi.

Pre svega, želim da se zahvalim svojoj Mentorki, Prof. Dr Jeleni Milašin, na velikom strpljenju, razumevanju i nesebičnoj podršci tokom istraživanja i izrade ovog rada. Dugujem veliku zahvalnost na pomoći u sprovođenju eksperimenata i istraživanja koleginicama i kolegama iz Laboratorije za ćelijske kulture, a iznad svega dr Milošu Lazareviću, dr Milici Jakšić Karišik i dr Dijani Mitić, koji su me nesebično uveli u tajne laboratorijskog rada. Konačno, zahvaljujem se i članovima komisije, profesorima Jeleni Roganović i Miroslavu Andriću kao i Verici Milošević profesoru i naučnom savetniku u penziji, čiji su konstruktivni saveti u znatnoj meri pomogli u oblikovanju disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem roditeljima, ocu Miloju i majci Jelici i bratu Vitomiru, koji su svih ovih godina stajali uz mene, podržavajući moj rad i školovanje, i nesebično se žrtvovali da bih ovo istraživanje i doktorske studije uspešno priveo kraju. Nadam se da će ova doktorska disertacija biti dovoljna nagrada za žrtvu koju su podnosili svih ovih godina.

“Ja na sebe gledam kao na dečaka koji se igra na morskoj obali, dok ogroman okean istine leži neotkriven ispred mene”- Isaac Newton.

SAŽETAK

Uvod: najnovija istraživanja pokazala su da acetilsalicilna kiselina (ASA), široko korišćen antiinflamatorni lek, poseduje i osteoinduktivno dejstvo.

Cilj: da se ustanovi da li ASA može potencijalno da utiče i na odontogenezu, odnosno da stimuliše diferencijaciju matičnih ćelija zubne pulpe (DPSCs) u odontoblaste, i kojim mehanizmima.

Materijali i metode: DPSC su izolovane iz tkiva pulpe trećih molara pet pacijenata i uzgajane u osteogenoj podlozi same ili uz dodatak ASA. Ekspresija markera matičnosti testirana je protočnom citometrijom. Citotoksičnost ASA u koncentracijama od 10, 50 i 100 µg/ml testirana je MTT i NR testovima. Osteo/odontogena diferencijacija analizirana je alizarin crvenom bojom i preko aktivnosti alkalne fosfataze (ALP). Kvantitativni PCR je korišćen za analizu ekspresije osteo/odontogenih markera (DSPP, BMP2, BMP4, BSP, OCN i RUNX2), kao i cMYC gena.

Rezultati: testovi citotoksičnosti pokazali su da samo najveća doza ASA smanjuje vijabilnost ćelija. Najmanja koncentracija ASA dovela je do značajnog poboljšanja osteo/odontogene diferencijacije DPSC. Došlo je do povećanog formiranja mineralizovanih nodula u ćelijskim kulturama, kao i do porasta aktivnosti ALP i ekspresije svih analiziranih gena (između 2 i 30 puta), u poređenju sa netretiranim ćelijama. ASA je takođe povećala proliferaciju DPSC-a. Nivo ekspresije c-MYC smanjen je u kulturama tretiranim sa ASA, što ukazuje na njegovu ulogu u procesu diferencijacije DPSC ka odontogenoj lozi.

Zaključci: pokazano je da niske koncentracije ASA (koje odgovaraju standardnoj upotrebi kod kardiovaskularnih pacijenata) stimulišu osteo/odontogenu diferencijaciju matičnih ćelija zubne pulpe.

Klinička važnost: ASA primenjena kao antitrombocitna terapija može potencijalno da pomogne i u reparaciji zubne pulpe.

KLJUČNE REČI: matične ćelije zubne pulpe, acetilsalicilna kiselina, osteogena/odontogena diferencijacija, proliferacija, protein kinaza aktivirana adenozin monofosfatom (AMPK).

ABSTRACT

Introduction: recent research has shown that acetylsalicylic acid (ASA), a widely used anti-inflammatory drug, also has an osteoinductive effect.

Objective: to establish whether ASA can potentially influence odontogenesis, i.e. stimulate the differentiation of dental pulp stem cells (DPSCs) into odontoblasts, and by what mechanisms.

Materials and methods: DPSCs were isolated from the pulp tissue of the third molars of five patients and grown in osteogenic medium alone or with ASA. Stem cell's markers expression was tested by flow cytometry. Cytotoxicity of ASA in concentrations of 10, 50 and 100 µg/ml was tested by MTT and NR tests. Osteo/odontogenic differentiation was examined by alizarin red staining and alkaline phosphatase (ALP) activity. Quantitative PCR was used to analyze the expression of osteo/odontogenic markers (DSPP, BMP2, BMP4, BSP, OCN and RUNX2), as well as of cMYC gene.

Results: cytotoxicity tests showed that only the highest dose of ASA reduced cell viability. The lowest concentration of ASA led to a significant improvement in the osteo/odontogenic differentiation of DPSCs. There was an increased formation of mineralized nodules in cell cultures, as well as an increase in ALP activity and expression of all analyzed genes (between 2 and 30-fold), compared to untreated cells. ASA also stimulated DPSC proliferation. The expression level of c-MYC was decreased in cultures treated with ASA, indicating its role in the process of DPSC differentiation towards the odontogenic lineage.

Conclusions: low concentrations of ASA (corresponding to standard use in cardiovascular patients) were shown to stimulate osteo/odontogenic differentiation of dental pulp stem cells.

Clinical relevance: ASA applied as an antiplatelet therapy can potentially help in dental pulp repair.

SADRŽAJ:

Uvod.....	1
1.1 Embrionalne matične ćelije (ESC).....	3
1.2 Postnatalne (Adultne) matične ćelije (ASC).....	3
1.3 Mezenhimalne matične ćelije (MSC).....	3
1.4 Indukovane Pluripotentne Matične Ćelije (iPSCs).....	5
1.5 Matične ćelije zuba (DSC).....	5
1.5.1 Matične ćelije periodontalnog ligamenta (PDLSC).....	6
1.5.2 Matične ćelije apikalne papile (SCAP).....	7
1.5.3 Matične ćelije iz humanih eksfoliranih mlečnih zuba (SHED).....	7
1.5.4 Matične ćelije zubnog folikula (DFPC).....	8
1.5.5 Matične ćelije gingive (GSC).....	9
1.5.6 Matične ćelije zubne pulpe (DPSCs).....	10
2. Odontoblasti.....	15
2.1 Građa i funkcija odontoblasta	15
2.2 Razvoj odontoblasta.....	17
2.3 Uloga odontoblasta u sazrevanju dentina.....	18
2.4 Tercijarna dentinogeneza.....	18
2.4.1 <i>Reaktivna dentinogeneza</i>	18
2.4.2 <i>Reparativna dentinogeneza</i>	19
3. Acetilsalicilna kiselina.....	21
3.1 Uloga i značaj acetilsalicilne kiseline.....	21
3.2 Indikacije za primenu acetilsalicilne kiseline.....	21
3.2.1 Protein-kinaza aktivirana adenozin-monofosfatom (AMPK).....	21
3.3 Acetilsalicilna kiselina i osteogeneza.....	22
4. Radna hipoteza.....	23
5. Ciljevi.....	25
6. Materijali i metode.....	27
6.1 Pacijenti.....	28

6.2 Čelijske kulture i dokazivanje matičnosti DPSC.....	28
6.2.1 Test formiranja kolonija (eng. Colony Forming Unit – CFU TEST).....	28
6.2.2 Test ćelijske proliferacije.....	29
6.2.3 Test zarastanja rana.....	29
6.2.4 Protočna citometrija.....	29
6.2.5 Indukcija diferencijacije u hondro-, adipo- i neuro-lozu.....	30
6.2.5.1 <i>Hondrogena indukcija</i>	30
6.2.5.2 <i>Adipogena indukcija</i>	30
6.2.5.3 <i>Neurogena indukcija</i>	30
6.3 Odontogena diferencijacija.....	31
6.4 MTT Test.....	31
6.5 Neutralno crveno test (Neutral red-NR- assay).....	31
6.6 Test aktivnosti ALP.....	32
6.7 Izolacija RNK i analiza ekspresije osteo/odontogenih markera.....	32
6.8 Test proliferacije ćelija nakon ASA.....	35
6.9 Analiza c-Myc ekspresije.....	35
6.10 AMPK inhibicija.....	35
6.11 Statistička analiza.....	35
7. Rezultati	36
7.1 Izolacija i karakterizacija DPSC iz trećih molara.....	37
7.1.1 Test formiranja kolonija (eng. Colony Forming Unit - CFU TEST).....	38
7.1.2 Proliferativni kapacitet DPSC.....	39
7.1.3 Test zarastanja rana.....	39
7.1.4 Protočna citometrija je pokazala prisustvo markera mezenhimalnih matičnih ćelija u DPSC kulturama.....	40
7.1.5 Dokazivanje multipotentnosti DPSC.....	43
7.2 Uticaj ASA na odontogenu diferencijaciju DPSC.....	44

7.2.1 MTT i NR testovi i ispitivanje citotoksičnosti ASA.....	44
7.2.2 ASA indukuje osteo/odonto-diferencijaciju.....	45
7.2.3 ASA stimuliše aktivnost ALP.....	46
7.2.4 ASA povećava ekspresiju osteo/odontogenih markera.....	47
7.3 Uticaj ASA na ćelijsku proliferaciju i diferencijaciju.....	48
7.3.1 Uticaj ASA na proliferaciju.....	48
7.3.2 Uticaj ASA na diferencijaciju ćelija.....	49
7.3.3 Mehanizam delovanja ASA i AMPK inhibicija.....	50
8. Diskusija.....	52
9. Zaključci.....	60
10. Literatura.....	62
Prilog 1. Molba za prikupljanje uzoraka.....	68
Prilog 2. Saglasnost pacijenta.....	69
Biografija autora.....	70
Izjava o autorstvu.....	71

LISTA SLIKA:

Slika 1 - Sažetak izvora dentalnih matičnih ćelija.....	9
Slika 2 - In vitro osteogena diferencijacija DPSC.....	14
Slika 3 - Ilustracija morfoloških i unutarćelijskih promena	

povezanih sa sazrevanjem odontoblasta.....	16
Slika 4 - Dijagramski prikaz poprečnog preseka zuba koji ilustruje ključne događaje potrebne za taloženje tercijarnog dentina.....	20
Slika 5 - Praćenje amplifikacije uzoraka primenom kvantitativne PCR tehnike (qPCR); prikaz pet uzoraka označenih različitim bojama, od kojih je svaki analiziran u triplicatu.....	34
Slika 6a - Izgled ćelija tokom kultivacije.....	37
Slika 6b - Izgled ćelija odmah nakon pasažiranja.....	38
Slika 7 - Prikaz rezultata CFU testa nakon 7 (levo) i 10 (desno) dana od zasejavanja.....	38
Slika 8 - Proliferativni kapacitet DPSC u kulturama, praćen u vremenskom rasponu do 7 dana.....	39
Slika 9 - Proces migracije ćelija u nultom vremenu (a), nakon 12 sati (b), nakon 24 sata (c) i nakon 48 sati (d).....	40
Slika 10a - Protočna citometrija DPSC obeleženih antitelom na CD73.....	41
.	
Slika 10b - Protočna citometrija DPSC obeleženih antitelom na CD90.....	42
Slika 10c - Protočna citometrija DPSC obeleženih antitelom na CD105.....	43
Slika 11 -DPSC uzgajane u odgovarajućem medijumu za diferencijaciju su indukovane prema hondro (A), adipo(B) i neuro(C) lozama, što potvrđuje specifično bojenje ćelijskih produkata (hondro- i adipo-diferencijacija) ili po ćelijskoj morfologiji (neuro-diferencijacija).....	44
Slika 12 - Testovi citotoksičnosti MTT i neutralne crvene boje.	
*P ≤ 0.05 ; Kontrola – DPSC kultivisan u kompletnom medijumu bez tretmana ASA; ASA 10 - DPSC kultivisan u kompletnom medijumu sa 10 ug/ml acetilsalicilne kiseline; ASA 50 – DPSC kultivisan u kompletnom medijumu sa 50 ug/ml	

acetilsalicilne kiseline; ASA 100 - DPSC kultivisan u kompletnom medijumu sa 100 µg/ml acetilsalicilne kiseline.....	45
Slika 13- (A) Bojenje Alizarin crvenom, uvećanje 40 ×;	
(B) Kvantifikacija bojenja, OM - DPSC kultivisane u osteogenom medijumu; OM + ASA 10 - DPSC kultivisane u osteogenom medijumu sa 10 µg/ml acetilsalicilne kiseline; OM + ASA 50 - DPSC kultivisane u osteogenom medijumu sa 50 µg/ml acetilsalicilne kiseline.....	46
Slika 14- ALP aktivnost DPSC posle 7 dana osteo/odontogene diferencijacije.	
*P ≤ 0.05 ; OM - DPSC kultivisan u osteogenoj podlozi;	
OM + ASA 10 - DPSC kultivisan u osteogenoj sredini sa 10 µg/ml acetilsalicilne kiseline; OM + ASA 50 - DPSC kultivisan u osteogenom medijumu sa 50 µg/ml acetilsalicilne kiseline.....	47
Slika 15- Nivo ekspresije markera osteo/odontogene diferencijacije u DPSC kulturama. *P ≤ 0.05 ; **P ≤ 0.01 OM - DPSC kultivisane u osteogenom medijumu; OM + ASA 10 - DPSC kultivisane u osteogenom medijumu sa 10 µg/ml acetilsalicilne kiseline; OM + ASA 50 – DPSC kultivisane u osteogenom medijumu sa 50 µg/ml acetilsalicilne kiseline.....	48
Slika 16- Uticaj ASA na proliferaciju DPSC.....	49
Slika 17-(a) Test ćelijske proliferacije i (b) relativni nivoi ekspresije c-Myc.	
OM - DPSC kultivisan u osteogenoj podlozi; OM + ASA 10 – DPSC kultivisan u osteogenom medijumu sa 10 ug/ml acetilsalicilne kiseline.....	50
Slika 18- Efekat inhibicije AMPK na ekspresiju markera osteo/odonto-diferencijacije u DPSC kulturama. *P ≤ 0.05 ;	
OM - DPSC kultivisane u osteogenoj podlozi; OM + ASA 10 - DPSC kultivisane u osteogenom medijumu sa 10 µg/ml acetilsalicilne kiseline;	
INH - DPSC kultivisane u osteogenom medijumu sa 10 µg/ml acetilsalicilne kiseline i tretirane inhibitorom AMPK; OM - osteogeni medijum; ASA - acetilsalicilna kiselina.....	51

LISTA TABELA:

Tabela 1.	Potencijal diferencijacije humanih dentalnih matičnih ćelija	12
Tabela 2.	Nazivi gena i prajmeri sa odgovarajućim sekvencama, upotrebljeni u studiji.....	33
Tabela 3.	Uslovi qPCR ciklusa.....	34

LISTA SKRAĆENICA:

MĆ	- Matične ćelije
IPSCs	- Indukovane pluripotentne matične ćelije
DPSC	- Matične ćelije zubne pulpe
SHED	- Matične ćelije iz eksfoliranih mlečnih zuba
IDPC	- Nezrele matične ćelije zubne pulpe mlečnih zuba
PDLSC	- Matične ćelije periodontalnog ligamenta
SCAP	- Matične ćelije apikalne papile
DFPC	- Progenitorske ćelije zubnog folikula
BMMSCs	- Mezenhimalne matične ćelije koštane srži
MTA	- Mineralni trioksidni agregat
BMPs	- Koštani morfogenetski protein
OCN	- Osteokalcin
DMP-1	- Protein dentinskog matriksa 1
DSPP	- Dentinski sialofosfoprotein
ALP	- Alkalna fosfataza

ASA	- Acetilsalicilna kiselina
NSAIL	- Nesteroidni antiinflamatorni lekovi
COX	- Ciklooksigenaza
AMPK	- Adenozin monofosfatom aktivirana protein kinaza
ESC	- Embrionalne matične ćelije
ASC	- Postnatalne (Adultne) matične ćelije
MSC	- Mezenhimalne matične ćelije
CFU-F	- Kolonije fibroblasta
UCB	- Krv iz pupčane vrpce
BM	- Koštana srž
DSC	- Matične ćelije zuba
GFAP	- Protein glijalne fibrilarne kiseline
HA / TCP	- Hidroksi apatit/Tri kalcijum fosfat
PDL	- Periodontalni ligament
PLLA	- Porozna poli-L-mlečna kiselina
GSC	- Matične ćelije gingive
RER	- Grubi endoplazmatski retikulum
NLR	- NOD slični receptori
LTA	- Lipoteihoična kiselina
TGF	- Transformišući faktor rasta
FGF	- Fibroblastni faktor rasta
IGF-1	- Insulinu sličan faktor rasta 1
AMP/ATP	- Adenozin monofosfat/Adenozin trifosfat
PBS	- Puferirani fosfatni fiziološki rastvor
CM	- Kompletni medijum
FITC	- Fluoresceinizotiocijan
PE	- Fikoeritrin
RT-PCR	- Lančana reakcija polimeraze reverzne transkripcije
OM	- Osteogeni medijum
ARS	- Alizarin Red S

qPCR - Kvantitativni PCR

1. UVOD

Tkivni inženjering predstavlja osnovu jedne relativno nove grane medicine poznate pod nazivom regenerativna medicina i bazira se na stvaranju novih ćelija i tkiva, polazeći od različitih vrsta matičnih ćelija, uz eventualnu primenu specifičnih ćelijskih nosača, dobijenih od biokompatibilnih materijala. Regenerativna medicina se u svojim počecima oslanjala mahom na upotrebu matičnih ćelija iz krvi pupčanika – tzv. umbilikalne matične ćelije, jer se radi o mladim matičnim ćelijama, sa gotovo u potpunosti očuvanim visokim potencijalom proliferacije i diferencijacije, bez tragova prethodno preležanih bolesti, vakcinacija, itd. Pored njih, takođe se koriste i matične ćelije izolovane iz koštane srži - hBMMSc, zbog njihovog izuzetnog potencijala diferencijacije i proliferacije. Međutim, ispitivanja različitih vrsta izvora matičnih ćelija pokazala su da su prisutne znatne varijacije između adultnih tkiva kako u odnosu na broj ćelija koje se iz njih mogu izolovati i na njihovu potentnost, ali isto tako i u odnosu na dostupnost ćelija, tj. invazivnost metoda dobijanja ćelija, itd. (Carlos Estrela et al., 2011).

Zbog gore pomenutog, sve više su u fokusu, kao potencijalni izvori matičnih ćelija, tkiva koja se odbacuju nakon medicinskih procedura i do kojih se sa relativnom lakoćom može doći, bez ugrožavanja zdravlja donora a za čije korišćenje praktično ne postoje prepreke etičkog karaktera.

Imajući ovo u vidu, matične ćelije dobijene iz dentalnih tkiva postaju sve privlačniji biološki materijal, pristupačan, kako za naučna istraživanja tako i za svakodnevnu primenu u terapijske svrhe. Izolovan je do sada veći broj tipova matičnih ćelija iz dentalnih i oralnih tkiva, kao što je ranije spomenuto - npr., iz eksfoliranih mlečnih zuba (engl. Stem Cells From Human Exfoliated Decidual Teeth, SHED), iz periodontalnog ligamenta (PDLSC), iz apikalne papile (SCAP), iz dentalnog folikula (DFPC), oralne mukoze, i, generalno, iz različitih tkiva usne duplje (Demarco F, et al., 2011). Međutim, matične ćelije dentalne pulpe ostaju najzanimljiviji i najistraživaniji materijal na polju regenerativne stomatologije.

Matične ćelije (MĆ) imaju sposobnost samoobnavljanja i diferencijacije u bilo koji tip zrelih ćelija. Ova sposobnost nije podjednako izražena u svim vrstama matičnih ćelija. Embrionalne matične ćelije mogu da se diferenciraju u sve vrste ćelija i tkiva dok se matične ćelije odraslog organizma mogu jedino diferencirati u one tipove ćelija prisutne u datom tkivu domaćina (Demarco F, et al., 2011).

Tokom života neminovno dolazi do gubitka zuba iz različitih razloga, kao što su bolesti, povrede, itd, što ih čini relativno pristupačnim za izolaciju različitih populacija matičnih ćelija zubnih tkiva. MĆ izolovane iz zuba mogu poslužiti, osim za obnovu i regeneraciju zuba i drugih intraoralnih tkiva, takođe i za lečenje sistemskih oboljenja.

U istraživanjima danas se uglavnom koriste adultne matične ćelije i indukovane pluripotentne matične ćelije (IPSC). Upotreba embrionalnih matičnih ćelija je ograničena etičkim pitanjima. Postnatalne matične ćelije su izolovane iz više različitih tkiva, kao što su koža, skeletni mišići, koštana srž, mozak, folikul dlake, zubno tkivo, itd. Iz zubne pulpe je do danas izolovano više različitih tipova matičnih ćelija - matične ćelije zubne pulpe (engl. Dental Pulp Stem Cells, DPSC). Takođe, izolovane su i matične ćelije iz eksfoliranih mlečnih zuba (engl. Stem Cells From Human Exfoliated Decidual Teeth, SHED), iz periodontalnog ligamenta (PDLSC), apikalne papile (SCAP), dentalnog folikula (DFPC) i drugih dentalnih tkiva (Demarco F, et al., 2011).

Na narednim stranicama biće opisani neki od najznačajnijih tipova matičnih ćelija.

1.1 Embrionalne matične ćelije (ESC)

ESC ćelije su matične ćelije izvedene iz unutrašnje ćelijske mase u ranoj fazi pre implantacije embriona, poznatoj kao blastocista (Evans and Kaufman, 1981). Iako su dokumentovane brojne razlike u vezi sa vrstama (npr. karakteristike rasta, vreme udvostručenja, markeri ćelijske površine, signalni putevi i uslovi kultivacije), sve ove ćelije su pluripotentne (Yamanaka et al., 2008). ESC iz miševa mogu generisati potpuno održive embrione, uključujući sve tipove ćelija. Ljudske ESC ćelije doprinose izgradnji sva tri zametna sloja u teratomima (benigni tumor koji tipično sadrži mešavinu mnogih diferenciranih ili delimično diferenciranih tipova ćelija), indukovanim kod miševa (Nussbaum et al., 2007). ESC ćelijske linije imaju skoro neograničeni kapacitet za proliferaciju i razmnožavanje, in vitro. Shodno tome, ove pluripotentne matične ćelije su u stanju da generišu sve druge multipotentne i unipotentne matične ćelije pronađene u embrionu (Vobus and Boheler, 2005). ESC ćelije imaju visok neoplastični potencijal i pokazuju mnoge karakteristike tipične za ćelije raka (Burdonet al., 1999), uključujući neograničeni proliferativni kapacitet (Suda et al., 1987), stvaranje klonova, gubitak kontaktne inhibicije, itd. (Mona Abd-Elmotelb, 2012).

1.2 Postnatalne (adultne) matične ćelije (ASC)

Sa nastavkom razvoja, osim zametnih ćelija, pluripotentne embrionalne matične ćelije nestaju. U odraslom organizmu, iako je većina ćelija formirana, većina tkiva sadrži malu subpopulaciju ćelija, poznatu kao odrasle matične ćelije (ASC), sa urođenom sposobnošću da održavaju skup matičnih ćelija samoreplikacijom i generisanjem progenitorskih ćelija, kroz diferencijaciju, duž višestrukih linija (Veissman, 2000). Takve ćelije obično ostaju mirne unutar tkiva odraslih; međutim, mogu reagovati na povredu tkiva i igraju integralnu ulogu u procesima reparacije (Fuchs et al., 2004). Štaviše, njihov veliki potencijal za širenje „in vitro“ i imunomodulatorna svojstva mezenhimskih ćelija čine ih od velikog interesa za naučnu zajednicu (Leeb et al., 2010), (Mona Abd-Elmotelb, 2012).

1.3 Mezenhimalne matične ćelije (MSC)

Mezenhimalne matične ćelije (MSC) čine subpopulaciju ASC koja se nalazi u koštanoj srži (He et al.), zajedno sa hematopoetskim matičnim ćelijama (Mona Abd-Elmotelb, 2012). Od otkrića i karakterizacije multipotentnih mezenhimskih matičnih ćelija (MSC) iz koštane srži (BM), populacije slične MSC iz drugih tkiva opisane su na osnovu utvrđenih kriterijuma „zlatnog standarda“ za BMMSC (Friedenstein et al., 1976; Caplan, 1991; Prockop, 1997; Pittenger et al., 1999; Gronthos et al., 2003). Od toga, populacije slične MSC-u iz masnog tkiva, i krvi iz pupčane vrpce, najviše obećavaju kao alternativni multipotentni izvori MSC-a (Mareschi et al., 2001; Zuk et al., 2001). Ove MSC mogu da stvore najmanje 3 ćelijske loze: osteogenu, hondrogenu i adipogenu. Druge loze, poput miogenih, neurogenih itd, takođe mogu biti izvedene iz BMMSC -a. Potraga za ćelijama sličnim MSC-u u specifičnim tkivima dovela je

do otkrića raznih matičnih ćelija u svakom organu i tkivu u telu, u proteklim decenijama (Baksh et al., 2004; Porada et al., 2006; Kolf et al., 2007), (G.T.-J. Huang et al.,2009).

