

UNIVERZITET U BEOGRADU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Ivana T. Karadžić

UTICAJ RAZLIČITIH 3D BIOMATERIJALA
NA OSTEOLASTNU DIFERENCIJACIJU
MEZENEHIMALNIH ĆELIJA ZUBNE PULPE

Doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF DENTISTRY

Ivana T. Karadzic

**EFFECTS OF VARIOUS 3D BIOMATERIALS
ON OSTEOBLASTIC DIFFERENTIATION
OF DENTAL PULP MESENCHYMAL CELLS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Mentori:

Prof. dr Dejan Marković

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,

Klinika za dečju i preventivnu stomatologiju

dr Marija Glibetić, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za medicinska istraživanja,

Centar izuzetnih vrednosti za ishranu i metabolizam

Članovi komisije:

dr Vesna Vučić, viši naučni saradnik,

Univerzitet u Beogradu, Institut za medicinska istraživanja,

Centar izuzetnih vrednosti za ishranu i metabolizam

Doc. dr Duška Blagojević,

Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet,

Odsek za stomatologiju, Klinika za dečju i preventivnu stomatologiju

Doc. dr Vanja Petrović,

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,

Klinika za dečju i preventivnu stomatologiju

dr Snježana Petrović, naučni saradnik,

Univerzitet u Beogradu, Institut za medicinska istraživanja,

Centar izuzetnih vrednosti za ishranu i metabolizam

Datum odbrane _____

Doktorska disertacija je realizovana na Klinici za dečju i preventivnu stomatologiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na Institutu za Medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu, na Institutu Vinča Univerziteta u Beogradu, na Institutu za imunologiju Univerziteta u Beogradu, na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu.

Želela bih da se zahvalim:

Svom