Mezenhimalne matične ćelije dobijene iz koštane srži opisane su kao kolonije fibroblasta (CFU-F) „in vitro“, sposobne za osteogenu diferencijaciju (Cohnheim, 1867; Friedenstein et al., 1976). Njihov kapacitet da formiraju klonogene kolonije karakterističan je i za druge somatske matične ćelije, kao što su hematopoetske matične ćelije, i definiše njihovu sposobnost samoobnavljanja. Međutim, BMMSCs su ograničene na potencijal rasta od 30 do približno 50 udvostručenja populacije (PDs) nakon „ex vivo“ ekspanzije (Bruder et al., 1997; Bianco et al., 2001). Morfološki, BMMSCs su heterogena populacija ćelija (Colter et al., 2000). Osim toga, ove ćelije sadrže mešovite populacije ćelija u smislu stadijuma ćelijske nezrelosti, duž puteva ćelijske diferencijacije (Gronthos et al., 1999; Stevart et al., 1999). U novije vreme, različiti ćelijski površinski markeri su korišćeni u pokušajima da se identifikuju navodne MSC. Najčešće korišćeni markeri su STRO-1, CD73, CD90, CD105, CD146, Oct4, Nanog, beta2 integrin pozitivan, i CD14, CD34, CD45 i HLA-DR negativne ekspresije (Gronthos et al., 2003; Shi and Gronthos, 2003; Miura et al., 2005; Dominici et al., 2006; Battula et al., 2007; Greco et al., 2007; Gronthos and Zannettino, 2008). BMMSCs se mogu diferencirati u više ćelijskih loza kada se uzgajaju u definisanim uslovima „in vitro“, uključujući osteogenu, hondrogenu, adipogenu, miogenu i neurogenu lozu. Brojna klinička ispitivanja sa raznim metodama implantacije ljudskih matičnih ćelija u srce su dala različite nivoe uspeha (Segers and Lee, 2008). Prijavljena klinička ispitivanja sa BMMSCs su ograničena, ali ipak, intrakoronarna transplantacija autolognih BMMSCs za ishemijsku kardiomiopatiju je pokazala obećavajuće rezultate (Chen et al., 2006a). Kod glodara, pokazalo se da se BMMSCs diferenciraju u astrocite i, u nekim slučajevima, neurone, nakon transplantacije u mozak miša (Kopen et al., 1999), ili da olakšavaju funkcionalni oporavak oštećenog mozga ili kičmene moždine kod pacova (Chen et al., 2001; Hofstetter et al., 2002). BMMSCs dobijene od pacova i ljudi se mogu „in vitro“ diferencirati u neurone (Voodburi et al., 2000), mada je neurogeni potencijal slabiji u poređenju sa matičnim ćelijama izvedenim iz nervnih tkiva (Raedt et al., 2007; Song et al., 2007), (G.T.-J. Huang, S. Gronthos i S. Shi, 2009).

MSC iz masnog tkiva, dobijene usisnom lipektomijom (liposukcija), (Zuk et al., 2001; Mizuno et al., 2002) i MSC-u slične populacije iz krvi pupčane vrpce (UCB), su takođe izolovane (Mareschi et al., 2001). MSC iz BM, masnog tkiva i krvi pupčanika su morfološki i imunofenotipski slične, ali nisu identične (Kern et al., 2006). MSC izvedene iz UCB-a prave najmanje kolonija i pokazuju najveći proliferativni potencijal, dok MSC iz masnog tkiva stvaraju najveći broj kolonija. BMMSC imaju najmanji proliferativni kapacitet. MSC iz masnog tkiva i posebno UCB (Ballen et al., 2008) mogu imati veću upotrebljivost, jer su ova tkiva lako dostupna i poseduju veliki potencijal za mnoge kliničke primene (G.T.-J. Huang, S. Gronthos and S. Shi, 2009).

1.4 Indukovane Pluripotentne Matične Čelije (IPSCs)

Tokom 2006. godine otkriveno je da se matične ćelije mogu generisati iz odraslih somatskih ćelija kroz proces ćelijskog reprogramiranja (Takahashi i Yamanaka, 2006). Generisane matične ćelije ovom novom tehnologijom nazvali su indukovane pluripotentne matične ćelije (IPSCs). Od njihovog otkrića, postoji značajno interesovanje za IPSC, jer ova tehnologija olakšava generisanje odraslih ljudskih pluripotentnih matičnih ćelija, bez potrebe za ljudskim embrionima, čime se zaobilazi niz etičkih i pravnih pitanja koja prate istraživanja embrionalnih matičnih ćelija (Takahashi i Yamanaka, 2006; Maherali et al., 2007; Okita et al., 2007; Takahashi et al., 2007; Vernig et al., 2007). Izgleda da IPSC imaju niz prednosti u odnosu na dentalne matične ćelije, kao što su one dobijene iz periodontalnog ligamenta (PDL) i zubne pulpe. Konkretno, IPSCs mogu biti generisane iz lako dostupnih izvora - tkiva, uključujući oralnu sluzokožu (Miioshi et al., 2010) i gingivalno tkivo (Egusa et al., 2010). Što je još važnije, IPSC su veoma proliferativne, što omogućava dobijanje velikog broja matičnih ćelija koje bi bile potrebne za korišćenje u regenerativnoj terapiji.

Međutim, pre upotrebe IPSCs u glavnim procedurama u stomatologiji potrebno je razmotriti neke vazne činjenice. Glavni nedostaci IPSC-a uključuju njihovu genomsku nestabilnost i njihovu sklonost da formiraju tumore, „in vivo“ (Ben-David and Benvenisti 2011; Gore et al., 2011). Korišćenje virusno integrisanih vektora u generisanju IPSCs je faktor koji doprinosi genomskoj nestabilnosti i tumorigenom potencijalu IPSCs. Međutim, tumorigeni potencijal IPSCs može se smanjiti diferenciranjem IPSCs u linijski specifične progenitorske ćelije ili zrele populacije ćelija, pre njihove upotrebe u regenerativnim terapijama (K. Hynes, et al., 2015).

Uzimajući u obzir ogroman potencijal IPSC u stomatološkim istraživanjima i potencijalne koristi korišćenja dentalnih IPSC, mnogi istraživači su reprogramirali populacije ćelija dobijene iz zubnih tkiva u pluripotentne matične ćelije. Da bi se smanjio ili potpuno uklonio tumorigeni potencijal IPSCs, pre kliničke upotrebe, pristupa se njihovoj diferencijaciji. Najčešće se sprovode dva diferencijacijska pristupa koji su posebno relevantni za stomatologiju - diferencijacija IPSC-a u MSC i diferencijacija IPSC-a u osteoprogenitorske ćelije (K. Hynes, et al., 2015).

1.5 Matične ćelije zuba (DSC)

Matične ćelije se iz zuba mogu dobiti relativno jednostavnim procedurama. Pristupačnost zuba zaobilazi potrebu za većom operacijom, a prirodno izgubljeni ili hirurški uklonjeni zubi dobar su izbor za izolaciju matičnih ćelija. Štaviše, bolesti zuba su široko rasprostranjen javno-zdravstveni problem, neretko povezan i sa srčanim oboljenjima (De Stefano et al., 1993) kao i dijabetesom (Lamster et al., 2008). Osim što se koriste za popravku, obnovu i regeneraciju zuba, ovako dobijene matične ćelije mogu se koristiti i za razvoj terapija zasnovanih na matičnim ćelijama, za bolesti koje ugrožavaju život (Yvonne Wai Yee Pang, 2015).

1.5.1 Matične ćelije periodontalnog ligamenta (PDLSC)

Periodontalni ligament (PDL) je specijalizovano vezivno tkivo koje povezuje površinu korena zuba sa alveolarnom kosti (48). PDL ima heterogenu populaciju ćelija koja se može diferencirati u ćelije cementa ili kosti (5). Matične ćelije periodontalnog ligamenta (PDLSc) su sposobne za samoobnavljanje i ekspresiju markera mezenhimalnih matičnih ćelija CD146 / MUC18, CD105, CD166 i STRO-1 (17). PDLSc ćelije takođe izražavaju tetivne specifične markere (40). Ovo ukazuje na to da su PDLSc jedinstvena populacija postnatalnih matičnih ćelija, različite od DPSCs ili mezenhimalnih MČ, dobijenih iz koštane srži. Slično sa matičnim ćelijama poreklom iz pulpe, PDLSc su multipotentne ćelije sa visokim potencijalom za osteogenu, adipogenu i hondrogenu diferencijaciju (40). PDL sazreva tokom izbijanja zuba, pripremajući se za podršku funkciji zuba za okluzalno opterećenje. U zreлом PDL-u, glavni snopovi kolagena (glavna vlakna), zauzimaju celinu PDL-a i ugrađeni su u cement i alveolarnu kost. Vlakna su raspoređena u određenim pravcima, kako bi se povećalo apsorbovanje sila koje se javljaju tokom žvakanja. Odavno je poznato da PDL sadrži populaciju progenitorskih ćelija a odnedavno i da sadrži populaciju matičnih ćelija, sposobnih za diferencijaciju duž mezenhimalnih ćelijskih linija, te produkciju cementoblastima sličnih ćelija, adipocita i vezivnog tkiva bogatog kolagenom (14), (Carlos Estrela et al., 2011).

PDL matične ćelije (PDLSC) pokazuju površinske ćelijske markere koji su po karakteristikama i potencijalu diferencijacije slične matičnim ćelijama koštane srži i DPSC (14). Kada se transplantiraju sa HA/TCP u imunodeficientne miševе, PDLSC proizvode strukturu sličnu cementu /PDL i doprinose popravci periodontalnog tkiva (17), (Demarco F, et al., 2011),(Carlos Estrela et al., 2011).

Pod istim uslovima nadjeno je da matične ćelije periodontalnog ligamenta stvaraju veću količinu fibroblasta od one opisane kod matičnih ćelija koštane srži i zubne pulpe. Nivo ekspresije sklerizacije kod matičnih ćelija periodontalnog ligamenta veći je nego kod matičnih ćelija koštane srži i matičnih ćelija zubne pulpe, što sugerise da matične ćelije periodontalnog ligamenta pokazuju jedinstvena svojstva u poređenju sa drugim mezenhimalnim matičnim ćelijama (59, 141), (Kim Hynes et al., 2012).

Transplantacija matičnih ćelija periodontalnog ligamenta umnoženih „ex vivo“ u imunokompromitovane miševе potvrdila je sposobnost ovih ćelija da formiraju funkcionalne, cementoblastima slične ćelije i cementu/periodontalnom ligamentu slična tkiva, uključujući Šarpejeva vlakna, "in vivo" (59, 141), (Kim Hynes et al., 2012).

Sprovedena su značajna istraživanja da bi se procenio regenerativni kapacitet matičnih ćelija periodontalnog ligamenta u zbrinjavanju zubnih defekata, u različitim životinjskim modelima i u jednoj kliničkoj studiji. U toj kliničkoj studiji, potencijal progenitorskih ćelija periodontalnog ligamenta proučavan je na koštanim defektima kod tri pacijenta (48). U ovoj studiji dva od tri pacijenta su imala primetnu regeneraciju tkiva. Treći pacijent imao je smanjenu mobilnost zuba i dubinu džepa, smanjenu gingivalnu recesiju i stabilno poboljšanje pripoja (48). Ovo istraživanje je zaključilo da PDLSC korišćene u hirurškim tretmanima periodontitisa mogu biti efikasne u regenerativnoj stomatologiji. Generalno, pokazano je da matične ćelije periodontalnog ligamenta imaju potencijal da formiraju kost, cement i periodontalnom ligamentu slične strukture i da poboljšaju opštu parodontalnu regeneraciju. Za sada, izgleda da matične ćelije periodontalnog

ligamenta imaju veći kapacitet za generisanje zubnih struktura u poređenju sa drugim ćelijama sličnim mezenhimalnim matičnim ćelijama, što ih čini izuzetno prihvatljivim za upotrebu u regeneraciji parodonticijuma (Kim Hynes et al., 2012).

1.5.2 Matične ćelije apikalne papile (SCAP)

MĆ su otkrivene i u vrhu korena zuba. Ove ćelije se nazivaju Matičnim ćelijama apikalne papile (SCAP) i dokazano je da se diferenciraju i pokazuju veću stopu proliferacije „in vitro“ nego DPSC. Između apikalne papile i pulpe nalazi se zona bogata ćelijama. Treba naglasiti da su matične/progenitorske ćelije nadjene i u zubnoj pulpi i apikalnoj papili, ali sa različitim karakteristikama (12). Viši proliferativni potencijal SCAP-a čini ovu populaciju ćelija pogodnijom za regeneraciju baziranu na ćelijama i dominantno, za formiranje korena. One su sposobne da formiraju odontoblastima slične ćelije i produkuju dentin „in vivo“ i verovatno su izvor ćelija primarnih odontoblasta, za formiranje dentina korena (12). Otkriće SCAP-a može takođe objasniti kliničku pojavu koja je predstavljena u nekoliko nedavnih izveštaja kliničkih slučajeva, koji pokazuju da apeksogeneza može i dalje postojati kod zaraženih, nedovoljno zrelih, stalnih zuba sa apikalnim periodontitisom ili apscesom (28). Pretpostavlja se da SCAP iz apikalne papile prežive infekciju zbog njihove blizine periapikalnim tkivima. Možda, posle endodontske dezinfekcije, ove ćelije mogu dovesti do stvaranja primarnih odontoblasta, da bi se kompletiralo formiranje korena (Carlos Estrela et al., 2011).

SCAP su jedinstvena populacija multipotentnih MĆ jer one izražavaju visok nivo ekspresije dva gena uključena u medijaciji ćelijske proliferacije: survivina i telomerase (147), (Kim Hynes et al., 2012).

Matične ćelije iz apikalne papile transplantirane u imunokompromitovane miševe formirale su sloj dentinu sličnog tkivo na površini hidroksiapatita / trikalcijum fosfata, koji je korišćen kao nosač ćelija (147). Autori ovog rada sugerišu da je dentin proizveden „in vivo“ formiran od odontoblastima sličnih ćelija koje su se diferencirale od ćelija sličnih mezenhimalnim matičnim ćelijama, prisutnih među matičnim ćelijama iz apikalne papile (147), (Kim Hynes et al.,2012).

1.5.3 Matične ćelije iz humanih eksfoliranih mlečnih zuba (SHED)

Otkrivanje MĆ u mlečnim zubima (Miura et al., 2003) baca novo svetlo na intrigantnu mogućnost korišćenja matičnih ćelija zubne pulpe u tkivnom inženjeringu (Murray i Garcia-Godoi, 2004; Sloan i Smith, 2007). Očigledne prednosti SHED-a su: veća stopa proliferacije u odnosu na MĆ stalnih zuba (Miura et al., 2003), lako se umnozavaju "in vitro", visoka plastičnost dok se ne diferenciraju u neurone, adipocite, osteoblaste i odontoblaste, laka dostupnost u mladim pacijenata (Miura et al., 2003), naročito pogodna za mlade pacijente sa mešovitom denticijom (Nor, 2006). Miura je pokazao da SHEDs ne mogu direktno da se diferenciraju u osteoblaste, već su indukovale stvaranje nove kosti regrutovanjem osteogenih ćelija domaćina (Miura et al., 2003). SHEDs su karakteristične po osteoindukcijskoj sposobnosti i visokoj plastičnosti. Cordeiro je sa saradnicima zasejao SHEDs u PLLA (porozna poli-L-

mlečna kiselina), pripremljene sa skafoldom – nosačem i transplantirao ih u potkožno tkivo imunodeficientnih miševa. Primetio je da se SHEDs diferenciraju u ćelije slične odontoblastima i pokazuju morfološke karakteristike slične onima kod odontoblastnih ćelija. Takođe su potvrdili da su presađeni SHEDs bili sposobni da se diferenciraju u krvne sudove koji su anastomozirali sa vaskulaturom domaćina (Cordeiro et al., 2008). Ove studije su pokazale da SHEDs mogu biti dobar izvor MĆ za popravku oštećenih zuba i izazvati regeneraciju kosti (Li Peng, Ling Ye, Xue-dong Zhou, 2009).

Izolacija i karakterizacija „in vitro“ SHED je ostvarena iz koronarne pulpe mlečnih zuba. U uslovima „in vitro“, SHEDs su multipotentne MĆ, sposobne da se diferenciraju u niz mezenhimalnih i ne-mezenhimalnih ćelijskih vrsta, uključujući nervne ćelije, adipocite, hondroците i odontoblaste (31, 108, 139, 142, 166). In vivo, SHED imaju sposobnost da izazovu stvaranje kosti, generišu dentin, zubno pulpno tkivo i ispoljavaju markere neurogene diferencijacije (31, 108, 139), (Kim Hynes et al., 2012).

Malo je objavljenih publikacija implantacije matičnih ćelija iz humanih mlečnih zuba u parodontalne defekte. Međutim, korišćene su za regeneraciju tkiva zubne pulpe kada se implantiraju unutar humanih zuba smeštenih u imunodeficientne miševе (31). Neke studije (Zheng i sar.), su pokazale da se implantirane matične ćelije direktno diferenciraju u novu kost, što rezultira značajno višim formiranjem nove kosti na mestu defekta (181). Zajedno, ove studije pružaju sigurne dokaze da matične ćelije iz humanih mlečnih zuba mogu služiti kao alternativni izvor matičnih ćelija, za tretmane bazirane na matičnim ćelijama, u vezi periodontalne regeneracije (Kim Hynes et al., 2012).

1.5.4 Matične ćelije zubnog folikula (DFPC)

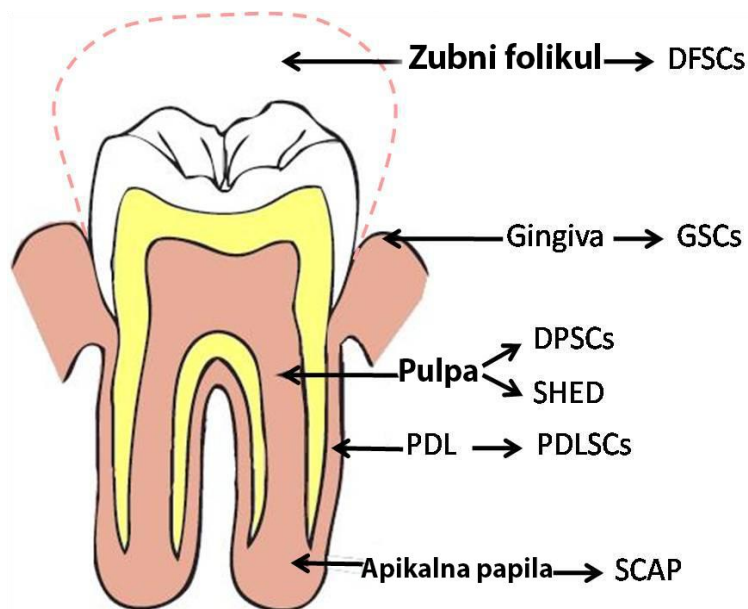
Zubni folikul je labavo vezivno tkivo ektodermalnog porekla, koje okružuje zubnu klicu u razvoju, pre erupcije. Smatra se da zubni folikul sadrži progenitore za cementoblaste, ćelije periodontalnog ligamenta i osteoblaste. Matične ćelije humanih zubnih folikula se najčešće izoluju prilikom ekstrakcije impaktiranih trećih molara (112). Matične ćelije izolovane od humanih zubnih folikula karakteriše njihovo brzo vezivanje u kulturi i izražavanje markera tipičnih za matične ćelije - nestina i notch-1 (112) (Kim Hynes et al., 2012). Ove ćelije mogu ići u uslovima “in vitro“ u smeru adipogene, osteogene i neurogene diferencijacije. Matične ćelije zubnih folikula takođe mogu da formiraju kompaktne kalcifikovane nodule „in vitro“, što upućuje da se mogu diferencirati u cement (112). DFPC „in vivo“ imaju sposobnost da se diferenciraju u odontoblaste i doprinesu stvaranju dentina u prisustvu skafolda - nosača (61, 62, 86, 96). One takođe imaju kapacitet za stvaranje periodontalnog ligamenta „in vivo“ (175), (Kim Hynes, et al., 2012).

Guo i sar. (61) su koristili matične ćelije zubnog folikula za procenu sposobnosti takvih ćelija da doprinesu formiranju korena zuba. Oni su implantirali matične ćelije zubnog folikula u tri različita mikrookruženja, kod pacova: nemineralizovani omentalni džep, visoko mineralizovanu lobanju i indukovanu alveolarnu čašicu (61). Studije su pokazale da mikrookruženje u koje se implantiraju matične ćelije utiče na kapacitet ovih ćelija u formiranju različitih tkiva. Još

interesantnije, ovi rezultati takođe pokazuju potencijal koji matične ćelije zubnih folikula imaju u regeneraciji korena zuba (61), (Kim Hynes, et al., 2012).

1.5.5 Matične ćelije gingive (GSC)

Među najvažnijim elementima parodontijuma je gingivalno tkivo, koje je pokazalo izvanrednu sposobnost zarastanja rana i regeneracije. Od dva tipa tkiva izolovanih iz gingive, populacija fibroblasta je heterogena mešavina ćelija koje doprinose procesu zarastanja rana, reagujući na različite faktore rasta i lučeći određene proteine ekstra ćelijskog matriksa, dok oralni epitel pokazuje izvanredna svojstva regeneracije. Progenitorske ćelije i multipotentne MSC, subpopulacije su izolovane iz gingivalnih fibroblasta (Fournier et al., 2010; Hsu et al., 2012; Mitrano et al., 2010). Jednostavna izolacija gingivalnih fibroblasta čini ih vrlo praktičnim izvorom zubnih matičnih ćelija, a takođe su i nedavno reprogramirani u iPSC ćelijske linije (Wada et al., 2011). Na **Slici 1.** dat je prikaz izvora dentalnih matičnih ćelija (Yvonne Wai Yee Pang, 2015).



Slika 1. Šematski prikaz izvora dentalnih matičnih ćelija. Pulpa: DPSCs - Matične ćelije zubne pulpe; SHED - Matične ćelije iz zubne pulpe eksfoliranih mlečnih zuba. PDL - Periodontalni ligament: PDLSCs - Matične ćelije iz periodontalnog ligamenta. Apikalna papila: SCAP - Matične ćelije iz apikalne papile. Zubni folikul: DFSCs - Matične ćelije zubnog folikula. Gingiva: GSCs - Matične ćelije gingive (prilagođeno (Huang, 2009)).

1.5.6 Matične ćelije zubne pulpe (DPSCs)

DPSCs su ektomezenhimalnog porekla i uglavnom se nalaze u perivaskularnoj niši. Lako se izoluju, imaju visok proliferativni i klonogeni potencijal, multipotentne su i slične matičnim ćelijama koštane srži (BMMSC), (Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, et al., 2006, d'Aquino R, Papaccio G, Laino G, Graziano A., 2008, Perry BC, Zhou D, Wu X, et al., 2008). Dokazano je da ove ćelije ispoljavaju visoku ekspresiju gena alkalne fosfataze, proteina 1 matriksa dentina, i dentin-sijalofosfoproteina kao i gena koji kodiraju sintezu komponenti ekstracelularnog matriksa, faktora rasta i transkripcionih faktora, te molekula ćelijske adhezije (Shi S, Gronthos S., 2003, d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, et al., 2007). „*In vitro*“, ove ćelije mogu da se diferenciraju u pravcu osteoblasta, odontoblasta, endotelnih ćelija i melanocita, glatkih i skeletnih mišićnih ćelija, hondrocita, adipocita, itd., (Das S, Bellare JR., 2018, Yamada Y, Nakamura-Yamada S, Kusano K, Baba S., 2019). Pored toga, matične ćelije zubne pulpe ispoljavaju i anti-inflamatorno i imuno-modulatorno dejstvo, zato što imaju sposobnost inhibicije proliferacije T limfocita kao i antioksidativni efekat (Ullah I, Choe YH, Khan M, et al., 2018).

Ove ćelije imaju sposobnost reagovanja na oštećenja zubne pulpe, uzrokovana karijesnim lezijama, traumama, kao što je, npr., preparacija kaviteta, itd. Regenerativni potencijal zubne pulpe manifestuje se formiranjem reparativnog, tercijarnog dentina. Nakon direktnog zatvaranja pulpe materijalima kao što su kalcijum hidroksid i mineralni trioksidni agregat (MTA) dolazi do inicijalne inflamatorne reakcije, praćene stvaranjem tercijarnog dentina. Tokom procesa stvaranja reparativnog dentina, originalni odontoblasti bivaju uništeni i zamenjuju se novim, diferenciranim ćelijama, poreklom od MĆ, koje na mestu oštećenja naknadno proliferišu i diferenciraju se u odontoblastima slične ćelije. Gronthos i sar. (2000) su prvi identifikovali MĆ iz zubne pulpe odraslih ljudi. Ovu populaciju MĆ iz stalnih trećih molara karakteriše velika proliferativnost i sposobnost stvaranja kolonija. Takođe, pokazano je da transplantacijom ovih ćelija „*in vivo*“ u imunokompromitovane miševe dolazi do stvaranja funkcionalnog zubnog tkiva, u obliku kompleksa sastavljenog od dentina i pulpe (Gronthos S, et al., 2000). Mora se naglasiti da uloga progenitorskih ćelija, uključenih u reparativnu dentinogenezu i dalje nije do kraja razjašnjena. Postoji nekoliko populacija pulpnih ćelija iz kojih mogu nastati odontoblasti, uključeni u reparativnu dentinogenezu. Jedna od njih je i Hohl-ov sloj bogat ćelijama, koji pored odontoblasta sadrži i nediferencirane mezenhimalne ćelije koje mogu biti jedan od izvora prekursora odontoblastnih ćelija. Takođe, i perivaskularne ćelije (periciti) i fibroblasti poseduju osobine slične matičnim ćelijama i mogu biti izvor ćelija iz kojih se formiraju novi odontoblasti (Vidovic-Zdrilic I et al., 2018).

Treba naglasiti da ni signalni putevi uključeni u regrutovanje i diferencijaciju ovih ćelija nisu do kraja razjašnjeni. Nakon jakih stimulusa, kao što su karijesno oštećenje ili mehanička trauma, dolazi do regrutovanja i diferencijacije ćelija progenitora, koja uključuje delovanje koštanih morfogenetskih proteina (BMPs), oslobođenih nakon odontoblastne apoptoze. Nakon invazije mikroorganizama dolazi do infiltracije inflamatornih ćelija (T-limfociti, makrofagi, dendritske ćelije, neutrofili i B-limfociti) na mesto oštećenja tkiva (Goldberg M, et al., 2008). Ove ćelije oslobađaju citokine i faktore rasta, koji će dalje usložniti signalne mehanizme. Odontoblasti će osloboditi molekule kao što su osteokalcin (OCN), protein dentinskog matriksa 1 (DMP-1) i dentinski sialofosfoprotein (DSPP), koji se smatraju biološkim markerima diferencijacije MĆ u

odontoblaste. I aktivnost alkalne fosfataze (ALP) se smatra ranim markerom diferencijacije MC u odontoblaste i ima značajnu ulogu u formiranju dentina (Song Z, Chen L, Guo J, et al., 2017).

Neka jedinjenja koja se koriste u stomatologiji, kao što su kalcijum hidroksid, natrijum hipohlorit i mineralni trioksidni agregat (MTA), dovode do oslobađanja bioaktivnih molekula iz dentina (dentin sialoprotein, dentin fosfoprotein, protein-1 dentinskog matriksa i dr). Ovi molekuli, u različitim koncentracijama, dovode do diferencijacije, angiogeneze i apoptoze (Goldberg M, et al., 2008).

DPSC izolovane enzimskim tretmanom pulpe formiraju CFU-Fs sa različitim karakteristikama (Gronthos et al., 2000; Huang et al., 2006). Postoje različite gustine ćelijskih kolonija, što sugerise da svaki ćelijski klon može imati različite stope rasta, kao što je slučaj i sa BMMSC (Gronthos et al., 2002). U okviru iste kolonije, primećene su različite ćelijske morfologije i veličine. Ako su zasejane na dentinu, neke DPSC se pretvaraju u odontoblastima slične ćelije, sa polarizovanim ćelijskim telom i ćelijskim nastavcima produženim u postojeće dentinske tubule (Huang et al., 2006), (G.T.-J. Huang et al., 2009).

Pored dentinogenog potencijala, subpopulacije hDPSC takođe poseduju adipogeni i neurogeni potencijal diferencijacije, stvarajući adipocitima i neuronima slične ćelije, sa odgovarajućom ekspresijom genskih markera (Gronthos et al., 2002). Otkrivene su i DPSC osteogene, hondrogene i miogene diferencijacije „*in vitro*“ (sažeto u **Tabeli 1**) (Laino et al., 2005; Zhang et al., 2006; dAkuino et al., 2007), (G.T.-J. Huang et al., 2009).

Tabela 1. Potencijal diferencijacije humanih dentalnih matičnih ćelija

Tip Ćelija	In vitro Analiza		In vivo Analiza	
	PD*	Multipotentnost	Formiranje ektopičnog tkiva	
DPSCs	60 - > 120	Osteo/Dentinogeni	+	Dentin-pulpa-sličan-kompleks
		Adipogeni	+	Odontoblastima-slične-ćelije
		Hondrogeni	+	Koštanom-slično-tkivo
		Miogeni	+	
		Neurogeni	+	
SHED	> 140	Dentinogeni	+	Dentin-pulpa-slično- tkivo
		Adipogeni	+	Odontoblastima-slične-ćelije
		Hondrogeni	+	Ne formira dentin-pulpa kompleks
		Miogeni	+	Formiranje kostiju
		Neurogeni	+	
		Osteo-induktivni	+	
SCAP	> 70	Dentinogeni	+	Dentin-pulpa-sličan kompleks
		Adipogeni	+	Odontoblastima-slične ćelije
		Hondrogeni	ND	
		Miogeni	ND	
		Neurogeni	+	
PDLSCs	ND	Osteo/Cementogeni	+	Cementu-slične formacije
		Adipogeni	+	PDL-slične formacije
		Hondrogeni	+	
		Miogeni	ND	
		Neurogeni	+	
DFPCs	ND	Cementogeni	+	PDL- slične formacije
		Odontogeni	+	Formiranje cementnog matriksa
		Adipogeni-Hondrogeni	+	

BMMSCs	30 - > 50	Miogeni	+	BMMSCs su pokazale formiranje i ektopičnog i ortotopičnog tkiva. Formiranje koštanog i koštanoj srži hrskavici, mišićnom i nervnim ćelijama/ sličnom tkivu.
		Neurogeni	ND	
		Odontogeni	-	
		Osteogeni	+	
		Adipogeni – Hondrogeni	+	
		Miogeni	+	
		Neurogeni	+	

* PD, Dupliranje populacije; ND, Nije utvrđeno; +, Posедуje potencijal.

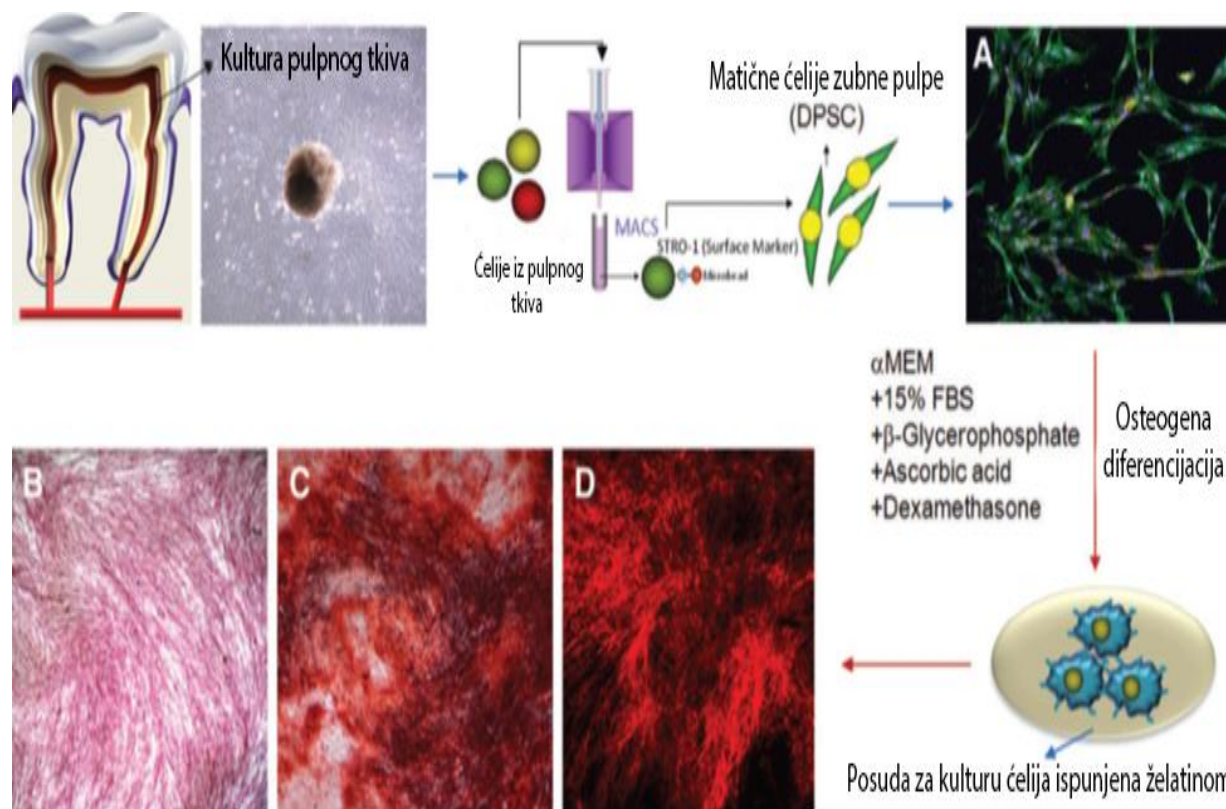
Zubna pulpa poseduje sposobnost regeneracije i reparacije nastalih oštećenja, uzrokovanih karijesom, traumom, itd. (About et al., 2000; Robertson et al., 1997; Smith et al., 1995 ; Smith et al., 1994). Čini se da se populacija odontoblasta popunjava od populacija ćelija progenitora, koje se nalaze u dubljoj pulpi. Ove ćelije su sposobne za samoobnavljanje i mogu migrirati nakon štetnih nadražaja i diferencirati se u odontoblaste (Fitzgerald et al., 1990; Smith i Lesot, 2001). Kada je zubno tkivo umereno oštećeno, tercijarni dentin koji luče odontoblasti se reaktivira. S druge strane, tokom duboke preparacije, odontoblastni sloj je uništen što dovodi do dolaska pericita ili mezenhimalnih ćelija u zubnu pulpu. Ove ćelije pokazuju odontoblastna svojstva i mogu zameniti nekrotične odontoblaste i izlučiti reparativni dentin (Smith et al., 1995; Tziafas, 1995).

DPSC su takođe sposobne da se diferenciraju u adipocite, kao i u osteoblaste i endotelioците (d'Akuino et al., 2007). Osim toga, uočena je diferencijacija u ćelije slične neuronima jer je otkriveno da izražavaju markere neuronskih prekursora i glijalnih ćelija, poput nestina i proteina glijalne fibrilarne kiseline (GFAP) (Vislet-Gendebien et al., 2003), (Yvonne Wai Yee Pang, 2015).

Istraživanje „*in vivo*“ pokazalo je da DPSC proizvode kost kada su implantirane na subkutane lokacije u imunokompromitovanim miševima sa HA/TCP prahom, kao nosačem. Pored toga, analiziran je potencijal DPSC-a za dugotrajno skladištenje. Otkriveno je da i čak nakon skladištenja od 2 godine, DPSC su i dalje bile sposobne da se diferenciraju u pre-osteoblaste i proizvode koštano tkivo. Osim toga, DPSC su i dalje izražavale određene površinske antigene, potvrđujući ćelijski integritet (Papaccio i sar., 2006, Otaki i sar., 2007), (Li Peng et al., 2009).

Nekoliko „*in vitro*“ i „*in vivo*“ studija dokazalo je osteogeni potencijal DPSC-a. Izražena ekspresija alkalne fosfataze i formiranje mineralizovanih nodula takodje može biti izazvana

tokom osteogene diferencijacije izolovanih STRO-1* DPSCs (**Slika 2**), (Byung-Chul Kim et al., 2012).



Slika 2. *In vitro* osteogena diferencijacija DPSC. Matične ćelije su izolovane iz tkiva zubne pulpe pročišćavanjem STRO-1- pozitivne ćelijske populacije sa MACS sistemom i omogućeno je da se diferenciraju u osteogene linije kako bi formirale mineralizovane čvoriće pod pravilnim uslovima osteogene kulture. (A) Imunocitohistohemijska slika izolovanih DPSC: Stro-1 (zeleni), CD44 (crveno), i nuklearno bojenje (DAPI, plavo). (B) Fenotipska ekspresija alkalne fosfataze posle 21 dana osteogene kulture. (C) Alizarin crveno-S-obojena slika mineralizovanih nodula nakon 21 dana osteogene kulture pod svetlosnim mikroskopom. (D) Alizarin crveno-S-obojena slika mineraliziranih nodula nakon 21 dana osteogene kulture pod fluorescentnim mikroskopom.

2. ODONTOBLASTI

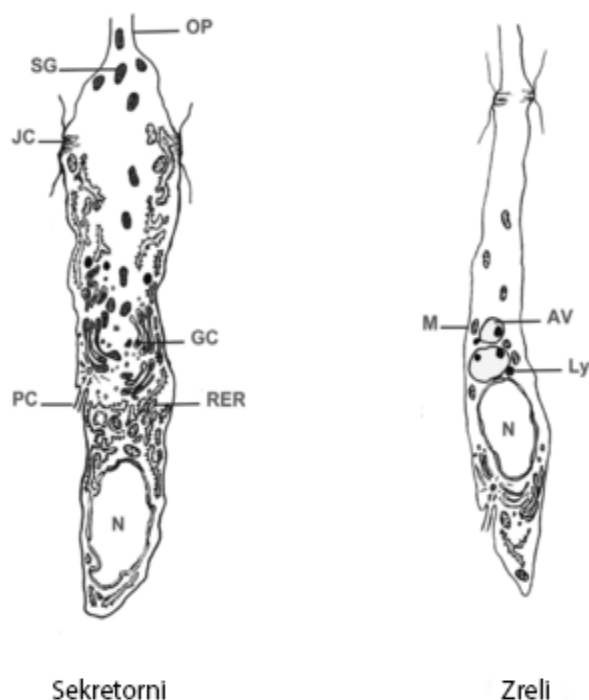
2.1 Građa i funkcija odontoblasta

Odontoblasti su velike ćelije, vretenastog oblika, koje se nalaze po obodu zubne pulpe. Ove ćelije funkcionišu u smislu unutar-ćelijske akumulacije kalcijuma i lučenju dentina, kao i u održavanju tkivne homeostaze (Linde i Goldberg, 1993). Poznato je da se morfologija ovih ćelija razlikuje u zavisnosti od njihovog stepena zrelosti (**Slika 3**) i lokacije ovih ćelija u odontogenom sloju, jer su odontoblasti koji se nalaze u blizini krune veći od onih koji se nalaze u blizini korena zuba (Simon et al, 2009). Nezreli odontoblasti su relativno male ćelije koje sadrže ograničenu citoplazmu i nedovoljno razvijen RER i Goldžijev kompleks. Kako ove ćelije počinju sazrevati i postaju sekretorne, razvijaju se granulirani endoplazmatski retikulum (GER), Goldžijev aparat, lizozomi i sekretorne vezikule i raste broj mitohondrija (Sasaki i Garant, 1996; Simon et al, 2009). Ove unutar-ćelijske organele potrebne su za stvaranje i lučenje organskog kolagenog matriksa koji formira pre-dentin, praćen taloženjem kalcijum fosfata, potrebnog za sazrevanje dentina. Odontoblasti leže na formativnoj površini dentina i kako se debljina ovog matriksa povećava, on prisiljava odontoblaste da se kreću unutar pulpe (Larmas, 2008). Kako se tkivo mineralizuje, preostali nastavci odontoblasta postaju okruženi mineralizovanom matricom, formirajući karakteristične tubule, povezane sa dentinom (Nino-Barrera et al, 2013). Kako ove ćelije postaju manje aktivne, postaju kuboidnije, sa manje citoplazme i smanjenim GER-om (Couve, 1986; Simon et al, 2009). Tokom sazrevanja, sekretorni aparat smanjuje se usled autofagnog delovanja, a preostale ćelijske organele se premeštaju u bazu ćelije i njihova se aktivnost smanjuje (Couve, 1986; Couve et al, 2013) (**Slika 3**), (Owen Davis, 2013).

Odontoblasti se odlikuju izduženim citoplazmatskim nastavkom koji se proteže od ćelijskog tela do dentinskih tubula. Smatra se da je tačna dužina nastavaka povezana sa starošću, sa dokazima koji ukazuju na to da nastavci dopiru do dentinske površine samo u ranim fazama razvoja (Biers i Sugaia, 1995). Ovi nastavci ne sadrže organele, već se sastoje od velike kolekcije strukturnih proteina kao što su aktin, vimentin i tubulin, kao i sekretornih vezikula (Sigal et al, 1985). Bočne grane se protežu od glavnog nastavka i smatra se da predstavljaju puteve za difuziju hranljivih materija i molekula matriksa, kao i da olakšavaju interakciju i komunikaciju ćelija-ćelija i ćelija-matriks (Arana-Chavez i Massa, 2004). Nastavci odontoblasta takođe olakšavaju kretanje kalcijuma u pre-dentin, tokom formiranja zrelog dentina (Linde, 1995). Štaviše, odontoblastni nastavci takođe deluju kao senzorni receptori, bilo direktno ili hidrodinamički, i u stanju su da detektuju promene u okruženju (Holland, 1985). Oko ovih izduženih ćelijskih nastavaka formira se matrica dentinskog matriksa, koja se na kraju mineralizuje i formira dentinske tubule (Owen Davis, 2013).

Odontoblasti takođe imaju odbrambenu ulogu i učestvuju u pokretanju upalne reakcije nakon patogene invazije dentinskih tubula (Couve et al, 2013). Zbog činjenice da odontoblasti pružaju svoje duge ćelijske nastavke kroz dentinski sloj, oni predstavljaju prve ćelije na koje nailaze mikroorganizmi koji su uspeli da prodru kroz zaštitnu gleđ i dentinske slojeve zuba (Cooper et al, 2010). Susedni odontoblasti povezani su međućelijskim spojevima koji stvaraju nepropusnu

barijeru, što je prva linija odbrane od patogene invazije pulpe (Holland, 1975). Sloj odontoblasta je usko povezan sa dendritičkim ćelijama i limfocitima, za koje se smatra da osećaju i reaguju na infiltraciju izloženih dentinskih tubula (Ohshima et al, 1995). Odontoblasti na svojim ćelijskim površinama ekspimiraju receptore (TLR), koji prepoznaju bakterije, te reaguju proizvodnjom citokina koji pokreću inflamatorni odgovor (Keller et al, 2010 ; Farges et al, 2011). Ovo je potvrđeno studijama „*in vitro*“, koje su pokazale da odontoblasti reaguju na prisustvo bakterijskih komponenti kao što je lipoteihoična kiselina (LTA), koja je uobičajena za gram-pozitivne bakterije, koje se prvenstveno nalaze u dentinskom karijesu (Carrouel et al, 2013; Farges et al, 2011), (Owen Davis, 2013).



Slika 3. Ilustracija morfoloških i unutar-ćelijskih promena, povezanih sa sazrevanjem odontoblasta. Sekretorni odontoblasti formiraju primarni dentinski matriks i sadrže opsežan RER i Golgijev kompleks potreban za transport organskih i neorganskih sastojaka matriksa. Sa starenjem zuba odontoblasti smanjuju svoju sekretornu aktivnost i postaju zreli. Zrele odontoblaste karakteriše prisustvo autofagnih vezikula i posreduju u taloženju sekundarnog dentina. GC, Golgijev kompleks; JC, spojni kompleksi; Ly, lizosom; M, mitohondrije; N, jezgro; OP, odontoblastni nastavak; PC, primarna cilija; RER, grubi endoplazmatski retikulum; SG, sekretorne granule; AV, autofagni vezikuli (modifikovano prema Couve i Schmachtenberg, 2011).

2.2 Razvoj odontoblasta

Razumevanje procesa signalizacije uključenih u fiziološku indukciju i diferencijaciju odontoblasta važno je ako želimo da razvijemo biološke mehanizme za popravku zuba. Generacija odontoblasta koji proizvode dentin predstavlja veliki istraživački izazov u regenerativnoj stomatologiji i mogla bi pružiti biološku osnovu za strategije regeneracije. Trenutno je znanje o mehanizmima koji dovode do diferencijacije odontoblasta daleko od potpunog. Međutim, studije su pokazale da su članovi transformišućeg faktora rasta β familije, poput TGF- β 1, 2 i 3, kao i BMP-2, 4 i 6 sposobni da izazovu diferencijaciju odontoblasta „*in vitro*“ (Smith i Lesot, 2001; Begue-Kirn et al, 1992; Li et al, 2011; Kawai et al, 2013). Verovatno ovi faktori potiču iz oralnog epitela, bazalne membrane i čvorića primarne gleđi, a nastaju tokom morfogeneze zuba (Ruch et al, 1995; Lesot et al, 2001). Konkretno, dokazano je da delovanje BMP-2 i TGF- β 1 promoviše ekspresiju transkripcionih faktora uključenih u diferencijaciju odontoblasta, kao što je faktor vezivanja jezgra 1 (Cbfa1) i dentalnog sijalofosfoproteina (DSPP) (Duci et al, 1997; He et al, 2004). Pokazalo se da diferencijaciju odontoblasta prati i koordinisana ekspresija jedinstvenih skupova gena poput FGF-1 i 2 i nuklearnog faktora I-C (NFI-C), što ukazuje na to da kompleksna mreža faktora može uticati na bazalnu membranu u cilju izazivanja diferencijacije odontoblasta „*in vivo*“ (Ruch et al, 1995; Unda et al, 2001; Lisi et al, 2003; Lee et al, 2009). Takođe, drugi faktori, uključeni u proces diferencijacije, podrazumevaju sistemski izvedene molekule kao što je IGF-1, za koji se pokazalo da stimuliše citološku diferencijaciju, kao što je reorganizacija mikrofilamenata i fibronektina tokom polarizacije odontoblasta, ali ne i funkcionalnu diferencijaciju ovih ćelija (Lesot et al, 2001), (Owen Davis, 2013).

Terminalnu diferencijaciju odontoblasta karakteriše transkripcija gena kao što su dentinski matriksni geni DMP1, DMP2 i DSPP, sa pratećim stvaranjem mineralizovanog dentinskog matriksa. Na primer, nivoi DMP1 se smanjuju u sekretornim odontoblastima nakon mineralizacije pre-dentina, dok se nivoi DSPP i DMP2 održavaju u zrelim odontoblastima (D'Souza et al, 1997; Hao et al, 2004; Simon et al, 2009). DMP1 je važan u regulisanju transkripcije mnogih gena povezanih sa odontoblastima, poput DSPP i DMP2 (Naraianan et al, 2001). Ekspresija DSPP je takođe povezana sa BMP2, faktorom rasta izraženim u ranim fazama morfogeneze zuba. Cbfa1 (alternativni naziv Runx2) i Osterix predstavljaju takođe dva važna transkripciona faktora potrebna za diferencijaciju (Owen Davis, 2013).

Odsustvo Runx2 i Osterix povezano je sa zubnim abnormalnostima, kao što je osteogeneza imperfekta, ali i sa teškim defektima skeleta, kao rezultat zaustavljenog diferenciranja osteoblasta (Mundlos et al, 1997; Lapunzina et al, 2010). Studije koje analiziraju efekte ekspresije Runx2 i Osterix na odontogene gene pokazale su korelacije između ekspresije ovih gena i ključnih markera odontoblasta kao što su DSPP i DMP1, povezujući ova dva transkripciona faktora sa transkripcijom gena povezanih sa odontoblastima (Kobaiashi et al, 2005; Chen et al, 2009), (Owen Davis, 2013).

2.3 Uloga odontoblasta u sazrevanju dentina

Sazrevanje dentina karakteriše mineralizacija pre-dentina i taloženje kalcijuma i fosfata u organski matriks. Nakon što stignu u matricu pre-dentina, joni kalcijuma i fosfata se jezgraju i šire, formirajući kalcifikovani dentinski matriks (Linde i Lundgren, 1995). Smatra se da se mineralizacija cirkumpulpalnog dentina događa kretanjem jona kalcijuma i fosfata iz vaskularne mreže subodontoblastnog područja, preko sloja ćelija odontoblasta i prema frontu mineralizacije. Regulacija transporta kalcijuma u odontoblastima je takođe povezana sa prisustvom proteina koji vežu kalcijum u citoskeletu i ćelijskoj membrani, poput proteina dentinskog matriksa 4 i kalbindina (Magloire et al, 1988; Linde, 1985; Hao et al, 2007), (Owen Davis, 2013).

2.4 Tercijarna dentinogeneza

Kao odgovor na oštećenja, nastala usled uznapredovale karijesne lezije ili fizičke traume, pulpa taloži sloj terciarnog dentina na granici pulpe i dentina. Tercijarni dentin je brzo nataloženi matriks koji može varirati od uređenog cevastog rasporeda, koji je strukturno sličan primarnom dentinu, do poremećenijeg, atubularnog matriksa koji sadrži ćelijske inkluzije (osteodentin) (Linde i Goldberg, 1993). Tercijarna dentinogeneza se može podeliti u dve klase u zavisnosti od težine stimulusa i ćelija koje reaguju na taj stimulus. Ćelije koje povećavaju svoju biološku aktivnost kao odgovor na stimulus su ili lokalni primarni odontoblasti koji se nalaze u blizini oštećenja ili populacija multipotentnih progenitorskih ćelija koja se verovatno nalazi u zubnoj pulpi, gde se razmnožava, migrira na mesto oštećenja i diferencira u ćelije slične odontoblastima (Linde i Goldberg, 1993; Smith et al, 2001; Sangvan et al, 2013), (Owen Davis, 2013).

2.4.1 Reaktivna dentinogeneza

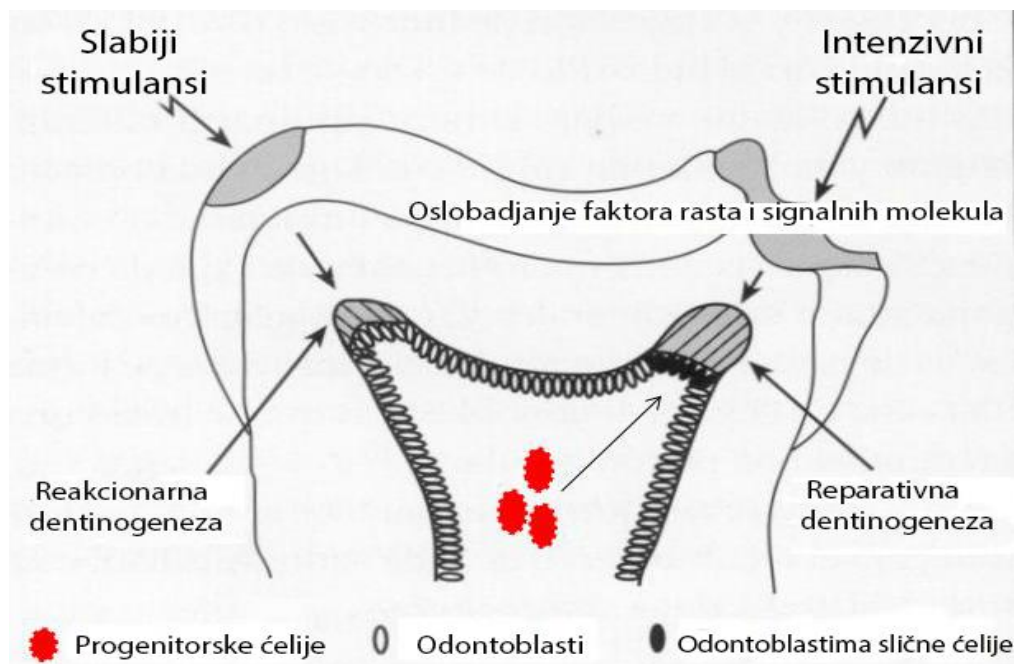
Reaktivna dentinogeneza je definisana sposobnošću odontoblasta da regulišu svoju biološku i sekretornu aktivnost kao odgovor na karijes ili traumu (Smith et al, 1995). Smatra se da su biološki mehanizmi u osnovi reaktivne dentinogeneze rezultat delovanja endogenih faktora rasta i bioaktivnih molekula oslobođenih iz dentinske matrice, nakon oštećenja zuba (**Slika 4**). Oslobođeni bioaktivni molekuli poseduju sličan induktivni potencijal onima koje stvara gledni epitel i bazalna membrana tokom morfogeneze zuba (Smith et al, 1995). Tercijarni dentin deponovan kao rezultat reaktivne dentinogeneze obično ima cevasti kontinuitet sa sekundarnim dentinom, mada tačna struktura terciarnog dentina zavisi od stepena iritacije, pri čemu teže oštećenje rezultira manje organizovanom matricom, koja sadrži veći broj ćelijskih inkluzija (Tziafas, 2010), (Owen Davis, 2013).

2.4.2 *Reparativna dentinogeneza*

Dentin izložen karijesu, operativnim zahvatima ili tretmanu sa terapijskim zubnim materijalima, kao što je EDTA, ima za posledicu smrt odontoblasta i iniciranje populacije ćelija progenitora koja se nalazi unutar pulpe, da se diferenciraju i formiraju ćelije slične odontoblastima (**Slika 4**) (Magloire et al, 2001). Ove ćelije deponuju reparativni dentinski matriks na mestu povrede, u procesu koji se naziva reparativna dentinogeneza (Lesot et al, 1993; Harichane et al, 2011). Slično reaktivnoj dentinogenezi, štetni stimulus dovodi do oslobađanja endogenih faktora rasta i bioaktivnih molekula iz dentinske matrice. Ovi faktori pokreću regrutovanje ćelija, proliferaciju i diferencijaciju unutar kompleksa dentin-pulpa i taloženje terciarnog dentina, koji stvara zaštitnu barijeru između pulpe i spoljašnjeg okruženja (Simon et al, 2010), (Owen Davis, 2013).

Reparativnu dentinogenezu karakteriše formiranje novih ćelija sličnih odontoblastima iz lokalnih matičnih/progenitorskih ćelija, koje se nalaze unutar pulpe. Međutim, identitet populacije matičnih/progenitorskih ćelija povezanih sa reparativnom dentinogenezom ostaje nerazjašnjen. U zubnoj pulpi je identifikovano više progenitorskih ćelijskih niša (Sloan i Smith, 2007; Sloan i Vaddington, 2009). Hohlov sloj bogat ćelijama, koji leži u blizini sloja odontoblasta, jedan je od primera niše koja sadrži populacije od nediferenciranih mezenhimalnih ćelija (Cotton, 1967). Ove ćelije su embriološki slične pre-odontoblastima, ali im nedostaju konačni signali koji dovode do terminalne odontoblastne diferencijacije (Tziafas, 1995). Periciti takođe predstavljaju populaciju multipotentnih ćelija koje su lokalizovane u vaskulaturi zubne pulpe (Carlile et al, 2000; Janebodini et al, 2013). Postoje dokazi koji potvrđuju ulogu pericita tokom reparativne dentinogeneze a koji su izvedeni iz eksperimenata praćenja pericitne loze, i koji pokazuju da su ćelije izvedene iz vaskularne niše sposobne da deluju kao populacije ćelija slične MSC-u, za stvaranje odontoblastima sličnih ćelija, nakon stomatološke traume (Feng et al, 2011) . Zrela pulpa takođe sadrži multipotentnu populaciju matičnih ćelija koja se naziva i matične ćelije zubne pulpe (DPSC), koje nastaju iz oralnog ekto-mezenhima, tokom morfogeneze zuba (Gronthos et al, 2000; Vang et al, 2013). DPSC predstavljaju potencijalni izvor prekursora odontoblasta, sa mnogim studijama koje dokumentuju odontogeni potencijal ovih ćelija i „in vivo“ i „in vitro“ (Huang et al, 2006; Huang et al, 2010; Gronthos et al, 2011), (Owen Davis, 2013).

Potvrda uloge DPSC tokom reparativne dentinogeneze obezbeđena je praćenjem DPSC signalnih puteva, nakon povrede zuba. Studije su potvrdile da se Notch receptori, koji su povezani sa diferencijacijom MSC, aktiviraju na DPSC, nakon povrede zuba (Lovschall et al, 2005; Zhang et al, 2008). Dalji dokaz o učešću DPSC u reparativnoj dentinogenezi dobijen je uporednom analizom profila ekspresije gena ćelija pulpe izvedenih iz zdravih zuba, sa onima iz blago karijesnih zuba (Paakkonen et al, 2005). Ovo poređenje je identifikovalo dva Notch receptora (Jagged2 i Jag2 i mitogenom-aktiviranu protein kinazu), koji su umešani u diferencijaciju progenitorskih ćelija ka zamenskim odontoblastima, nakon oštećenja zuba. Ove receptore su stvorile ćelije dobijene iz karioznog tkiva pulpe, ali ih nema u zdravom tkivu, što dokazuje da su DPSC na određenom nivou uključene u dentinogeni odgovor na povredu zuba (Paakkonen et al, 2005; Mitsiadis et al, 1999), (Owen Davis, 2013).



Slika 4. Dijagramski prikaz poprečnog preseka zuba koji ilustruje ključne događaje potrebne za taloženje terciarnog dentina. Slika prikazuje višu regulaciju odontoblasta tokom reaktivne dentinogeneze, kao i proliferaciju i regrutovanje pulпно lociranih matičnih/progenitorskih ćelija potrebnih za proizvodnju reparativnog dentina, kao odgovor na faktore rasta i signalne molekule koji se oslobađaju nakon oštećenja zuba. Izmenjeno od Smith et al. (1995).

3.ACETILSALICILNA KISELINA

3.1 Uloga i značaj acetilsalicilne kiseline

Acetilsalicilna kiselina (ASA) je lek iz grupe nesteroidnih antiinflamatornih lekova (NSAIL), koji ima analgetički, antipiretički, antiinflamatorni i antiagregacioni efekat. Ovi efekti ASA nastaju kao posledica inhibicije enzima ciklooksigenaze (COX) i posledičnog sniženja nivoa prostaglandina i tromboksana. Poznato je da ASA nepovratno (ireverzibilno) inhibiše enzime ciklooksigenaze (COX 1/COX 2) i prostaglandin, koji su moćni multifunkcionalni regulatori osteogeneze (Knippenberg et al., 2006). Inhibicija prostaglandina E2 može smanjiti regulaciju ekspresije faktora transkripcije c-Myc, kao što je ranije primećeno (Xia et al., 2014). C-Myc je ključna rana meta COX inhibitora (Sobolevski et al., 2011), i njegova ekspresija je važna za matične sposobnosti ćelija, delujući kao prekidač između programa proliferacije i diferencijacije. Naime, smanjenje c-Myc je povezano sa procesom diferencijacije, dok je povećanje c-Myc ekspresije u osteogenim linijama povezano sa smanjenjem ekspresije markera diferencijacije (Melnik et al., 2019).

3.2 Indikacije za primenu acetilsalicilne kiseline

ASA je lek koji se danas uglavnom koristi u prevenciji i lečenju infarkta miokarda kao i profilaksi kardiovaskularnih oboljenja, kod pacijenata sa dijabetes melitusom i visokim kardiovaskularnim rizikom. Važno je napomenuti da je doza ASA koja se primenjuje u cilju lečenja i prevencije kardiovaskularne bolesti značajno niža od doza koje se primenjuju za ublažavanje bola ili snižavanje povišene temperature, što smanjuje rizik od nastanka neželjenih efekata, kao što je krvarenje u digestivnom traktu. Međutim, jasno je da se terapijsko polje dejstva ASA može proširiti zahvaljujući uticaju ASA na aktivnost i drugih enzima, uključenih u regulaciju ćelijskog metabolizma i proliferaciju, kao što je adenzin monofosfatom aktivirana protein kinaza (AMPK), (Jung, Y. R, et al., 2015), (Hardie DG, et al., 2016).

3.2.1 Protein-kinaza aktivirana adenzin-monofosfatom (AMPK)

AMPK ima centralnu ulogu u regulaciji intraćelijske energetske homeostaze i kontroliše metabolizam i energetski balans na nivou celog organizma. Aktivira se u uslovima niskog energetskog statusa u ćeliji, kada je povećan odnos AMP/ATP (adenzin monofosfata/adenzin trifosfata) (Witczak, Sharoff et al., 2008). Svoj efekat ova kinaza ostvaruje direktnom fosforilacijom određenih metaboličkih enzima, ali, i indirektno, kontrolišući ekspresiju gena (Hardie 2011; Mihaylova and Shaw, 2011).

Dokazano je da AMPK ima bitnu ulogu u regulaciji ćelijskog metabolizma i da je funkcija ovog enzima od velikog značaja u patogenezi stanja koja prate poremećaji energetskeg balansa, kao što su inflamatorni procesi (Vučićević M. Ljubica, 2013).

Kao posledica aktivacije AMPK dolazi do stimulacije oksidacije masnih kiselina u jetri, ketogeneze, stimulacije oksidacije masnih kiselina u skeletnim mišićima i unos glukoze, inhibicije sinteze holesterola, inhibicije lipogeneze i sinteze triglicerida, inhibicije lipogeneze adipocita, inhibicije lipolize adipocita i modulacije sekrecije inzulina pomoću beta-ćelija pankreasa (Winder WW, Hardie DG, 1999).

3.3 Acetilsalicilna kiselina i osteogeneza

Pored primene u profilaksi i lečenju infarkta miokarda kao i profilaksi kardiovaskularnih oboljenja, kod osoba sa povišenim rizikom, značajan je podatak da epidemiološka ispitivanja pokazuju da redovna primena ASA može povoljno da utiče na gustinu kosti muškaraca, kao i žena u post-menopauzi (Carbone LD, et al., 2003). Osim toga, nedavna istraživanja na animalnom modelu pokazuju da ASA povoljno utiče i na povećanje zarastanja koštanih defekata kalvarije (Cao Y, Xiong J, Mei S, et al., 2015).

U najskorije vreme je pokazano da ASA utiče na povećanje osteogene diferencijacije SHED (Liu Y, et al., 2015) i pospešuje osteogenu diferencijaciju DPSC (Yuan M, et al., 2018). Međutim, podataka o uticaju ASA na odontoblastnu diferencijaciju DPSC i o mehanizmima koji su u to uključeni, za sada praktično nema. Kako je studija Liu i sar (2015), ispitujući potencijal različitih koncentracija ASA (10-200µg/ml) u osteogenoj stimulaciji matičnih ćelija poreklom iz mlečnih zuba (SHED), pokazala da samo niske koncentracije ASA (10 i 50 µg/ml) utiču značajno na osteogenu diferencijaciju SHED, i dizajn naše studije podrazumevao je ispitivanje uticaja niskih koncentracija ASA na odontogenu stimulaciju matičnih ćelija poreklom iz zubne pulpe stalnih zuba. Primenjene doze inače odgovaraju farmakološkim dozama koje se koriste u profilaksi kardiovaskularnih oboljenja.

4. RADNA HIPOTEZA

Predmet ovog istraživanja je ispitivanje uticaja niskih koncentracija (10 i 50 µg/ml) ASA na diferencijaciju matičnih ćelija, izolovanih iz perivaskularne niše humane pulpe, u odontoblaste, kao i mehanizama uključenih u ovaj efekat ASA. Polazna hipoteza je da niske koncentracije ASA stimulišu diferencijaciju DPSC u funkcionalno sposobne odontoblaste i ekspresiju gena odgovornih za stvaranje dentina, mehanizmima koji uključuju aktivaciju signalnih puteva AMPK.

5. CILJEVI

1. Izolacija i kultivacija ćelija iz perivaskularne niše zubne pulpe trećih molara adultnih osoba.
2. Utvrđivanje prisustva matičnih ćelija preko markera matičnosti, korišćenjem protočne citometrije.
3. Određivanje klonogenog, proliferativnog i migratornog potencijala izolovanih ćelija.
4. Ispitivanje uticaja niskih koncentracija ASA (10 i 50 µg/ml) u uslovima „*in vitro*“ na diferencijaciju ovako izolovanih matičnih ćelija u pravcu odontoblasta.
5. Ispitivanje ekspresije gena markera odontoblastne diferencijacije, odgovornih za stvaranje dentina: dentinskog sialofosfoproteina (DSPP), proteina dentinskog matriksa 1 (DMP-1), alkalne fosfataze (ALP) i osteokalcina (OCN).
6. Ispitivanje uloge AMPK signalnog puta u ASA-stimulisanoj diferencijaciji DPSC u odontoblaste.

6. MATERIJAL I METODE

6.1 Pacijenti

Sve procedure u ovom istraživanju odobrene su od strane etičke i naučne komisije Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Svi pacijenti su obavešteni o studiji i potpisali su pismeni informisani pristanak. Studija, koju je pregledala i odobrila Etička komisija Stomatološkog fakulteta (br. 36/8), Univerziteta u Beogradu, sprovedena je u skladu sa Helsinškom deklaracijom. Istraživanje je sprovedeno na Stomatološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, u Laboratoriji za bazična istraživanja, u saradnji sa Klinikom za oralnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu. Za ovu „*in vitro*“ studiju neophodno je bilo izolovati matične ćelije od ekstrahovanih trećih molara pet pacijenata, sistemski zdravih, mlađe životne dobi (18-25 godina). U ispitivanju su se koristile samo ćelije zubne pulpe zuba ekstrahovanih iz razloga ortodontske ili preprotetske terapije.

6.2 Ćelijske kulture i dokazivanje matičnosti DPSC

Zubi su bili presečeni na gleđno - dentinskoj granici, a zatim je tkivo pulpe pažljivo uklonjeno iz komore. Tkivo je zatim usitnjeno skalpelom na komade od 1 mm, isprano 3 puta puferiranim fosfatnim fiziološkim rastvorom (PBS) i zasejano u posude za ćelijske kulture T75 u kompletnom medijumu (CM) (Dulbecco's Modified Eagle Medium dopunjen sa 10% FBS i 100 U/ml rastvor penicilin-streptomicina, Gibco, ThermoFisher, SAD), primenom tzv. “explant” metode (Simonović et al., 2019). Ćelije su kultivisane u standardnim uslovima u vlažnoj atmosferi sa 5 % CO₂ na 37 C° (Simonović, J, et al., 2019). Medijum u kulturama se menjao tri puta sedmično do postizanja subkonfluentnosti od 80% a zatim se radilo pasažiranje određenog broja ćelija (500 000 ćelija). Ćelije zubne pulpe su zasejavane u osteogenom medijumu (OM) uz dodatak ASA u koncentracijama od 10, 50 i 100 µg/ml u trajanju od 72h.

U eksperimentima inhibicije AMPK, jedan sat pre primene ASA ćelije su bile inkubirane sa 1µM dorsomorfin dihidrohlorida (inhibitor AMPK).

6.2.1 Test formiranja kolonija (eng. Colony Forming Unit - CFU TEST)

Ćelije pete pasaže su zasejane u petri posudice od 35 mm² u gustini od 200 ćelija po posudici u kompletnom medijumu koji je menjan na svakih 2-3 dana. Nakon 7 i 10 dana kompletni medijum je aspiriran i odbačen. Posude su isprane sa DPBS-om pre tridesetominutnog fiksiranja sa 4% paraformaldehidom (Sigma Aldrich, Minhen, Nemačka), na sobnoj temperaturi. Fiksirani ćelijski monosloj zatim je bojen 0,05% rastvorom Kristal Violet-a (Centrohem, Beograd, Srbija). Nakon ispiranja DPBS-om dva puta, posude su posmatrane i fotografisane na invertnom mikroskopu. U određivanju klonogenog potencijala izolovanih ćelija, korišćen je test formiranja kolonija (Colony Forming Unit), koji se zasniva na zasejavanju istog broja ćelija (po

200) i praćenja proliferacije i formiranja kolonija nakon 7 i 10 dana od zasejavanja, da bi se potom bojenjem sa 0,05% crystal violet, jasno uočile kolonije na invertnom mikroskopu.

6.2.2 Test ćelijske proliferacije

U cilju određivanja proliferativnog potencijala, urađen je test ćelijske proliferacije (Cell Proliferation Assay) koji podrazumeva zasejavanje istog broja ćelija (po 10 000) i brojanje ćelija nakon 3., 5., i 7. dana nakon zasejavanja.

6.2.3 Test zarastanja rana

Migratorni potencijal ćelija je određivan testom zarastanja rana (Scratch Wound Healing Assay). Nakon zasejavanja ćelija (po 10 000) i uspostavljanja 80% konfluentnosti, sterilnom gumom širine 1mm ćelije se razdvajaju, a zatim prate tokom 48h.

6.2.4 Protočna citometrija

U cilju utvrđivanja matičnosti kod ćelija perivaskularne niše zubne pulpe vršeno je testiranje kako pozitivne, tako i negativne ekspresije površinskih markera metodom protočne citometrije, a za ova testiranja korišćene su ćelije pete pasaže. Ispitani markeri, karakteristični za mezenhimske matične ćelije bili su CD73, CD90 i CD105. Za dokazivanje odsustva hematopoetičnih ćelija korišćeni su markeri CD34 i CD45. Primenjena su odgovarajuća antitela obeležena različitim fluorescentnim bojama: fluoresceinizotiocijanatom (FITC) obeležena su mišja monoklonalna antitela protiv CD90, CD105 i CD34, a fikoeritriinom (PE) obeležena su mišja monoklonalna antitela protiv CD73 i CD45 (sva antitela su nabavljena od Ekbio, Češka Republika). Ukratko, ćelije su sakupljene sa TrypLE™ Ekspresnim rastvorom, isprane sa PBS-om, sa dodatkom 10 % FBS-a, i prebrojane. 5×10^5 ćelija je resuspendovano u 1 ml 10% rastvora FBS-a u PBS-u i inkubirano sa antitelima 45 min u frižideru. Posle inkubacije, ćelije su fiksirane sa sterilnim 4% paraformaldehidom 20 min i na kraju dvaput isprane sa PBS-om. Ćelije su analizirane na stonom protočnom citometru-analizatoru (BD Melody, USA) a rezultati su bili obrađeni BD FACS Chorus TM (USA), (Simonovic, J, et al., 2018). Ispitivana je ekspresija gena odgovornih za stvaranje dentina: ALP, OCN, DSPP i DMP-1. Za dokazivanje ekspresije DSPP gena koristiće se reverse-transcription polymerase chain-reaction (RT-PCR).

6.2.5 Indukcija diferencijacije u hondro-, adipo- i neuro-lozu

Da bi se procenile karakteristike DPSC-a, njihov potencijal diferencijacije u više loza (hondro-, adipo- i neuro-), bio je praćen. Čelije su uzgajane u odgovarajućem medijumu za diferencijaciju, koji se menjao svaka 2 dana. Posle tražene diferencijacije nakon isteklog vremenskog perioda, ćelije su obojene i/ili fotografisane.

6.2.5.1 Hondrogena Indukcija

Za hondrogenu indukciju, ćelije su zasejane u obliku mikromase u ukupnom broju od $1,5 \times 10^6$ i uzgajane tokom 21 dana u komercijalno dostupnom medijumu za hondrogenezu (StemPro™ komplet za diferencijaciju hondrogeneze, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Nakon 21 dana, kompletni medijum za hondrogenu diferencijaciju je usisan i odbačen, bunarići su isprani DPBS-om, a zatim je ćelijski sloj fiksiran sa 1 ml 4% formaldehida u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi. Fiksirane ćelije ispirane su dva puta sa po 1-1,5 ml DPBS-a. Dodat je 1 ml 0,1% vodenog rastvora Safranina O (Centrohem, Beograd, Srbija), a ćelije su inkubirane na sobnoj temperaturi 15 minuta. Boja je aspirirana i odbačena, a bunarići ispirani tri puta sa destilovanom vodom.

6.2.5.2 Adipogena indukcija

Adipogena indukcija je trajala 21 dana u medijumu za adipogenezu (StemPro™ Adipogenesis Differentiation Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), pri gustini zasejavanja od 1×10^4 ćelija/cm², po bunariću. Korišćeno je bojenje Oil Red O (Centrohem, Beograd, Srbija) da bi se vizuelizovala intracelularna akumulacija lipida u obliku lipidnih vakuola. Nakon 21 dana, kompletni medijum za adipogenu diferencijaciju je usisan i odbačen iz bunarića, a ćelije fiksirane sa 1 ml 4% formaldehida u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi. Potom je i formaldehid odstranjen a fiksirane ćelije isprane su sa po 1-1,5 ml PBS-a dva puta. U bunariće je dodato po 1 ml Oil Red O boje, a zatim su ploče inkubirane na sobnoj temperaturi 15 minuta. Nakon bojenja, ćelije su ispirane tri puta sa po 1 ml destilovane vode.

6.2.5.3 Neurogena indukcija

Da bi se izazvala neurogena diferencijacija, ćelije su zasejane ($1,5 \times 10^5$) u T-25 flaskovima za tkivne kulture u standardnoj podlozi. Posle 24 h, dodati su neuralni predindukcioni medijum i DMEM sa 100 mM betamerkaptoetanola, a ćelije su inkubirane 4 h. Zatim je diferencijacija ćelija nastavljena u medijumu za neuralnu indukciju koji sadrži rekombinantni humani osnovni fibroblastni faktor rasta, neuralni faktor rasta i B27 suplement (sve od Thermo

Fisher Scientific-a, Waltham, MA, SAD) u DMEM. Posle 7 dana kultivacije, posmatrana je morfologija ćelija.

6.3 Odontogena diferencijacija

Da bi se indukovala osteo/odontogeneza, 5×10^4 DPSC je kultivisano u OM do 14 dana u pločama sa 24 odeljka. Svaka 3 dana OM sa ASA (10 i 50 $\mu\text{g/ml}$) je dopunjen. 7. i 14. dana indukcije, ćelije su bile obojene sa rastvorom Alizarin Red S (ARS) (2%) i mikroskopske slike su snimljene pri uvećanju od $40 \times$ (BIB-100/T invertni mikroskop, Boeco, Nemačka). Da bi se utvrdio stepen mineralizacije, ARS vezan za kulture ekstrahovan je inkubacijom sa 200 μl 1% hlorovodonične kiseline u 70% etanolu 20 min. Apsorpcija je bila izmerena na 450 nm u ELISA čitaču mikroploča (RT-2100c, Rayto, Kina) (Mičić et al., 2020).

6.4 MTT Test

Ćelije su zasejane na ploče sa 96 pregrada (1×10^4 ćelije/pregradi) i kultivisane u CM. Posle 24 h, ćelije su tretirane sa 10, 50 i 100 $\mu\text{g/ml}$ ASA (kat. br. A5376, Sigma-Aldrich, SAD). Sledećeg dana, 100 μl MTT rastvora (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5 difeniltetrazolijum bromid) je dodat u svaki deo. Posle 4 h inkubacije (5 % CO_2 i 37°C), supernatant je odbačen, a precipitati su rastvoreni u 100 μl dimetil sulfoksida (Sigma-Aldrich), mućkanjem na 37°C tokom 15 min. Optička gustina (OD) je merena na 540 nm korišćenjem ELISA čitača (RT-2100c, Rayto, Kina). Procenat živih ćelija bio je izračunat korišćenjem sledeće formule: % živih ćelija = $\text{OD (uzorak)} / \text{OD (kontrola)} \times 100$.

6.5 Neutralno crveno test (Neutral red-NR- assay)

DPSC su zasejane na ploče sa 96 pregrada i inkubirane sa ASA kao što je opisano u MTT testu. Posle 24 h perioda inkubacije rastvori su odstranjeni i zamenjeni sa 150 μl neutralno crvenog rastvora (3- amino-7dimetil-1–2-metilfenazin hidrohlorid) (Sigma - Aldrich) i inkubirane 4 h sa 5 % CO_2 na 37°C . Dalje, pregrade su isprane sa PBS i 150 μl NR eluenta (96 % etanol: dH_2O : CH_3COOH 50:49:1) je dodat u svaki odeljak i inkubiran u prostoriji na sobnoj temperaturi 15 min. OD i procenat živih ćelija su izračunati kao što je opisano u odeljku MTT testa.

6.6 Test aktivnosti ALP

DPSC (2×10^4) su bile dodate u ploče sa 96 odeljaka i kultivisane do 80% subkonfluencije. Zatim su DPSC ostavljene 24 h u CM sa 2% FBS. Posle 24 h, OM je dopunjen sa 10 nM deksametazon dinatrijum fosfata, 1,8 mM monokalijum fosfata (KH_2PO_4), 10 mM b-glicerofosfata i 50 mg/ml vitamina C (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD) sa ili bez ASA (10 i 50 $\mu\text{g/ml}$) je bio dodat ćelijama. Sveže razblaženi i medijum su dodavani svaka 3 dana. Kolorimetrijski Test aktivnosti ALP je izveden 7 dana nakon osteo/odontogene diferencijacije korišćenjem pNPP kompleta za ispitivanje alkalne fosfataze (Sigma-Aldrich). Kao kontrola korišćene su ćelije kultivisane sa CM. Rezultati ALP-a normalizovani su koncentracijom proteina.

6.7 Izolacija RNK i analiza ekspresije osteo/odontogenih markera

5×10^5 ćelija je dodato u ploče sa 6 odeljaka i kultivisano do 80% subkonfluentnosti. Ćelije su zatim ostavljene 24 h u CM sa 2% FBS. Zatim je OM dodat u odgovarajuće bunare. Izolacija RNK je izvršena 21 dan nakon osteogene diferencijacije. Ukupna RNK je ekstrahovana iz ćelija korišćenjem TRIzola (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, SAD). Komplementarna DNK je pripremljena korišćenjem Revert Aid First Strand Komplet za sintezu cDNK (Thermo Fisher Scientific) prema uputstvima proizvođača. Koristeći odgovarajuće prajmere, amplifikacija gena od interesa izvedena je primenom komercijalnog kita Maxima TM SYBR Green/ROX qPCR Detection System (Thermo Fisher Scientific) i uz pomoć qPCR aparata (Light Scanner, Idaho Technology, America), po sledećoj recepturi:

SYBR Green	10 μl
Prajmer Forward	1 μl
Prajmer Reverse	1 μl
ddH ₂ O	6 μl
cDNK uzorak	2 μl

Lista specifičnih prajmera data je u **Tabeli 2**. Housekeeping gen GAPDH bio je korišćen kao referentan. Relativna ekspresija određena je primenom $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Za svaku reakciju, urađena je i negativna kontrola bez cDNK, a reakcija je izvedena u triplikatu (Livak, K. J. & Schmittgen, T. D., 2001). Ekspresija osteo/odontogenih markera (DSPP, BMP2, BMP4, BSP, OCN, RUNX2) analizirana je pod istim uslovima (Simonović et al., 2018).

Tabela 2. Nazivi gena i prajmeri sa odgovarajućim sekvencama, upotrebljeni u studiji.

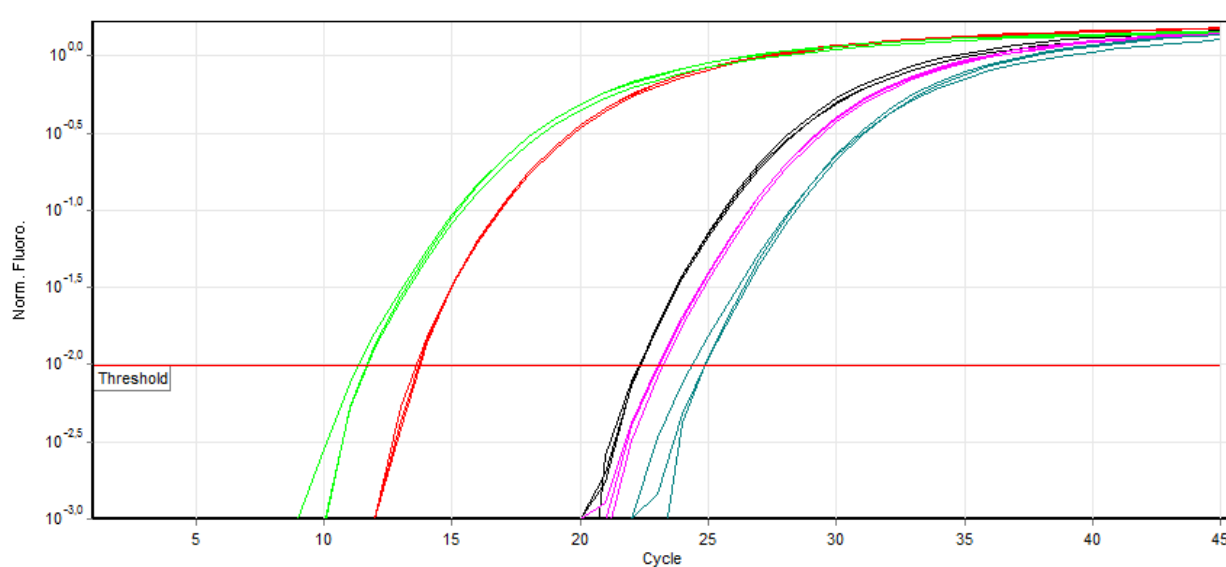
Product Name		Sequences (5'→3')
DSPP	Forward	TCACAAGGGAGAAGGGAATG
	Reverse	CTGGATGCCATTTGCTGTGA
BMP2	Forward	CACTGTGCGCAGCTTCC
	Reverse	CCTCCGTGGGGATAGAACTT
BMP4	Forward	CTGGATGAGTATGATAAGGTGGTA
	Reverse	GGGTGAGTGGATGGGAAC
BSP	Forward	AAAGTGAGAACGGGGAACCT
	Reverse	ACCATCATAGCCATCGTAGCC
OCN	Forward	TTGGACACAAAGGCTGCAC
	Reverse	CTCACACTCCTCGCCCTATT
RUNX2	Forward	ACAAACAACCACAGAACCACAAGT
	Reverse	GTCTCGGTGGCTGGTAGTGA
c-Myc	Forward	GGTGCTCCATGAGGAGACAC
	Reverse	AGCCTGCCTCTTTTCCACAG
GAPDH	Forward	TCATGACCACAGTCCATGCCATCA
	Reverse	CCCTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT

Uslovi amplifikacije gena od interesa, korišćeni u reakciji real-time PCR-a (qPCR) dati su u Tabeli 3.

Tabela 3. Uslovi qPCR ciklusa

		Vreme/ciklusi	Temperatura
1 ciklus	Inicijacija	2 min	95
40 ciklusa	Denaturacija	30 s	95
	Vezivanje prajmera	30 s	50-60
	Elongacija	60 s	72
1 ciklus	Finalna elongacija	10 min	72

Na **Slici 5.** dat je prikaz toka amplifikacije gena u realnom vremenu za različite uzorke.



Slika 5. Praćenje amplifikacije uzoraka primenom kvantitativne PCR tehnike (qPCR); prikaz pet uzoraka označenih različitim bojama, od kojih je svaki analiziran u triplikatu.

6.8 Test proliferacije ćelija nakon ASA

Ćelije (1×10^5) su zasejane na ploči sa 12 bunarića i tretirane sa 0,5 ml od 10 µg/ml ASA razblaženog u humanom osteogenom medijumu za diferencijaciju (OM) (StemMACS™ OsteoDiff Media, Miltenyi Biotec, Nemačka). Ukupan broj ćelija je prebrojan pod invertnim svetlosnim mikroskopom (BIB-100/T invertni mikroskop, Boeco, Nemačka) nakon 1., 2., i 7. dana. OM sa ASA je zamenjen 3. dana eksperimenta (za 7 - dnevne kulture).

6.9 Analiza c-Myc ekspresije

Da bi se pokušalo utvrditi da li tretman ASA favorizuje DPSC diferencijaciju ili proliferaciju, ekspresija c-Myc je bila procenjivana pomoću qPCR, kao što je prethodno opisano. 5×10^5 ćelija je dodato na ploče sa 6 odeljaka i kultivisano do 80% subkonfluencije. Ćelije su zatim ostavljene 24 h u CM sa 2 % FBS. Zatim je OM dodat u odgovarajuće odeljke - bunare a ćelije su kultivisane sa OM i sa ASA (10 µg/ml). RNA izolacija je izvršena 7. dana nakon osteo/odontogene diferencijacije.

6.10 AMPK inhibicija

Pre primene 10 µg/ml ASA, ćelije (5×10^5 /bunariću) bile su inkubirane sa 1 mM dorsomorfin dihidrohloridom (kat br 171260, AMPK inhibitor, Compound C, CAS 866405-64-3, Sigma Aldrich) na ploči sa 6 bunarića, ukupno jedan sat. Nakon inhibicije AMPK, izolacije RNK i analize ekspresije gena DSPP, OCN, RUNX2, su bile izvedene nakon 7. dana osteo/odontogene indukcije, kao što je opisano u prethodnom odeljku.

6.11 Statistička analiza

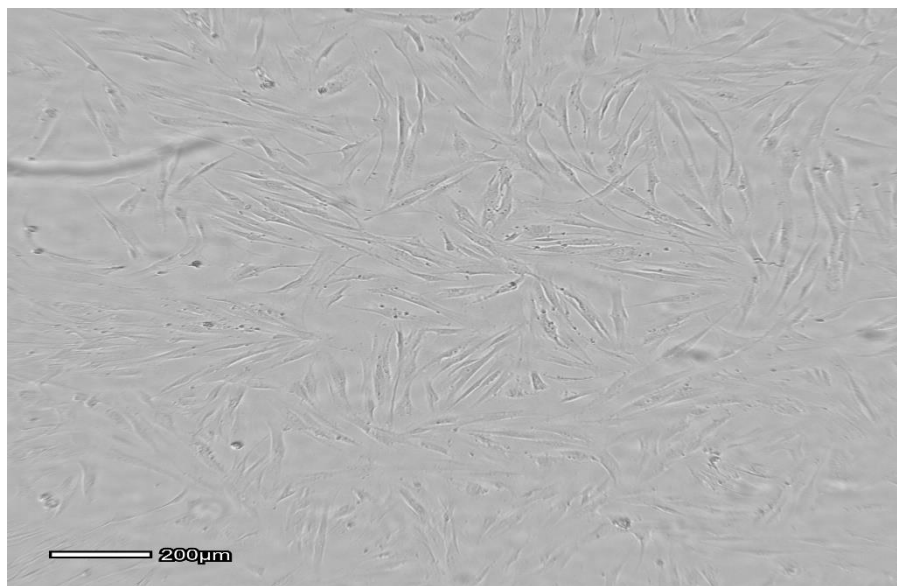
Statistička analiza je obavljena korišćenjem SPSS 20.0 statističkog paketa (SPSS, Čikago, IL, SAD). Nakon pregleda i potvrde normalnosti distribucije (Kolmogorov-Smirnov test), sproveden je jednosmerni ANOVA ili nezavisni uzorak T test. Tukey Post hoc test višestrukog poređenja je urađen, da bi se utvrdile razlike između grupa. Statistički je razmatrana vrednost $P \leq 0,05$ značajan. Svi eksperimenti su izvedeni u tri primerka, ponovljeni dva puta.

7. REZULTATI

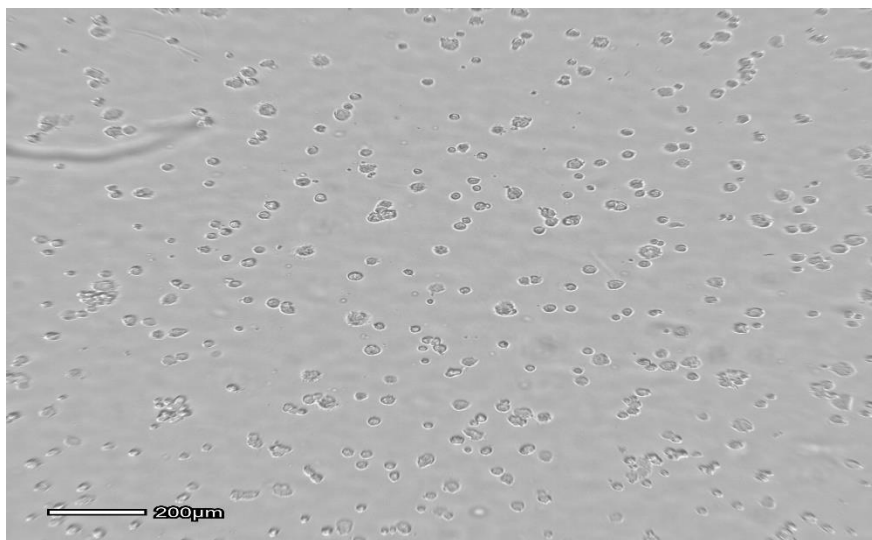
7.1 Izolacija i karakterizacija DPSC iz trećih molara

Ćelije su kultivisane u standardnim uslovima u vlažnoj atmosferi sa 5 % CO₂ na 37 °C. Tehnika kulture eksplant ćelija (Simonović et al., 2019) je sprovedena. Nakon 3-4 dana, u flaskovima su uočene prve ćelije oko komadića isitnjene i zasejane pulpe kako formiraju primarne kolonije i adheriraju za plastičnu podlogu, pa je u postojeći medijum dodato još nekoliko ml svežeg medijuma. Nakon 7-10 dana od izolacije uočen je znatno veći broj ćelija, pa je medijum za kultivaciju prvi put zamenjen u potpunosti svežim medijumom. Nakon 14-21 dan postignuta je konfluentnost, odnosno prekrivenost od 70-80% površine flaska, čime su stečeni uslovi za pasažu (**slika 6a**).

Medijum u kulturama menjao se tri puta sedmično do postizanja subkonfluentnosti od 80% a zatim se pristupilo pasažiranju određenog broja ćelija (500 000 ćelija)(**Slika 6b**).



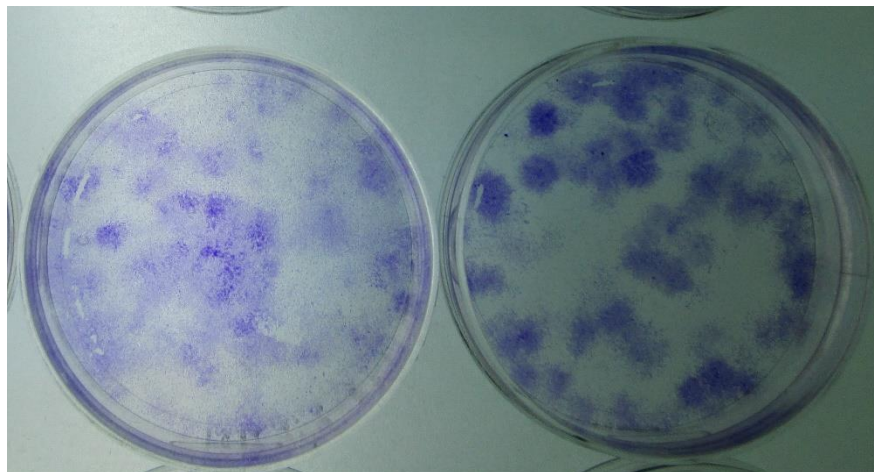
Slika 6a. Izgled ćelija tokom kultivacije.



Slika 6b Izgled ćelija odmah nakon pasažiranja.

7.1.1 Test formiranja kolonija (eng. Colony Forming Unit - CFU TEST)

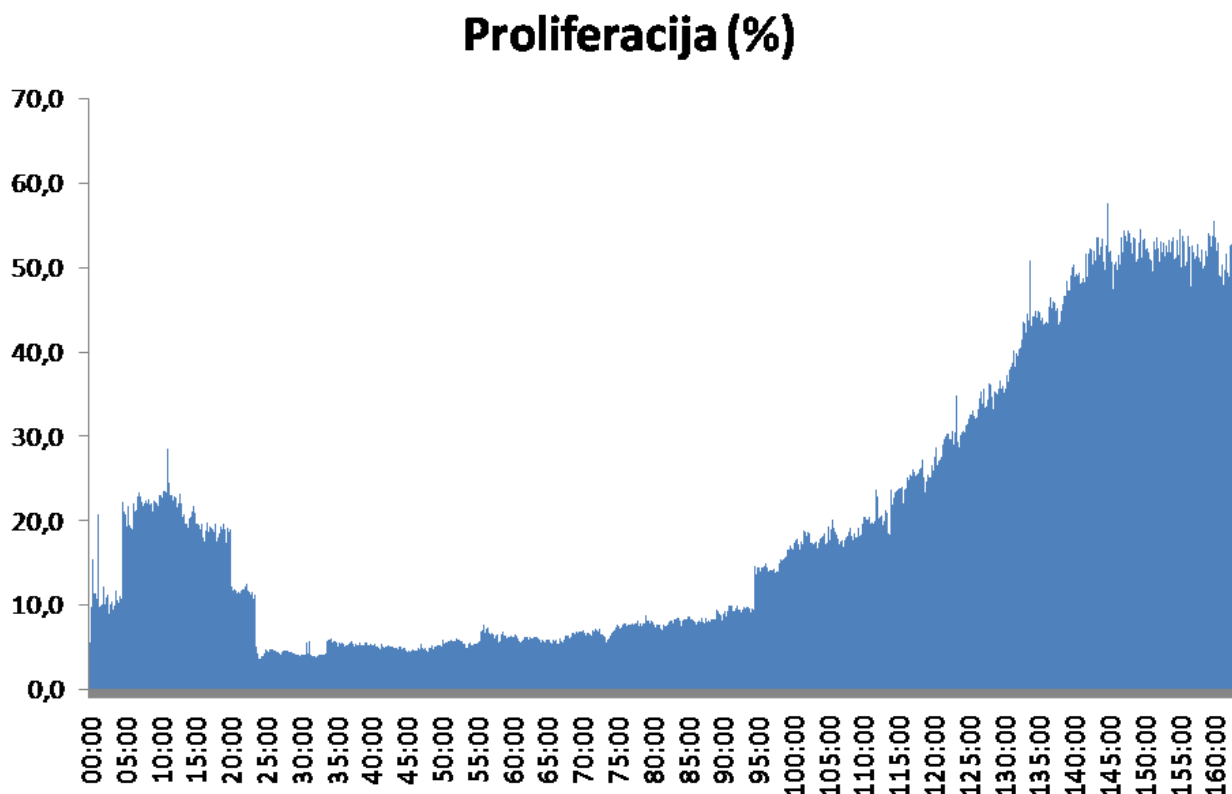
Na **Slici 7**, prikazani su rezultati CFU testa. Već nakon 7. dana uočljivi su klonogeni potencijal i proliferacija, a nakon 10. dana došlo je do izraženijeg povećanja broja ćelija i kolonija.



Slika 7. Prikaz rezultata CFU testa nakon 7 (levo) i 10 (desno) dana od zasejavanja.

7.1.2 Proliferativni kapacitet DPSC

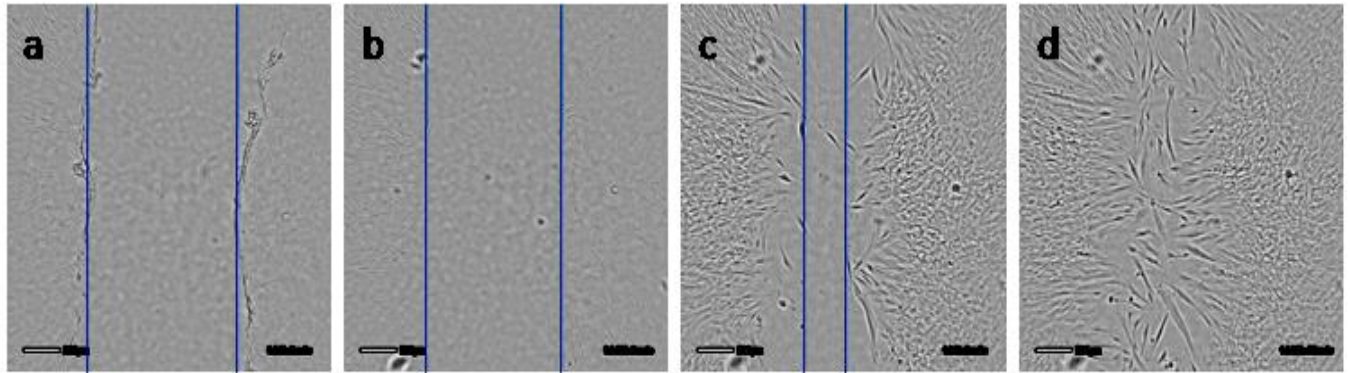
Određivanje proliferativnog kapaciteta DPSC u kratkotrajnim kulturama, tj. određivanje njihovog broja u kulturama do 7. dana inkubacije, ukazalo je na visoki proliferativni kapacitet DPSC, s obzirom da je već nakon 5 - 10 sati inkubacije broj ćelija u kulturama bio dvostruko povećan, dok je nakon 6 - 7 dana bio povećan za oko 5 puta (**Slika 8**).



Slika 8. Proliferativni kapacitet DPSC u kulturama, praćen u vremenskom rasponu do 7. dana.

7.1.3 Test zarastanja rana

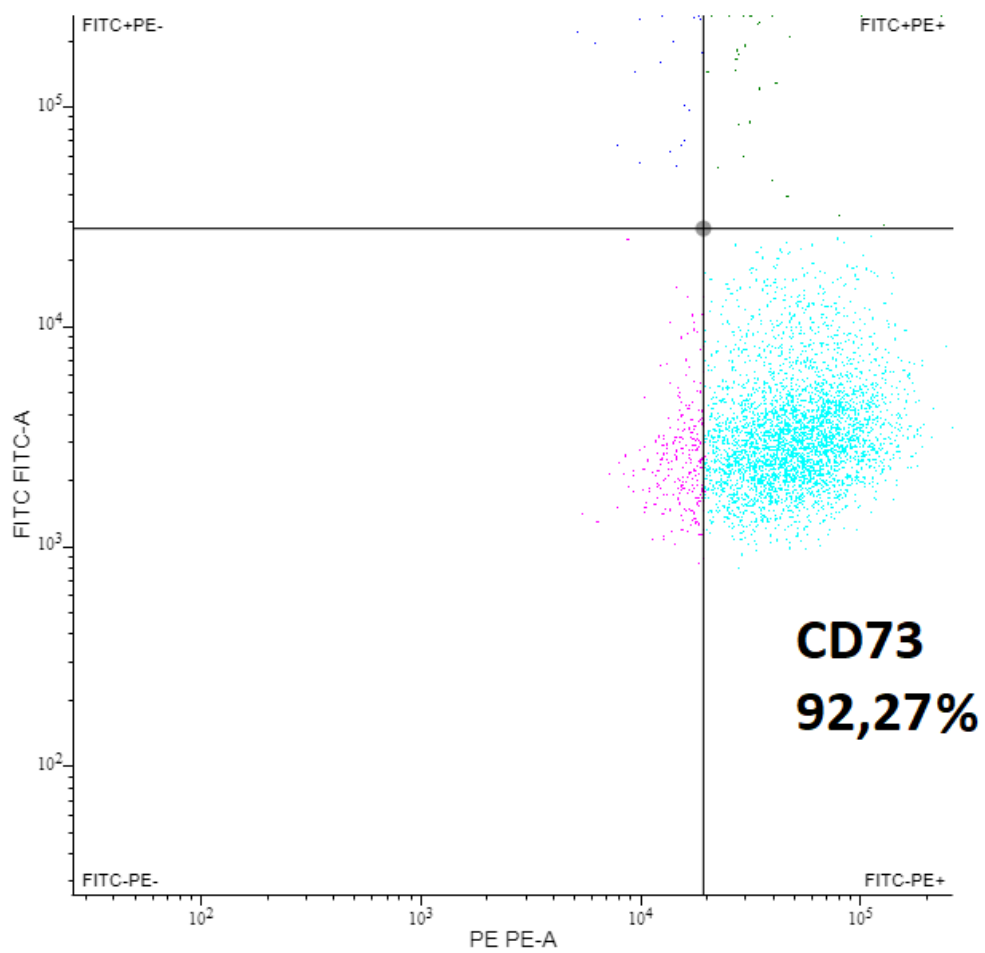
Migratorni potencijal ćelija je određivan testom zarastanja rana (Scratch Wound Healing Assay) i on je pokazao da je došlo do zatvaranja prostora između razdvojenih ćelija (**Slika 9**).



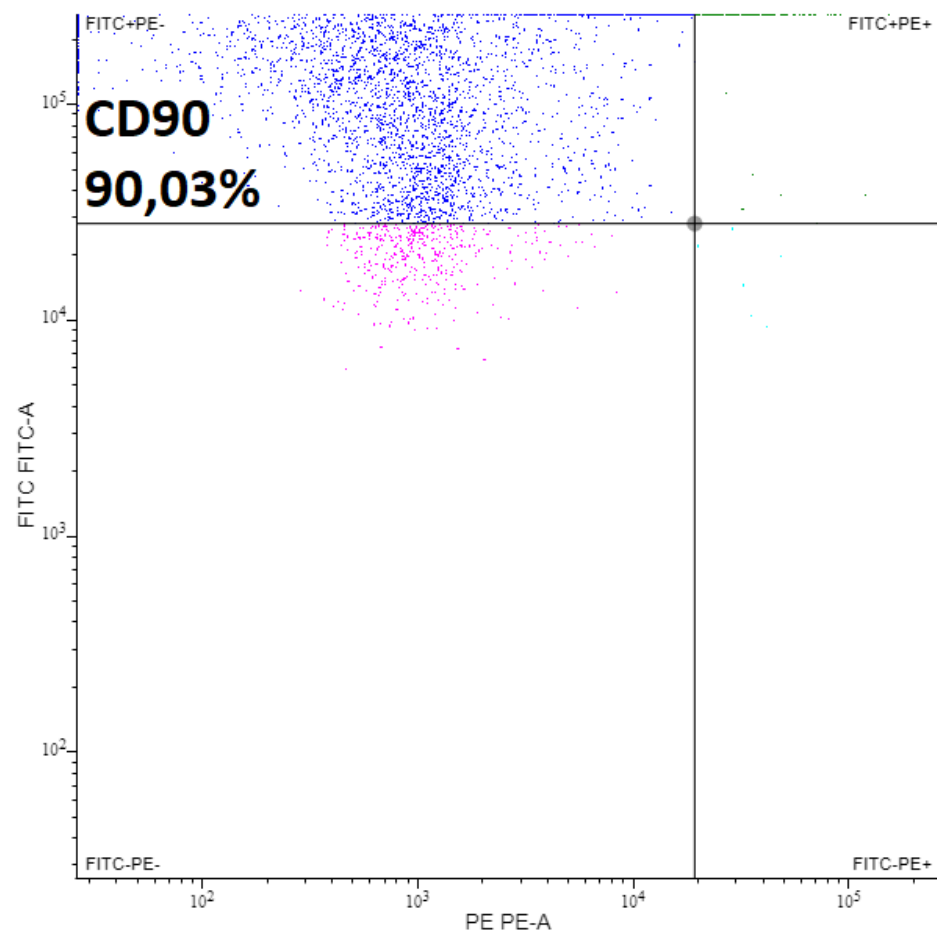
Slika 9. Proces migracije ćelija u nultom vremenu (a), nakon 12 sati (b), nakon 24 sata (c) i nakon 48 sati (d).

7.1.4 Protočna citometrija je pokazala prisustvo markera mezenhimalnih matičnih ćelija u DPSC kulturama

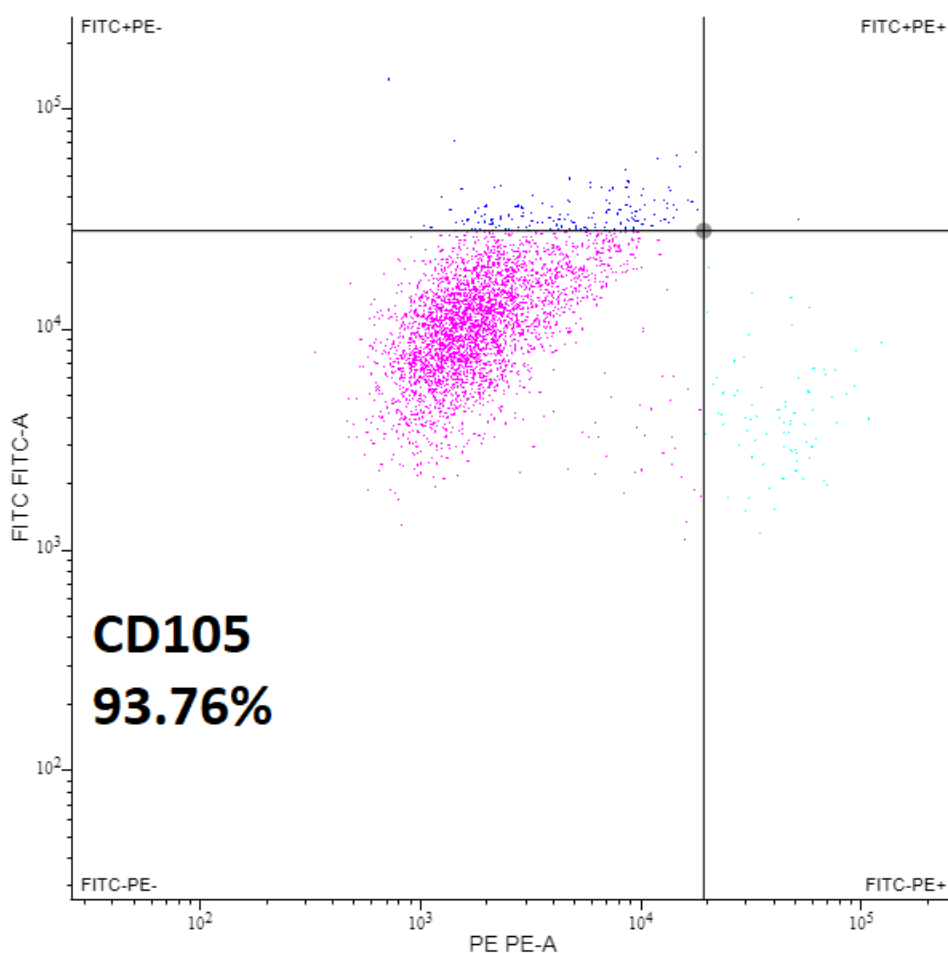
Markeri mezenhimalnih matičnih ćelija CD73, CD90 i CD105 pokazali su ekspresiju u preko 90% ćelija: CD73 u 92,27% i CD90 u 90,03% i CD105 u 93,76% (**Slike 10a, 10b, 10c**), dok su CD45 i CD34 markeri hematopoetskih matičnih ćelija pronađeni u manje od 3.00 % ćelija (CD34 u 2,6 % i CD45 u 0,57 %).



Slika 10a. Protočna citometrija DPSC obeleženih antitelom na CD73.



Slika 10b. Protočna citometrija DPSC obeleženih antitelom na CD90.

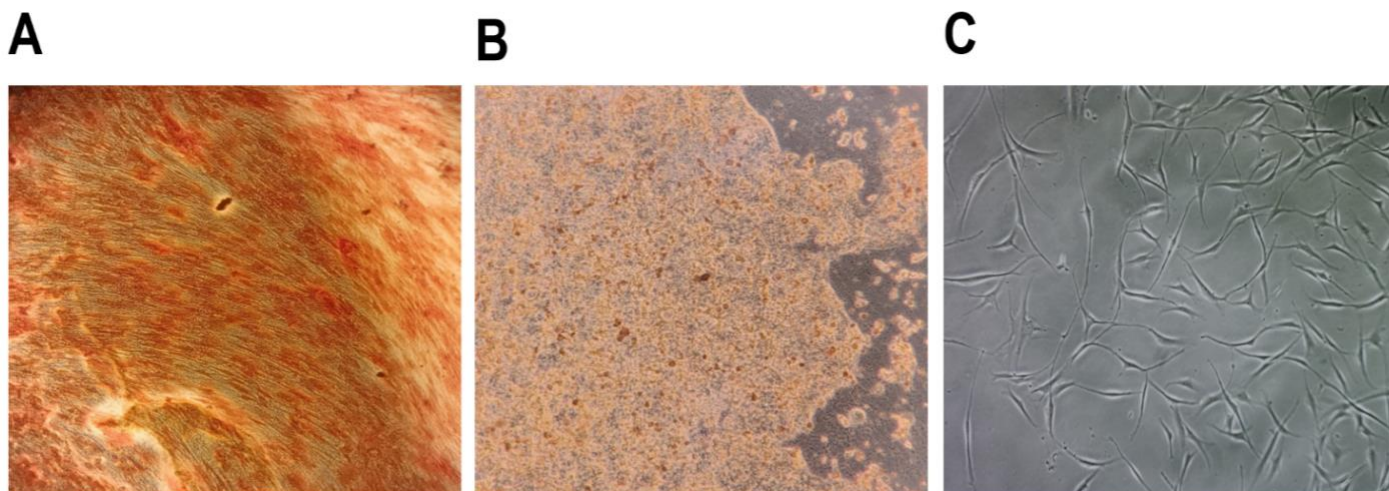


Slika 10c. Protočna citometrija DPSC obeleženih antitelom na CD105.

7.1.5 Dokazivanje multipotentnosti DPSC

DPSC uzgajane u odgovarajućem medijumu za diferencijaciju su indukovane prema hondro, adipo i neuro-lozama (**Slika 11**), što je bilo potvrđeno specifičnim bojenjem ćelijskih produkata. Hondro-diferencijacija je potvrđena bojenjem ćelijskih kultura Safranin O bojom koja je karakteristična za hrskavicu; adipo-diferencijacija je potvrđena bojenjem masnih kapljica u ćelijama Oil red O bojom, dok je neuro-diferencijacija potvrđena na osnovu morfologije ćelije

koje su pokazivale tanke, izdužene citoplazmatske nastavke.

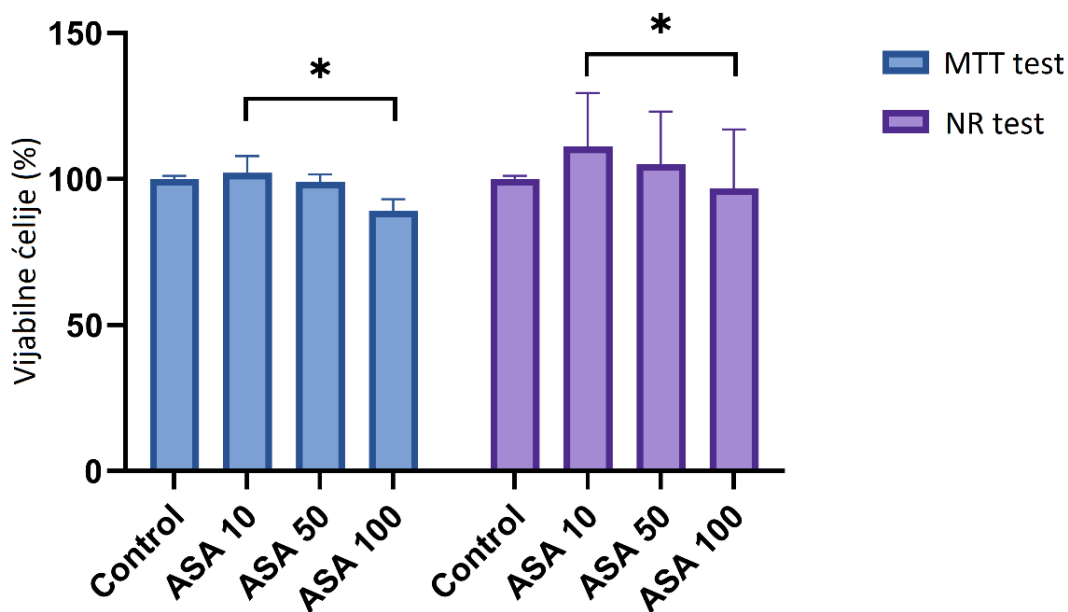


Slika 11. DPSC uzgajane u odgovarajućem medijumu za diferencijaciju su indukovane prema hondro (A), adipo (B) i neuro (C) lozama, što potvrđuje specifično bojenje ćelijskih produkata: hondro-diferencijacija (safranin O) i adipo-diferencijacija (oil red O) ili ćelijska morfologija (neuro-diferencijacija).

7.2. Uticaj ASA na odontogenu diferencijaciju DPSC

7.2.1 MTT i NR testovi i ispitivanje citotoksičnosti ASA

Generalno, ASA nije imala izraženiji citotoksični efekat na DPSC. Najviša koncentracija ASA (100 µg/ml) samo je neznatno smanjila vijabilnost DPSC-a kao što prikazuje MTT (89,1 % živih ćelija) i NR (96,8 %) test (**Slika 12**).



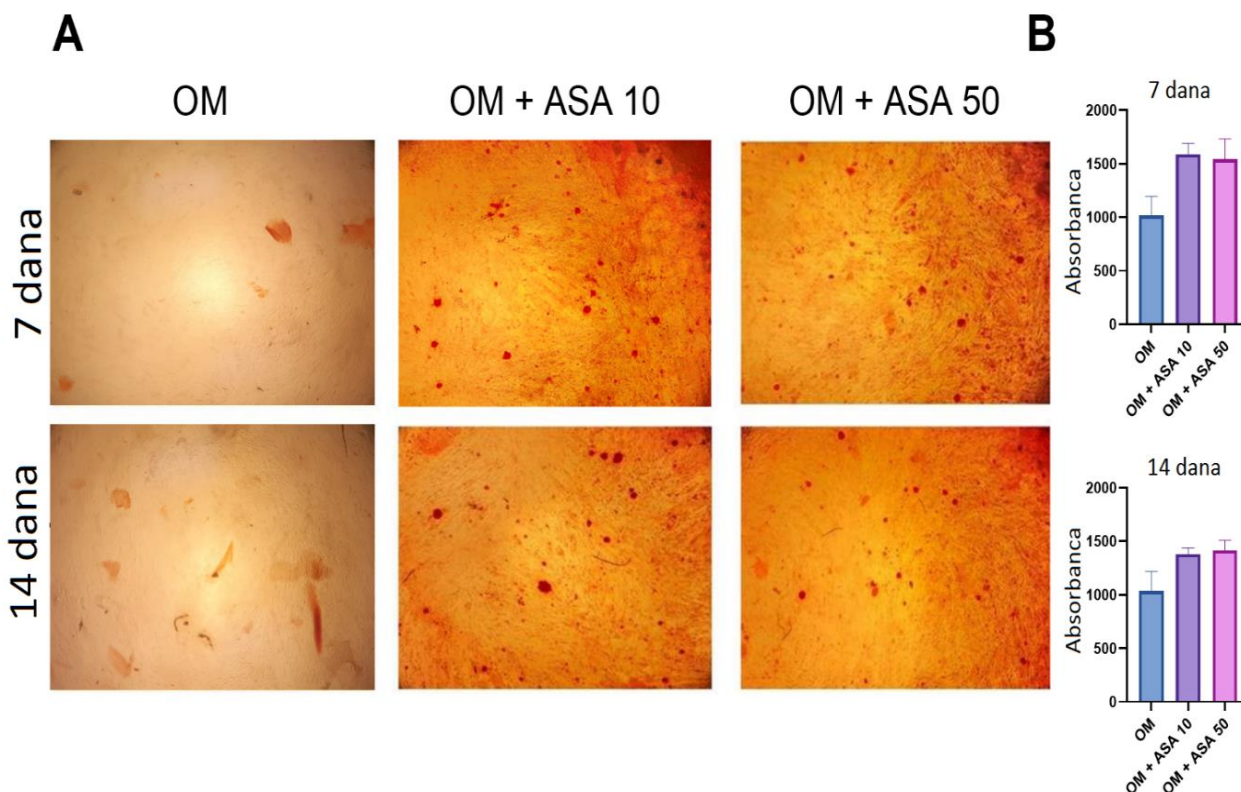
Slika 12. Testovi citotoksičnosti MTT i neutralne crvene boje. * $P \leq 0,05$ Kontrola – DPSC kultivisan u kompletnom medijumu bez tretmana ASA; ASA 10 - DPSC kultivisan u kompletnom medijumu sa 10 $\mu\text{g/ml}$ acetilsalicilne kiseline; ASA 50 – DPSC kultivisan u kompletnom medijumu sa 50 $\mu\text{g/ml}$ acetilsalicilne kiseline; ASA 100 - DPSC kultivisan u kompletnom medijumu sa 100 $\mu\text{g/ml}$ acetilsalicilne kiseline.

Zanimljivo je da je najniža koncentracija ASA (10 $\mu\text{g/ml}$) indukovala ćelije da proliferišu - vijabilnost ćelija je bila veća u poređenju sa kontrolom (102,1 % MTT test, 111,1 % NR test), ali bez statistički značajne razlike (**Slika 12**). Ipak, zbog smanjene vijabilnosti ćelija tretiranih sa najvećom dozom ASA i povećane vijabilnosti ćelija tretiranih sa najnižom dozom ASA, statistički značajna razlika se pojavila između ove dve ispitivane grupe. Zbog smanjene vijabilnosti DPSC u kulturama tretiranim sa 100 $\mu\text{g/ml}$ ASA, ova koncentracija je isključena iz daljih eksperimenata.

7.2.2 ASA indukuje osteo/odonto-diferencijaciju

Da bi se procenio efekat ASA na osteo/odontogeni potencijal ćelija, DPSC kulture su tretirane sa dve koncentracije ASA (10 i 50 $\mu\text{g/ml}$) tokom 7 i 14 dana. Niske doze ASA su

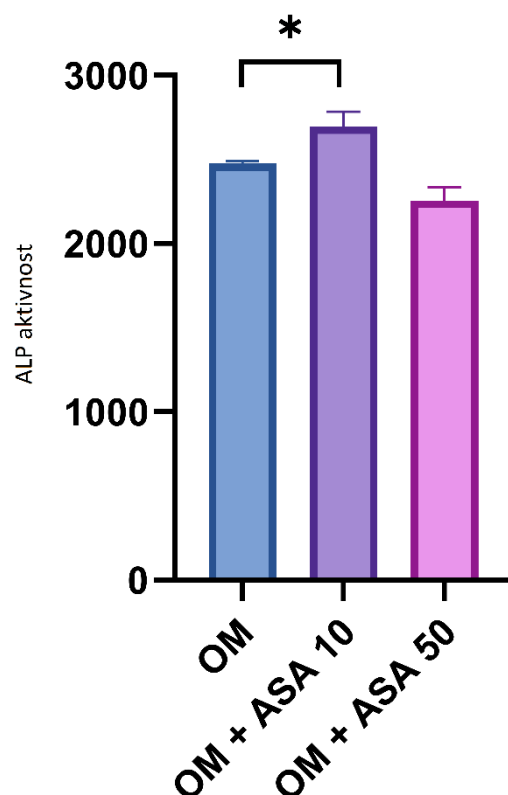
poboljšale osteogenu/odontogenu diferencijaciju DPSC „*in vitro*“, na šta ukazuju veća količina mineralizovanih nodularnih formacija u tretiranim, u odnosu na netretirane ćelije, nakon njihovog bojenja Alizarin Red-om (**Slika 13**). Nije bilo značajne razlike u pokazanom efektu na diferencijaciju između dve doze ASA, ali je ona svakako bila izraženija u odnosu na ćelije koje su kultivisane samo u osteogenom medijumu (OM). Drugim rečima, kombinacija OM sa ASA poboljšala je formiranje mineralizovanih nodula.



Slika 13. (A) Bojenje Alizarin crvenom, uvećanje 40 ×; (B) Kvantifikacija bojenja, **OM**-DPSC kultivisane u osteogenom medijumu; **OM + ASA 10** - DPSC kultivisane u osteogenom medijumu sa 10 µg/ml acetilsalicilne kiseline; **OM + ASA 50** - DPSC kultivisane u osteogenom medijumu sa 50 µg/ml acetilsalicilne kiseline.

7.2.3 ASA stimuliše aktivnost ALP

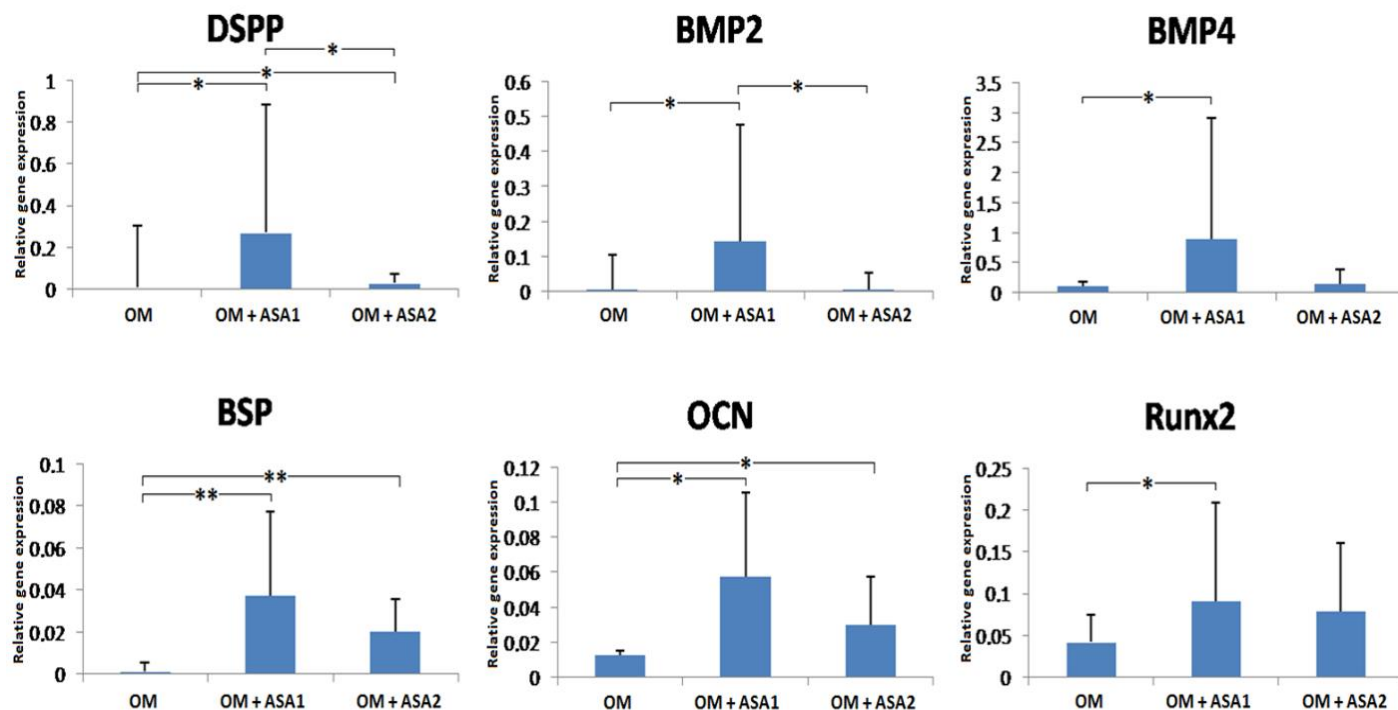
Niže koncentracije ASA (10 µg/ml), imale su bolji efekat na aktivnost ALP u poređenju sa višim koncentracijom ASA. Naime, aktivnost ALP je bila statistički značajno povišena ($P \leq 0,05$) u ćelijskim kulturama tretiranim nižom koncentracijom ASA (10 µg/ml) nego u kontrolnim kulturama, tj. onima koje su gajene samo u osteogenom medijumom (**Slika 14**). DPSC kultivisane sa višom dozom (50 µg/ml ASA) su imale manju ALP aktivnost u poređenju sa kontrolnom grupom, međutim, bez dostizanja statistički značajne razlike ($P = 0,56$).



Slika 14. ALP aktivnost DPSC posle 7 dana osteo/odontogene diferencijacije. * $P \leq 0.05$, **OM**-DPSC kultivisan u osteogenoj podlozi; **OM + ASA 10** - DPSC kultivisan u osteogenoj sredini sa 10 $\mu\text{g/ml}$ acetilsalicilne kiseline; **OM + ASA 50** - DPSC kultivisan u osteogenom medijumu sa 50 $\mu\text{g/ml}$ acetilsalicilne kiseline.

7.2.4 ASA povećava ekspresiju osteo/odontogenih markera

Niske doze ASA (10 odnosno 50 $\mu\text{g/ml}$) značajno su poboljšale ekspresiju nivoa markera osteo/odontogene diferencijacije (**Slika 15**). Ekspresija DSPP gena bila je 33,1 puta veća u ćelijskoj kulturi tretiranoj sa 10 $\mu\text{g/ml}$ ASA i 9,4 puta viša u kulturama tretiranim sa 50 $\mu\text{g/ml}$ ASA u poređenju sa kontrolom (OM). Sličan obrazac povećanja ekspresije primećen je za sve proučavane gene. U poređenju sa kontrolom, tretman sa 10 $\mu\text{g/ml}$ ASA značajno ($P \leq 0,05$) je povećao nivo ekspresije BMP2 (16,7 puta), BMP4 (8,5 puta), BSP (29,4 puta), OCN (4,6 puta) i RUNX2 (2,1 puta). Pored toga, ćelije tretirane sa 10 $\mu\text{g/ml}$ ASA su pokazale statistički značajno viši nivo ekspresije BMP2 u poređenju sa 50 $\mu\text{g/ml}$ ASA tretiranim DPSCs (**Slika 15**).

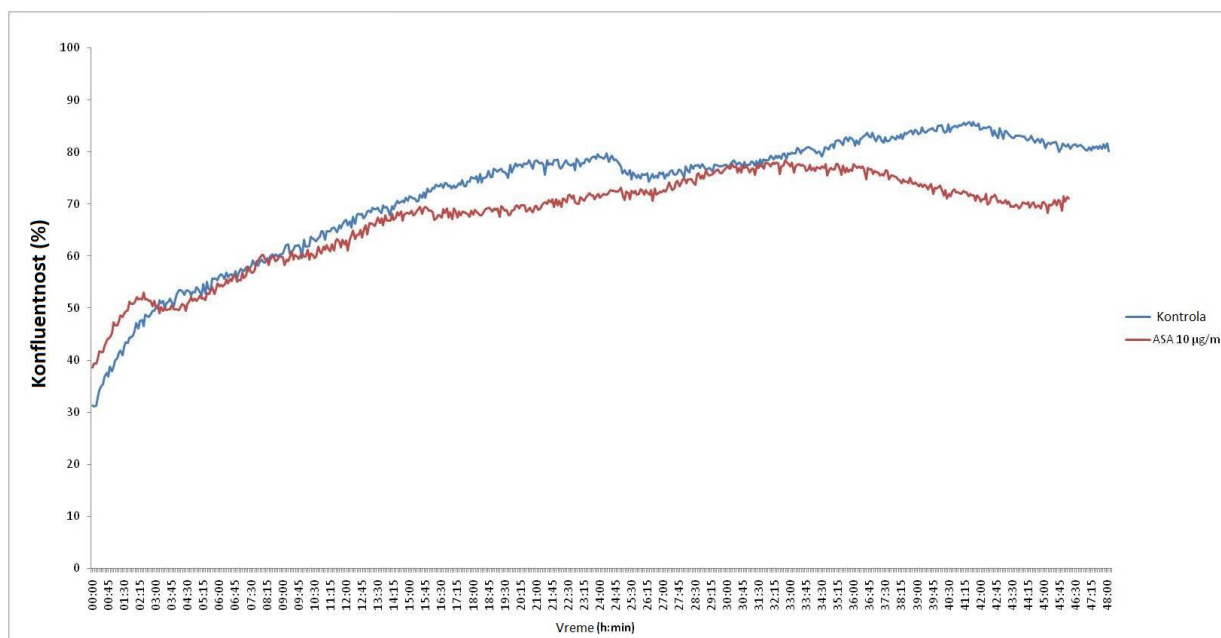


Slika 15. Nivo ekspresije markera osteo/odontogene diferencijacije u DPSC kulturama. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$ OM - DPSC kultivisane u osteogenom medijumu; OM+ ASA 10 - DPSC kultivisane u osteogenom medijumu sa 10 $\mu\text{g/ml}$ acetilsalicilne kiseline; OM + ASA 50 - DPSC kultivisane u osteogenom medijumu sa 50 $\mu\text{g/ml}$ acetilsalicilne kiseline.

7.3. Uticaj ASA na ćelijsku proliferaciju i diferencijaciju

7.3.1 Uticaj ASA na proliferaciju

Da bi se procenilo da li tretman sa ASA stimuliše diferencijaciju ili proliferaciju DPSC, primenjen je test proliferacije ćelija. Test je pokazao postepeno povećanje broja ćelija, tokom trajanja eksperimenta, kako u kontrolnim tako i u tretiranim ćelijama (**Slika 16**).



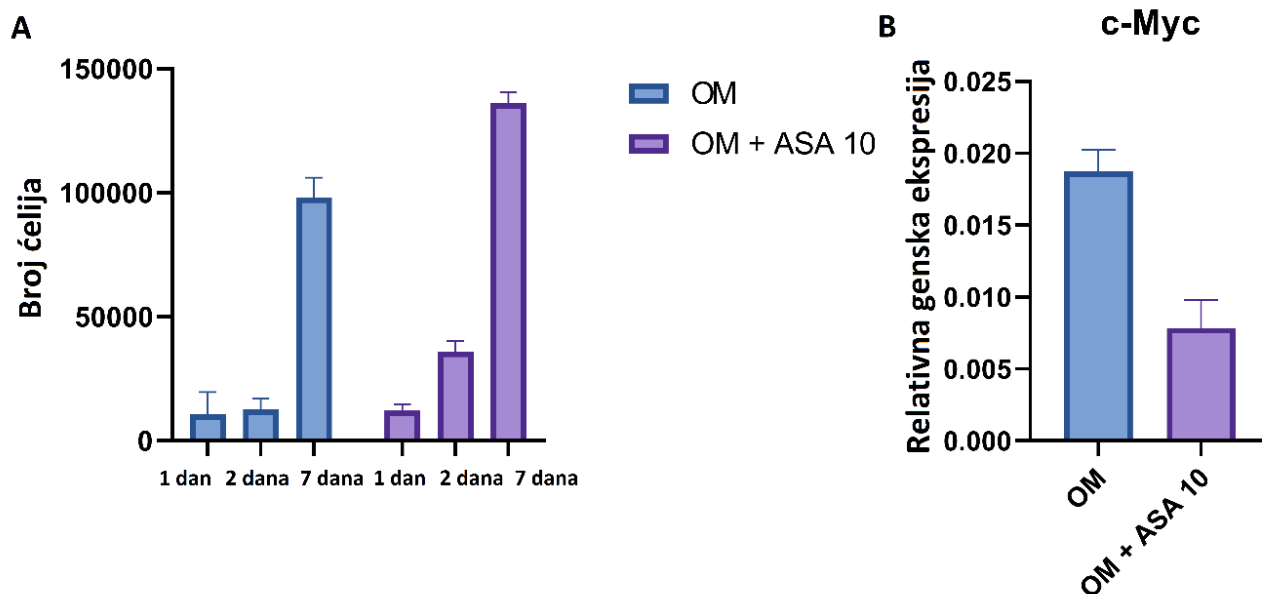
Slika 16. Uticaj ASA na proliferaciju DPSC.

U tri ponovljena eksperimenta, brojanjem ćelija, ustanovljeno je da je povećanje njihovog broja sveukupno izraženije u kulturama tretiranim sa ASA (10 µg/ml), iako u prvim danima eksperimenta to nije očigledno. Tačnije, tokom kultivacije prisutne su određene oscilacije u broju ćelija u obe kulture (sa i bez ASA- **Slika 16**), i svakako se u prvim danima ne uočava nikakva razlika u broju između kontrole i tretiranih ćelija. Do značajnijeg porasta broja ćelija dolazi između drugog i sedmog dana, i taj porast je izraženiji u ćelijama tretiranim ASA, mada se ni nakon sedam dana ne dostiže statistička značajnost u razlici (**Slika 17a**).

7.3.2 Uticaj ASA na diferencijaciju ćelija

Da bi se ustanovilo da li ASA ima prevashodno uticaj na proliferaciju ili na diferencijaciju matičnih ćelija zubne pulpe, ispitano je nivo ekspresije c-Myc gena, s obzirom da je poznato da je proces proliferacije praćen povećanjem ekspresije c-Myc-a, a proces diferencijacije njenim smanjenjem. Zanimljiv je nalaz da ASA, uporedo sa pospešivanjem proliferacije, pospešuje i diferencijaciju, iako su ova dva procesa često suprotstavljena.

Dakle, pod dejstvom ASA, uporedo sa porastom broja ćelija, odigrava se i proces diferencijacije na šta ukazuje smanjenje nivoa ekspresije c-Myc (**Slika 17b**). Drugim rečima ASA pospešuje, različitim mehanizmima, i proliferaciju i diferencijaciju matičnih ćelija zubne pulpe.



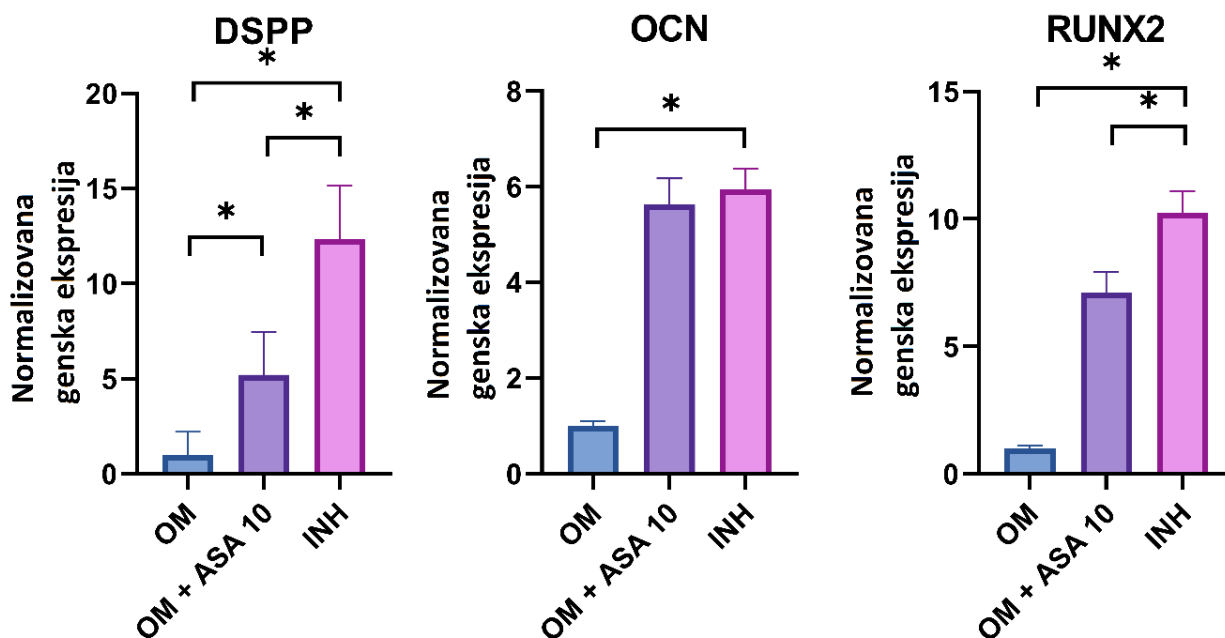
Slika 17. (a) Test ćelijske proliferacije i (b) relativni nivoi ekspresije c-Myc. **OM** - DPSC kultivisane u osteogenom medijumu; **OM + ASA 10** - DPSC kultivisane u osteogenom medijumu sa 10 ug/ml acetilsalicilne kiseline.

7.3.3 Mehanizam delovanja ASA i AMPK inhibicija

Pošlo se od pretpostavke da se efekat ASA možda ostvaruje preko AMP-aktivirane protein kinaze (AMPK), odnosno, njene signalizacione kaskade, i u svrhu utvrđivanja tačnosti naše pretpostavke, u ćelijske kulture dodat je inhibitor AMPK, dorsomorfin. Efekat inhibicije AMPK bio je procenjen ekspresijom tri odabrana gena: DSPP, OCN i RUNX2 (**Slika 18**). Zanimljivo, suprotno očekivanjima, AMPK inhibicija je pojačala ekspresiju sva tri gena, što navodi na zaključak da mehanizam delovanja ASA ne podrazumeva AMPK signalni put.

Pored toga, genska ekspresija je bila veća kada je uključen i tretman sa ASA (INH+OM+ASA). Naime, DSPP je pokazao statistički značajnu razliku ($P \leq 0,05$) između sve tri grupe: ćelije u osteogenom medijumu (OM) naspram ćelija u OM sa dodatkom 10 $\mu\text{g/ml}$ ASA (OM + ASA 10), naspram ćelija sa inhibitorom AMPK (INH). RUNX2 je pokazao statističku razliku između ćelija kultivisanih u OM u odnosu na ćelije kultivisane sa AMPK inhibitorom, kao i između OM + ASA 10 $\mu\text{g/ml}$ indukovanim ćelijama u odnosu na INH grupu. Konačno,

OCN je pokazao razliku ($P \leq 0,05$) samo između ćelija uzgajanih u OM i ćelija uzgajanih sa AMPK inhibitorom.



Slika 18. Efekat inhibicije AMPK na ekspresiju markera osteo/odonto-diferencijacije u DPSC kulturama. * $P \leq 0.05$; **OM** - DPSC kultivisane u osteogenoj podlozi; **OM + ASA 10** - DPSC kultivisane u osteogenom medijumu sa 10 µg/ml acetilsalicilne kiseline; **INH** - DPSC kultivisane u osteogenom medijumu sa 10 µg/ml acetilsalicilne kiseline i tretirane inhibitorom AMPK; **OM** - osteogeni medijum; **ASA** - acetilsalicilna kiselina.

8. DISKUSIJA

Polazne osnove studije

Kako je u Uvodu već istaknuto, skorašnje studije pokazale su da acetilsalicilna kiselina može da se dovede u vezu sa koštanim sistemom čoveka, odnosno, sa procesom osteogeneze. Acetilsalicilna kiselina (ASA), poznatija kao aspirin, je više od jednog veka veoma široko primenjivan nesteroidni antiinflamatorni lek, pre svega, zbog svog analgetičkog, antipiretičkog i antiinflamatornog delovanja, ali, isto tako i zbog antiagregacionog, odnosno, antitromboznog efekta. Aspirin takođe spada u najčešće prepisivane i prodavane lekove globalno. Efekti ASA posledica su inhibicije enzima ciklooksigenaze (COX) i posledičnog sniženja nivoa prostaglandina i tromboksana. Poznato je da je ASA, za razliku od diklofena i ibuprofena, nepovratan inhibitor enzima ciklooksigenaze (COX 1/COX 2). Naime aspirin dovodi do acetilacije serina u aktivnom mestu enzima ciklooksigenaze i njegove ireverzibilne inaktivacije. Prostaglandini, hormonima slični molekuli, ekspimirani su u gotovo svim tkivima, a pored inflamatornog dejstva imaju i brojna druga, koja zavise od toga koji je prostaglandin u pitanju i preko kojih receptora se ostvaruje dejstvo. Mogu da se ponašaju vazodilataciono i bronhodilataciono, ali i bronhokonstrikciono; uključeni su i u razvoj alergijskih oboljenja, deluju kako na mišićnu kontrakciju tako i na mišićnu relaksaciju. Između ostalog, ovi multifunkcionalni regulatori utiču i na proces osteogeneze (Knippenberg et al., 2006). Tako je ustanovljeno da ASA povoljno utiče na gustinu kosti muškaraca, kao i žena u post-menopauzi (Carbone LD, et al., 2003). Istovremeno je na animalnom modelu utvrđeno da ASA, preko uticaja na osteogenu diferencijaciju mezenhimalnih matičnih ćelija, ima povoljan efekat na ubrzavanje zarastanja koštanih defekata kalvarije (Cao Y, et al., 2015).

Dve studije su se posebno bavile efektom ASA na dentalne matične ćelije. Jedna studija je pokazala pozitivno dejstvo ASA na osteogenu diferencijaciju matičnih ćelija mlečnih zuba (Liu Y, et al., 2015), a druga studija da ASA isto tako pospešuje i osteogenu diferencijaciju matičnih ćelija zubne pulpe (Yuan M, et al., 2018). Liu i saradnici su ustanovili da niže doze ASA stimulišu osteogenu diferencijaciju i imunomodulaciju SHED. Zanimljivo je da su ovaj efekat aspirina na regeneraciju kosti povezali sa delovanjem ASA na porast ekspresije telomeraza-reverzne transkriptaze (TERT)/Wnt/beta katenin signalnog puta. Yuan i saradnici su nakon opsežne karakterizacije DPSC i nakon dokazivanja da ASA u koncentracijama ispod 100 µg/ml nema citotoksični efekat, pokazali pozitivno dejstvo aspirina na osteogenu diferencijaciju. Ova studija u svom dizajnu podseća na našu, s tom razlikom da u pomenutoj studiji nije razmatran nijedan marker specifičan za odontogenu diferencijaciju, već isključivo markeri koji su zajednički i za osteo i za odonto-ćelijsku lozu.

Na ovom mestu treba istaći da problem ovih malobrojnih studija koje se bave uticajem ASA na osteo-odontogenu diferencijaciju upravo i leži u činjenici da se mnogi markeri odonto- i osteo-indukcije preklapaju, i da se ne može uvek sa sigurnošću napraviti distinkcija između jednih i drugih ćelija u kulturama.

Iz napred navedenog, jasno je da je podataka o uticaju ASA bilo na osteogenu, bilo na odontogenu diferencijaciju DPSC, a pogotovo o mehanizmima koji su u to uključeni, izuzetno malo.

Karakterizacija ćelija dobijenih iz zubne pulpe

DPSC čine heterogenu ćelijsku populaciju dobijenu iz pulpe stalnih zuba enzimskom digestijom ili eksplant metodom. DPSC ćelije se odlikuju visokom sposobnošću da se diferenciraju u višestruke stromalne ćelijske linije i visokim klonogenim potencijalom. DPSC su u stanju da adheriraju i razmnožavaju se u plastičnim posudama tokom standardnih uslova kultivacije ćelija. U uslovima „*in vivo*“, transplantacija u imunokompromitovane miševe pokazala je sposobnost DPSC-a da generišu zubna tkiva koja ekspresiraju gene tipične za odontoblastnu diferencijaciju (Carlos Estrela et al., 2011).

U ovom istraživanju, nakon izolacije ćelija zubne pulpe i njihove kultivacije eksplant metodom, pristupilo se temeljnoj karakterizaciji generisanih ćelijskih kultura nakon pete pasaže, primenom standardnih testova. Ćelije su, prema očekivanjima, pokazivale dobru adherenciju za plastičnu podlogu a takođe su pokazivale i izraženi klonogeni potencijal nakon 7 i 10 dana kultivacije. Pored toga, zapažen je i visok kapacitet proliferacije; već nakon 5 - 10 sati inkubacije broj ćelija u kulturama bio je udvostručen, dok je nakon 6 - 7 dana bio povećan za oko 5 puta. Migratorni potencijal DPSC određen je testom zarastanja rana (Scratch Wound Healing Assay) i on je pokazao da je već nakon 48 h došlo do zatvaranja prostora između razdvojenih ćelija, što svedoči o njihovoj izraženoj pokretljivosti.

Nakon testova proliferacije, migracije i formiranja kolonija, potvrđena je i multipotentnost ćelija pulpe, tako što su u odgovarajućim medijumima uspešno indukovane u pravcu hondrogene, adipogene i neurogene loze. Uspešna indukcija pokazana je primenom svetlosne mikroskopije i proverom prisustva specifičnog bojenja (za hondrovenu i adipogenu lozu), odnosno odgovarajućom morfologijom (prisustvo izduženih citoplazmatskih nastavaka - za neurovenu lozu). Test multipotentnosti predstavlja jedan od ključnih dokaza matičnosti i ćelije dobijene iz zubne pulpe ispoljavaju ovu fundamentalnu karakteristiku, tako da su dobijeni rezultati, naravno, bili očekivani i u saglasnosti sa brojnim prethodnim studijama (Kawashima N, 2012; Ferro F, et al., 2014; Cao Y, et al., 2015; Simonovic J, et al., 2018).

Konačno, primenom protočne citometrije, analiza markera specifičnih za mezenhimalne matične ćelije, CD73, CD90 i CD105, pokazala je njihovu ekspresiju u preko 90% ćelija (CD73 u 92,27%, CD90 u 90,03% i CD105 u 93,76%). Uporedo sa visokom ekspresijom mezenhimalnih markera, ekspresija markera hematopoetskih matičnih ćelija, CD45 i CD34, je praktično izostala, tj., utvrđena je u manje od 3.00 % ćelija (CD34 u 2,6 % i CD45 u 0,57 %), čime je nedvosmisleno potvrđena mezenhimalna priroda matičnih ćelija dobijenih iz zubne pulpe. Imunofenotipizacija DPSC bila je takođe u skladu sa očekivanjima i potvrdila nalaze drugih autora (Ferro F, et al., 2012; Karamzadeh R, et al., 2016; Simonović J, et al., 2018).

Uticaj ASA na osteo/odontogenu diferencijaciju DPSC

Pre ove disertacije, samo je jedna studija ukazala na mogućnost da ASA indukuje odontogenu diferencijaciju DPSC (Rankin R, et al., 2020). Ovi autori su bioinformatičkim pristupom pretražili *Gene Expression Omnibus* (GEO) bazu podataka i na osnovu specifičnog profila genske ekspresije tokom odontogene diferencijacije, metodom mapiranja veza (*Connectivity mapping*) sa različitim hemijskim komponentama, predvideli pozitivan uticaj aspirina na odontogenezu. Analizom više markera osteo/odontogene diferencijacije (ALP, RUNX2, COL1A1, DSPP, DMP1 i SPP1), autori su u tom istom radu potvrdili svoja teorijska predviđanja delovanja ASA.

Za potrebe ove disertacije i ispitivanja efekta ASA na odontogenezu, dizajn studije je bio prilagođen, na prvom mestu, farmakološkim dozama ASA, koje se standardno koriste u profilaksi kardiovaskularnih oboljenja, ali i studiji Liu i sar. (2015), koji su, ispitujući efekat različitih koncentracija ASA (10-200 µg/ml) na osteogenu stimulaciju matičnih ćelija poreklom iz mlečnih zuba (SHED), pokazali da samo niske koncentracije ASA (10 i 50 µg/ml), ali ne i visoke (200 µg/ml), značajno utiču na osteogenu diferencijaciju.

U našoj studiji, najniža koncentracija ASA (10 µg/ml) pokazala je pozitivan efekat na kulture DPSC, odnosno indukovala je ćelijsku proliferaciju. MTT i NR testovima urađenim 24 h nakon izlaganja ćelija aspirinu, utvrđena je povišena vijabilnost u poređenju sa kontrolom (koja je postavljena na vrednost 100%); u kulturi sa 10 µg/ml ASA vijabilnost je iznosila 102 % (MTT test), odnosno 111% (NR test). Ovaj rezultat je bio u skladu sa nalazima Liu i saradnika (2015). Doze od 50 µg/ml i 100 µg/ml izazvale su blago sniženje vijabilnosti, pri čemu je pri dozi od 50 µg/ml to smanjenje bilo zanemarljivo.

Dalje, da bi se procenio efekat ASA na osteo/odontogeni potencijal ćelija, DPSC kulture su tretirane sa dve koncentracije ASA (10 i 50 µg/ml) tokom 7 i 14 dana. Niske doze ASA su značajno poboljšale osteogenu/odontogenu diferencijaciju DPSC „*in vitro*“, na šta ukazuju veća količina mineralizovan nodularnih formacija u tretiranim, u odnosu na netretirane ćelije, nakon njihovog bojenja Alizarin Red-om. Nije bilo statistički značajne razlike u pokazanom efektu na diferencijaciju između dve doze ASA, ali je mineralizacija svakako bila izraženija u odnosu na ćelije koje su kultivisane samo u osteogenom medijumu. Drugim rečima, kombinacija osteogenog medijuma i aspirina pospešila je formiranje mineralizovanih nodula.

Efekat ASA na osteo/odontogenu diferencijaciju procenjen je i određivanjem aktivnosti alkalne fosfataze (ALP), bitnog enzima u metabolizmu fosfata i stvaranju koštanog matriksa koji prethodi procesu osifikacije. Niže koncentracije ASA (10 µg/ml), imale su bolji efekat na aktivnost ALP u poređenju sa višim koncentracijama ASA. Naime, aktivnost ALP je bila statistički značajno povišena u ćelijskim kulturama tretiranim nižom koncentracijom ASA (10 µg/ml) nego u kontrolnim kulturama, dok su DPSC kultivisane sa višom dozom (50 µg/ml ASA) pokazivale nešto manju ALP aktivnost u poređenju sa kontrolnom grupom, ali, bez statistički značajne razlike. Liu i saradnici su takođe utvrdili da niske doze aspirina (10 i 50 µg/ml), povećavaju ekspresiju ALP, odnosno, postoji saglasnost između naših i njihovih rezultata. I drugi autori su pokazali da niske doze aspirina utiču na porast nivoa ALP-a, tj. imaju pozitivan efekat na osteogenu diferencijaciju, kao i na ćelijsku proliferaciju. Tako je Du sa saradnicima, na životinjskom modelu i na mezenhimalnim matičnim ćelijama, utvrdio da doze čak i od 1 µg/ml

(pored doze od 10 µg/ml) stimulišu ALP aktivnost, dok visoke doze (100µM i 1000µM) imaju inhibitorski efekat na ALP i dovode do zaustavljanja ćelijske proliferacije (Mi Du, et al., 2016).

Nakon ovih bazičnih testova, urađena je analiza ekspresije ključnih markera osteo/odontogeneze: DSPP, BMP2, BMP4, BSP, OCN i RUNX2. Svih šest ispitivanih markera pokazalo je više nivo ekspresije u kulturama DPSC tretiranim sa ASA u odnosu na DPSC gajene samo u osteogenom medijumu. Treba napomenuti da je postojala statistički značajna razlika kada su poređene ekspresije između kontrolnih ćelija i ćelija tretiranih nižom dozom ASA (10 µg/ml), dok razlika između kontrola i DPSC tretiranih višom dozom ASA (50 µg/ml) nije uvek bila statistički značajna.

Od ispitivanih markera, najviši nivo u tretiranim ćelijama pokazali su BMP2 i BMP4. DPSC koje su rasle u medijumu sa niskom dozom ASA imale su 17 puta veću ekspresiju BMP2 i 8 puta veću ekspresiju BMP4 u odnosu na netretirane ćelije, što ukazuje na izražen stimulatorni efekat ASA. Iako mehanizmi koji leže u osnovi formiranja reparativnog dentina nisu u potpunosti razjašnjeni, poznato je da proteini kao što su koštani morfogenetski proteini (bone morphogenetic proteins-BMP), igraju važnu ulogu u ovom procesu. Koštani morfogenetski proteini su članovi transformišućeg faktora rasta (TGF)-beta familije. BMP-ovi su prvobitno identifikovani kao regulatori formiranja hrskavice i kostiju (Urist, 1965), igraju važnu ulogu u embriogenezi i morfogenezi različitih organa i tkiva, uključujući i zube. BMP su čak odobreni za lečenje preloma kostiju od strane Food and Drug Administration u SAD. Morfogenetski signalni molekuli se vezuju za specifične membranske receptore i indukuju kaskadu procesa koji rezultuju stvaranjem novog tkiva. Kao faktori rasta, oni kontrolišu aktivnost matičnih ćelija, npr. regulisanjem stope proliferacije, izazivanjem diferencijacije u drugi tip ćelija, itd. Ovi molekuli igraju ključnu ulogu u formiranju i reparaciji dentina i pulpe. Značajno je da je dentinski matriks rezervoar faktora rasta koji mogu da, nakon mobilizacije, stimulišu tkivni odgovor, između ostalog i formiranje tercijarnog dentina.

Faktori rasta BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 i Gdf11 igraju veoma bitnu ulogu u biologiji ćelija pulpe. Studije su pokazale da je ekspresija BMP-2 povećana tokom terminalne diferencijacije odontoblasta, pa bi se tako na osnovu naših rezultata moglo zaključiti da ASA pospešuje terminalnu fazu procesa odontogeneze. Primećeno je takođe da je BMP-2 izolovan iz dentina neophodan za diferencijaciju SHED-a u odontoblaste (L. Casagrande et al., 2010), a isti signalizacioni efekat uočen je i u slučaju DPSC (Demarco et al., 2010). Poput BMP2, i BMP4 je protein sa bitnim funkcijama u morfogenezi zuba i diferencijaciji odontoblasta, s obzirom da je u stanju da suprimira efekat različitih inhibitora razvića zuba prisutnih u zubnom mezenhimu, kao što su Dkk2 i Osr2 (Shihai Jia et al., 2013). Takođe je pokazano da proces odontogeneze, po pravilu, podrazumeva povišene nivo BMP4 (Ziheng Yan et al., 2019), što opet govori u prilog činjenici da ASA pospešuje odontogenezu, s obzirom da dovodi do povećanja nivoa BMP4.

Pored BMP2 i BMP4, dva proteina koja su podjednako važna i za osteo i za odontogenezu, analiziran je i marker specifičan za samu odontogenu diferencijaciju - DSPP. Dentin sijaloprotein (DSP) i fosforin (PP) su proizvodi razgradnje dentin sijalofosfoproteina (DSPP) i predstavljaju dva najzastupljenija nekolagena proteina dentina. U animalnom modelu, nedostatak gena za DSPP rezultuje izgledom zuba koji bi odgovarao dentinogenezi imperfekti kod ljudi, dok mutacije u ovom genu kod ljudi vode pojavi *Dentinogenesis imperfecta* tip II i tip III. Ovi proteini igraju ključnu ulogu u mineralizaciji matriksa. I DSPP je u našoj studiji bio jedan od markera sa najvišim nivoom ekspresije, ali isključivo u ćelijama koje su rasle u

medijumu sa dodatkom niske doze (10 µg/ml) ASA. Nivo DSPP-a je bio uvećan čak 33 puta u kulturama DPSC koje su rasle u prisustvu ASA u odnosu na ćelije uzgajane samo u osteogenom medijumu. Rezultati naše i studije Rankina i sar. (Rankin R et al., 2020) su podudarne u smislu ekspresije DSPP nakon primene ASA. Naime, i oni su ustanovili da dolazi do značajnog povećanja ekspresije DSPP-a u ćelijama pulpe nakon izlaganja niskim dozama ASA. Međutim, treba ipak istaći i razliku između njihove i naše studije, a to je da su njihovi eksperimenti rađeni na celokupnoj populaciji ćelija pulpe a naši eksperimenti su podrazumevali kultivisane matične ćelije zubne pulpe. Pored toga, ovi autori se nisu bavili potencijalnim mehanizmima delovanja ASA na ćelije pulpe, već su ispitivali efekat aspirina na inflamatorne citokine i matriksne metaloproteinaze i konstatovali da njihov nivo značajno opada u ćelijama podvrgnutim tretmanu aspirinom.

RUNX2 gen je takođe pokazao povišen nivo ekspresije u ćelijama tretiranim niskim dozama ASA. I ovaj nalaz je u skladu sa rezultatima Liu i saradnika kao i Khampatee i saradnika, koji su utvrdili da niske doze aspirina povećavaju ekspresiju RUNX2 (Liu Y, et al., 2022; Khampatee et al., 2022). Slični efekat ASA na porast nivoa RUNX2 dobijeni su i na životinjskim modelima (Du M, et al, 2016). Treba ipak naglasiti da je porast nivoa RUNX-a u ćelijama izloženim ASA bio relativno skroman - dva puta, što je manje nego za sve ostale ispitivane markere. Ipak je i ovaj porast bio statistički značajan. Produkt RUNX2 gena je transkripcioni faktor koji reguliše ekspresiju više gena od ključnog značaja za osteogenezu i skeletogenezu, a nalaze se nizvodno u signalizacionoj kaskadi. To su geni za osteokalcin, kolagen tipa 1, koštani sijaloprotein, osteopontin i alkalnu fosfatazu. Takođe, aktivira i gen za transkripcioni faktor osteriks koji i sam dalje reguliše više gena bitnih za diferencijaciju preosteoblasta u zrele osteoblaste i osteocite. Iako statistički značajan, efekat ASA na produkciju Runx-a je ipak manji nego na ostale markere.

Koštani sijaloprotein (bone sialoprotein-BSP) je u našoj studiji imao relativno nizak nivo ekspresije u odnosu na ostale markere osteo- i odontogeneze. Međutim, kultivacija ćelija u prisustvu ASA dovela je do velikog skoka u ekspresiji i ovog markera - čak 29 puta je porastao nivo BSP-a u kulturama DPSC sa niskom dozom ASA u odnosu na nivo u ćelijama koje su kultivisane samo u osteogenom medijumu. BSP je još jedan u nizu proteina sa važnom ulogom u mineralizaciji matriksa dentina, cementa zuba, kostiju i kalcifikovane hrskavice. Uključen je u regulaciju formiranja hidroksiapatitnih kristala u kostima i zubima, a nivo mu raste pri mehaničkoj stimulaciji ćelija.

Konačno, i ekspresija gena za osteokalcin (OCN) je bila relativno niska, u rangui ekspresije BSP, ali isto tako i statistički značajno viša nakon tretmana DPSC sa ASA. Porast ekspresije iznosio je 5 puta, pri niskoj dozi aspirina. I ovaj gen, odnosno njegov produkt, smatra se važnim markerom osteo- i odontogeneze. Njegova ekspresija je usko ograničena na ćelije zadužene za mineralizaciju kao što su osteoblasti, odontoblasti i cementoblasti. I on reguliše sposobnost ćelija da vrše mineralizaciju, odnosno, produkuju mineralne nodule. Međutim, i dalje ne postoji konsenzus u naučnim krugovima u pogledu vremena aktivacije ovog gena. Naime, neki autori ekspresiju OCN gena smatraju ranim događajem osteo-odontogeneze (Nakamura A, et al., 2009), dok ga drugi svrstavaju u kasne događaje (Aubin JE, 2001) ili čak terminalne (Zhang W, et al., 2008). Međutim, do sada nijedan od radova koji su ispitivali efekata ASA na osteo-odontogenezu nije analizirao ovaj marker, tako da je nemoguće poređenje naših rezultata sa literaturnim.

Na kraju treba spomenuti i da su stariji radovi, s kraja devedesetih godina prošlog veka, dolazili do rezultata koji se donekle kose sa današnjim, u smislu da su smatrali da aspirin negativno utiče na procese osteogeneze (Khokher MA i Dandona P, 1988; Trancik T, et al., 1989).

Mehanizmi delovanja ASA

Da bismo istražili potencijalne molekularne mehanizme osteo/odontogenih efekata ASA, ispitali smo efekat ASA u prisustvu široko korišćenog inhibitora AMPK (dorzomorfina). Iznenadjuće, primena dorzomorfina *per se* rezultirao je povećanjem ekspresije gena markera odontogeneze, dok sa druge strane, nije smanjio već pojačao osteo/odontogeni kapacitet DPSC izazvan primenom ASA. Ovo implicitno znači da AMPK aktivacija nije mehanizam putem kojeg ASA indukuje osteo/odontogenu diferencijaciju, pošto sama inhibicija AMPK nije smanjila efekat ASA. Najverovatnije, efekti ASA na DPSC su povezani sa njenim glavnim mehanizmom delovanja, odnosno COX1/COX2 inhibicijom i posledičnom inhibicijom prostaglandina. Naime, pokazano je da PGE₂ i prostaciklin, produkti aktivnosti COX1/COX2, snižavaju markere osteogene aktivnosti; smanjena je aktivnost ALP kao i ekspresija RUNX2 gena u mezenhimalnim matičnim ćelijama (Knippenberg et al., 2006). Takođe je pokazano da prostaglandin E2 narušava osteogenu diferencijaciju stromalnih ćelija koštane srži (Noack C, et al., 2015), što implicira da inhibicija prostaglandina od strane ASA može biti u osnovi uočene ASA-promocije osteogene diferencijacije u DPSC. Imajući u vidu da primena dorzomorfina smanjuje stvaranje prostaglandina E2, doduše u manjem stepenu u odnosu na ASA, sugerise da je uočeno povećanje osteogenih markera nakon primene samo dorzomorfina kao i njegov efekat na pojačanje osteo/odontogenog efekta ASA, može biti rezultat inhibicije stvaranja prostaglandina E2 (Kumar et al., 2018). Štaviše, ASA koncentracija koja snažno inhibira sintezu PgE2 *in vitro* je $\leq 100 \mu\text{M}$ (Boutaud O, et al., 2016), a koncentracije korišćene u ovoj studiji su bile unutar ovih granica.

Važno je napomenuti da u pogledu ASA inhibicije PGE2, drugi ciljni molekul c-MYC, takođe može biti od značaja za uočeni osteo/odontogeni efekat aspirina. C-Myc igra kritičnu ulogu u ćelijskoj proliferaciji i diferencijaciji, ali, i u ćelijskoj smrti (apoptozi), kao i u progresiji ćelijskog ciklusa i ćelijskoj transformaciji u procesu tumorigeneze. Generalno posmatrano, nivo ekspresije ovog ključnog transkripcionog faktora, produkta C-MYC gena, određuje sudbinu ćelije: viši nivoi će ćeliju usmeriti ka proliferaciji, a niži ka diferencijaciji. U ovoj studiji, ASA je indukovala smanjenje c-MYC-a, i tako favorizovala diferencijaciju nasuprot proliferacije. U nekim ranijim studijama pokazano je da ASA (mada u većim dozama nego u našoj studiji), smanjuje ekspresiju C-MYC gena, i na taj način ispoljava svoje antikancerogene efekte (Ai. G, et al., 2016). Ulogu C-MYC-a kao modulatora ćelijskog ponašanja, odnosno molekula na osnovu kog se DPSC opredeljuju za proliferaciju ili pak osteo/odonto-diferencijaciju, svakako treba dalje istražiti.

Budući pravci nekih daljih istraživanja, pored uvođenja novih inhibitora ASA u "*in vitro*" studijama, da bi se pouzdano utvrdili mehanizmi delovanja, mogli bi da budu, u kliničkim

uslovima, upotreba ASA u kombinaciji sa postojećim sredstvima za direktno ili indirektno prekrivanje pulpe; tako bi se pospešila odontogena diferencijacija i formiranje reparativnog dentina a takođe poboljšao i klinički ishod endodontskih tretmana.

U zaključku, niska koncentracija ASA, tačnije doza koja odgovara standardnoj upotrebi kod kardiovaskularnih pacijenata, pokazala je stimulativni efekat na osteo/odontogenu diferencijaciju matičnih ćelija zubne pulpe, upućujući na mogući klinički značaj ASA na očuvanje reparatorne sposobnosti zubne pulpe kod pacijenata na antiagregacionoj terapiji.

9. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima, a na osnovu dobijenih rezultata istraživanja, može se zaključiti sledeće:

Karakterizacija matičnih ćelija zubne pulpe:

- Eksplant metodom iz pulpe stalnih zuba uspešno se izoluju DPSC, koje tokom kultivacije zadržavaju sposobnost adhezije i proliferacije;
- DPSC izolovane iz pulpe stalnih zuba imaju visok klonogeni potencijal;
- Proliferativni kapacitet DPSC izolovanih iz pulpe stalnih zuba, određivan tokom kratkotrajnih kultura, izrazito je visok, s obzirom da je već nakon 5 - 10 sati inkubacije broj ćelija u kulturama bio dvostruko povećan, dok je nakon 6 - 7 dana bio povećan za oko 5 puta;
- Protočna citometrija je pokazala prisustvo markera mezenhimalnih matičnih ćelija u DPSC kulturama -CD73 , CD90 i CD105 markeri pokazali su ekspresiju u preko 90% ćelija dok je ekspresija hematopoetskih markera bila zanemarljiva;
- DPSC uzgajane u odgovarajućem medijumu za diferencijaciju su indukovane prema hondro, adipo i neuro-lozama, što potvrđuje njihovu multipotentnost;

Efekat ASA na ćelije zubne pulpe

- MTT i NR testovi su potvrdili izostanak citotoksičnosti ASA pri korišćenim dozama;
- ASA indukuje osteo/odonto-diferencijaciju - niske doze ASA značajno su poboljšale osteogenu/odontogenu diferencijaciju DPSC „*in vitro*“;
- ASA stimuliše aktivnost ALP pri čemu su niže koncentracije ASA imale bolji efekat na aktivnost ALP u poređenju sa višim koncentracijama ASA;
- ASA povećava ekspresiju gena osteo/odontogenih markera - niske doze ASA (10/50 µg/ml) su statistički značajno poboljšale ekspresiju nivoa markera osteo/odontogene diferencijacije DSPP, BMP2, BMP4, BSP, OCN i RUNX2, pri čemu se povećanje nivoa ekspresije, u zavisnosti od markera, kretalo između 2 i 33 puta;
- AMPK inhibicija nije dovela do smanjenja markera osteo/odontogene diferencijacije, što znači da mehanizam ASA nije posredovan aktivacijom AMPK;
- ASA dovodi do smanjenja ekspresije *C-MYC* gena, što znači da različitim mehanizmima, acetilsalicilna kiselina pospešuje i proliferaciju i diferencijaciju matičnih ćelija zubne pulpe.

10. LITERATURA

1. Abd Rahman F, Mohd Ali J, Abdullah M, et al. Aspirin Enhances Osteogenic Potential of Periodontal Ligament Stem Cells (PDLSCs) and Modulates the Expression Profile of Growth Factor-Associated Genes in PDLSCs. *J Periodontol*. 2016;87(7):837-47.
2. Ai, G., Dachineni, R., Muley, P., Tummala, H., & Bhat, G. J. (2016). Aspirin and salicylic acid decrease c-Myc expression in cancer cells: a potential role in chemoprevention. *Tumor Biology*, 37, 1727–1738. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3959-0>.
3. Aubin JE. Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord*. 2001;2:81-94. Doi: 10.1023/A:1010011209064.
4. Boutaud, O., Sosa, I. R., Amin, T., Oram, D., Adler, D., Hwang, H. S., ... Oates, J. A.(2016). Inhibition of the biosynthesis of prostaglandin E2 By low-dose aspirin: implications for adenocarcinoma metastasis. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pennsylvania)*, 9(11), 855–865. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-16-0094>.
5. Byung-Chul Kim, Hojae Bae, Il-Keun Kwon, Eun-Jun Lee, Jae-Hong Park, Ali Khademhosseini, and Yu-Shik Hwang (2012). Osteoblastic/Cementoblastic and Neural Differentiation of Dental Stem Cells and Their Applications to Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Dental Stem Cells-Based Tissue Engineering: Part B* 18(3): 235-244.
6. Cannon, J. G. (2006). Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th Edition, 2005. Xxiii + 2021× 26 cm. ISBN 0-07-142280-3. \$149.95. In L. Brunton, J. Lazo, & K. Parker (Eds.), *Journal of Medicinal Chemistry*, 49 p. 1222). McGraw Hill, New York. <https://doi.org/10.1021/jm058286b>, 2005.
7. Cao Y, Xiong J, Mei S, et al. Aspirin promotes bone marrow mesenchymal stem cell-based calvarial bone regeneration in miniswine. *Stem Cell Res Ther*. 2015; 6:210.
8. Carbone LD, Tylavsky FA, Cauley JA, et al. Association between bone mineral density and the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and aspirin: impact of cyclooxygenase selectivity. *J Bone Miner Res*. 2003;18(10):1795-802.

9. Carlos Estrela, Ana Helena Gonçalves de Alencar, Gregory Thomas Kitten, Eneida Franco Vencio, Elisandra Gava (2011). Mesenchymal Stem Cells in the Dental Tissues: Perspectives for Tissue Regeneration. *Braz Dent J* 22(2): 91-98.
10. Casagrande L, F.F. Demarco, Z. Zhang, F.B. Araujo, S. Shi, and J.E. Nör. Dentin-derived BMP-2 and Odontoblast Differentiation. *Journal of Dental Research*, Volume 89, Issue 6. <https://doi.org/10.1177/0022034510364487>.
11. d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, et al. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissueformation. *Cell Death Differ* 2007;14:1162-1171.
12. d'Aquino R, Papaccio G, Laino G, Graziano A. Dental pulp stemcells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev* 2008;4:21-26.
13. Das S, Bellare JR. Dental Pulp Stem Cells in Customized 3D Nanofibrous Scaffolds for Regeneration of Peripheral Nervous System. *Methods Mol Biol.* 2018; doi: 10.1007/7651_2018_194.
14. Demarco F, Conde M, B Cavalcanti B, et al. Dental Pulp Tissue Engineering. *Braz Dent J.* 2011;22(1):3–13.
15. Ferro F, Spelat R, Beltrami AP, Cesselli D, Curcio Fet, (2012). Isolation and Characterization of Human Dental Pulp Derived Stem Cells by Using Media Containing Low Human Serum Percentage as Clinical Grade Substitutes for Bovine Serum. *PLoS ONE* 7(11): e48945. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048945>.
16. Ferro F., Renza Spelat & Chelsea S. Baheney, (2014). Dental Pulp Stem Cell (DPSC) Isolation, Characterization, and Differentiation. *Stem Cells and Tissue Repair.* pp 91–115. DOI: 10.1007/978-1-4939-1435-7_8.
17. Goldberg M, Farges JC, Lacerda-Pinheiro S, Six N, Jegat N, Decup F, Septier D, Carrouel F, Durand S, Chaussain-Miller C, Denbesten P, Veis A, Poliard A. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res* 2008;58(2):137-47.

18. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Gehron Robey P, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13625–13630.
19. G.T.-J. Huang, S. Gronthos, and S. Shi. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs. Those from Other Sources: Their Biology and Role in Regenerative Medicine. *J Dent Res*. 2009; 88(9):792-806.
20. Hardie DG. AMPK and autophagy get connected. *EMBO J*. 2011 Feb 16; 30(4): 634–635. doi: 10.1038/emboj.2011.12.
21. Hardie DG, Schaffer BE, Brunet A. AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Inputs and Outputs. *Trends Cell Biol*. 2016;26(3):190-201.
22. Jung, Y. R., Kim, E. J., Choi, H. J., Park, J.-J., Kim, H.-S., Lee, Y.-J., & Lee, M. (2015). Aspirin targets SIRT1 and AMPK to Induce Senescence of Colorectal Carcinoma Cells. *Molecular Pharmacology*, 88(4), 708–719. <https://doi.org/10.1124/mol.115.098616>.
23. Karamzadeh Razieh, Mohamadreza Baghaban Eslaminejad, Reza Aflatoonian, (2012). Isolation, Characterization and Comparative Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells Derived from Permanent Teeth by Using Two Different Methods. *J Vis Exp*. doi: 10.3791/4372.
24. Kawashima N, (2012). Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? *Arch Oral Biol*. 57(11):1439-58. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.08.010.
25. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs* 2006;184:105-16.
26. Khokher MA, Dandona P (1988). The effect of indomethacin and aspirin on alkaline phosphatase secretion and [³H] thymidine incorporation by human osteoblasts. *BR J Rheumatol* 27, 291-294.

27. K. Hynes, D. Menichanin, R. Bright, S. Ivanovski, D.W. Hutmacher, S. Gronthos, and P.M. Bartold (2015). Induced Pluripotent Stem Cells: A New Frontier for Stem Cells in Dentistry. *Journal of Dental Research* 1-8.

28. Kim Hynes, Danijela Menicanin, Stan Gronthos & P. Mark Bartold (2012). Clinical utility of stem cells for periodontal regeneration. *Periodontology* 2000 59: 203-227.

29. Kim, K., Choi, S., Chang, J., Kim, S. M., Kim, S. J., Kim, R. J.-Y., ... Park, S. M. (2019). Severity of dental caries and risk of coronary heart disease in middle-aged men and women: A population-based cohort study of Korean adults, 2002-2013. *Scientific Reports*, 9(1), 10491. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47029-3>.

30. Knippenberg, M., Helder, M. N., Zandieh Doulabi, B., Wuisman, P. I. J. M., & Klein Nulend, J. (2006). Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342(3):902–908. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.052>.

31. Kumar, D., Rahman, H., Tyagi, E., Liu, T., Li, C., Lu, R., ... Grossman, D. Aspirin suppresses PGE(2) and activates AMP kinase to inhibit melanoma cell motility, pigmentation, and selective tumor growth In Vivo. *Cancer Prevention Research*. 2018; 11(10): 629–642. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-18-0087>.

32. Li Peng, Ling Ye, Xue-dong Zhou (2009). Mesenchymal Stem Cells and Tooth Engineering. *International Journal of Oral Science*, 1(1): 6-12.

33. Liu Y, Chen C, Liu S, et al. Acetylsalicylic acid treatment improves differentiation and immunomodulation of SHED. *J Dent Res*. 2015;94(1):209-18.

34. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4): 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

35. Maria M. Mihaylova and Reuben J. Shaw. The AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway coordinates cell growth, autophagy, & metabolism. *Nat Cell Biol*. 2011; 13(9): 1016–1023. doi: 10.1038/ncb2329.

36. Melnik, S., Werth, N., Boeuf, S., Hahn, E.-M., Gotterbarm, T., Anton, M., & Richter, W. Impact of c-MYC expression on proliferation, differentiation, and risk of neoplastic transformation of human mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019;10(1): 73. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1187-z>.
37. Micic, M., Antonijevic, D., Milutinovic-Smiljanic, S., Trisic, D., Colovic, B., Kosanovic, D. Jokanovic, V. Developing a novel resorptive hydroxyapatite-based bone substitute for over-critical size defect reconstruction: Physicochemical and biological characterization and proof of concept in segmental rabbit's ulna reconstruction. *Biomedizinische Technik Biomedical Engineering*. 2020; 65(4): 491–505. <https://doi.org/10.1515/bmt-2019-0218>.
38. Mi Du, Wan Pan, Xiaoqi Duan, Pishan Yang, Shaohua Ge. Lower dosage of aspirin promotes cell growth and osteogenic differentiation in murine bone marrow stromal cells. *Journal of Dental Sciences*. 2016;11:315-322. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jds.2016.03.009>.
39. Mona Abd-Elmotelb. Thy-1 (CD90) Expression in Dental Pulp Stem Cells – Doctoral Thesis, King's College London, 2012.
40. Nakamura A, Dohi Y, Akahane M, Ohgushi H, Nakajima H, Funaoka H, Takakura Y. Osteocalcin secretion as an early marker of in vitro osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009;15:169-180. doi:10.1089/ten.tec.2007.033.
41. Noack, C., Hempel, U., Preissler, C., & Dieter, P. Prostaglandin E2 impairs osteogenic and facilitates adipogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Prostaglandins, Leukotriens & Essential Fatty Acids*. 2015;94:91–98. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2014.11.008>.
42. Owen Davis. Adipose-derived stem cells for dental tissue engineering – Doctoral Thesis, Department of Oral Biology, The School of Dentistry, College of Medical and Dental Sciences University of Birmingham, September 2013.
43. Perry BC, Zhou D, Wu X, et al. Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. *Tissue Eng Part C Methods*. 2008;14:149-156.

44. R. Rankin, F. T. Lundy, B. C. Schock, S.-D. Zhang, B. Al-Natour, I. About, C. Irwin, G. J. Linden, I. A. El-Karim. A connectivity mapping approach predicted acetylsalicylic acid (aspirin) to induce osteo/odontogenic differentiation of dental pulp cells, *International Endodontic Journal*. 2020;53:6. <https://doi.org/10.1111/iej.13281>.
45. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*. 2003;18:696-704.
46. Shihai Jia, Jing Zhou, Yang Gao, Jin-A Baek, James F. Martin, Yu Lan, Rulang Jiang. Roles of Bmp4 during tooth morphogenesis and sequential tooth formation. *Development*. 2013;140 (2):423–432. <https://doi.org/10.1242/dev.081927>.
47. Simonovic, J., Toljic, B., Nikolic, N., Peric, M., Vujin, J., Panajotovic, R., & Milasin, J. Differentiation of stem cells from apical papilla into neural lineage using graphene dispersion and single walled carbon nanotubes. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2018;106 (10):2653–2661. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36461>.
48. Simonović, J., Toljić, B., Rašković, B., Jovanović, V., Lazarević, M., Milošević, M., & Milašin, J. Raman microspectroscopy: Toward a better distinction and profiling of different populations of dental stem cells. *Croatian Medical Journal*. 2019;60 (2):78–86. https://doi.org/10.3325/CroatMedJ_60_0078.
49. Sobolewski, C., Cerella, C., Dicato, M., & Diederich, M. Cox-2 inhibitors induce early c-Myc downregulation and lead to expression of differentiation markers in leukemia cells. *Cell Cycle*. 2011;10 (17):2978–2993. <https://doi.org/10.4161/cc.10.17.16460>.
50. Song Z, Chen L, Guo J, et al. The Role of Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily C, Member 1 in the Odontoblast-like Differentiation of Human Dental Pulp Cells. *J Endod*. 2017;43(2):315-320.
51. Trancik T, Mills W, Vinson N. The effect of indomethacin, aspirin and ibuprofen on bone ingrowth into a porous-coated implant. *Clin Orthop Relat Res*. 1989;249:113-121.
52. Ullah I, Choe YH, Khan M, et al. Dental pulp-derived stem cells can counterbalance peripheral nerve injury-induced oxidative stress and supraspinal neuro- inflammation in rat brain. *Sci Rep*. 2018;8:15795.

53. Vidovic-Zdrilic I, Vining KH, Vijaykumar A, et al. FGF2 Enhances Odontoblast Differentiation by α SMA+ Progenitors In Vivo. *J Dent Res*. 2018;97 (10):1170-1177.
54. V. Khampatee, C. Zhang and L. Chou. Effects of Aspirin on Odontogenesis of Human Dental Pulp Cells and TGF- β 1 Liberation from Dentin *In Vitro*. *International Journal of Dentistry*. 2022;3246811. <https://doi.org/10.1155/2022/3246811>.
55. Vučićević M. Ljubica, Uloga inhibicije protein-kinaze aktivirane adenozin-monofosfatom u indukciji apoptoze i autofagije u tumorskim ćelijskim linijama – Doktorska disertacija, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, 2013.
56. Winder WW, Hardie DG. "AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes". *The American Journal of Physiology*. 1999;277 (1): E1-10. doi:10.1152/ajpendo.1999.
57. Xia, S., Ma, J., Bai, X., Zhang, H., Cheng, S., Zhang, M., ... Leng, J. Prostaglandin E2 promotes the cell growth and invasive ability of hepatocellular carcinoma cells by upregulating c-Myc expression via EP4 receptor and the PKA signaling pathway. *Oncology Reports*. 2014;32 (4):1521–1530. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3393>.
58. Yamada Y, Nakamura-Yamada S, Kusano K, Baba S. Clinical Potential and Current Progress of Dental Pulp Stem Cells for Various Systemic Diseases in Regenerative Medicine: A Concise Review. *Int J Mol Sci*. 2019;20 (5).
59. Yuan M, Zhan Y, Hu W, et al. Aspirin promotes osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Int J Mol Med*. 2018;42 (4):1967-1976.
60. Yvonne Wai Yee Pang, Functional Characteristics of Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells – Doctoral Thesis, University College London, February 2015.
61. Zhang W, Walboomers XF, van Osch GJ, van den Dolder J, Jansen JA. Hard tissue formation in a porous HA/TCP ceramic scaffold loaded with stromal cells derived from dental pulp and bone marrow. *Tissue Eng Part A*. 2008;14:285-294.

- 62.** Ziheng Yan, Xin Wu, Xiaofang Hu, Liang Qian. Silencing of microRNA-340 promotes the odontogenic differentiation of induced pluripotent stem cells through upregulating BMP4. *Int J Clin Exp Med*. 2019;12 (8):9890-9898.

Stomatološki fakultet u Beogradu
KLINICI ZA ORALNU HIRURGIJU
Dr Subotića 4, Beograd
Telefon: (011) 2685-824

MOLBA

Molim vas da mi odobrite prikupljanje uzoraka (5 ekstrahovanih trećih molara muških pacijenata u dobi 18-25 godina), radi dalje laboratorijske obrade i izolovanja matičnih ćelija zubne pulpe. Uzorak mi je potreban u postupku istraživanja predviđenih temom doktorske disertacije pod naslovom:

„ANALIZA UTICAJA ACETILSALICILNE KISELINE NA DIFERENCIJACIJU MATIČNIH ĆELIJA ZUBNE PULPE U ZRELE ODONTOBLASTE I EKSPRESIJU GENA ODGOVORNIH ZA STVARANJE DENTINA *IN VITRO*“.

Podnosilac molbe:

Dr Mladen Vuković

SAGLASNOST PACIJENTA

Potvrđujem da sam saglasan da se moj zub, izvađen zbog terapijskih indikacija, koristi u istraživačke svrhe, uz obezbeđenje moje anonimnosti.

PACIJENT

LEKAR ISTRAŽIVAČ

BIOGRAFIJA

Dr Mladen Vuković je rođen 08.06.1969. godine u Beranama, Crna Gora. Osnovnu i srednju školu (Gimnazija) je završio u Podgorici, sa odličnim uspehom. Vojni rok (ŠRO) je služio u Zadru, rezervni je oficir. Upisao je Stomatološki fakultet u Zagrebu 1988. godine, na kojem je odslušaio prve tri godine studija i prepisao se na Stomatološki fakultet u Beogradu 1991. godine, gde je i diplomirao 16.05.1996., sa prosečnom ocenom 8,76 i odbranio diplomski rad sa ocenom 10, mentor Prof. Dr Zorka Milošević, na temi: “Oralno-hirurške intervencije u pacijenata rizika“. Lekarski staž i državni ispit položio je u Podgorici. Radio je u zemlji i inostranstvu, u javno-zdravstvenom sistemu i privatnoj praksi. Tokom 2009. godine upisao je master studije iz zdravstvenog menadžmenta na Fakultetu Organizacionih Nauka – FON, u Beogradu, gde je i položio specijalistički ispit 24.01.2013. godine, sa prosečnom ocenom 9,33 na temi: „Strategijski i operativni menadžment u zdravstvu“, a 2017. je upisao je prvu godinu doktorskih studija. Dr Mladen Vuković je učestvovao na brojnim kongresima i seminarima u zemlji i inostranstvu i završio više kurseva i seminara, od kojih su najznačajniji Kurs iz implantologije na Klinici za oralnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu, decembar 2004., i SHOFU Kurs iz minimalno invazivne estetske stomatologije, maj, 2012. godine.

Dr Mladen Vuković je član više domaćih i međunarodnih organizacija:

- Stomatološke komore Srbije
- Stomatološke komore Crne Gore
- AADOCR: American Association for Dental, Oral and Craniofacial Research

Posедуje Licencu Stomatološke komore Srbije i Stomatološke komore Crne Gore. Takođe poseduje Hrvatsku Autorizaciju, izdatu od strane ENIC/NARIC Centra u Zagrebu, 2012. godine.

I Z J A V A

„ Ja, Mladen Vuković, potvrđujem da je rad predstavljen u ovoj tezi, moj. Tamo gde su informacije dobijene iz drugih izvora, potvrđujem da je to navedeno u tezi “.
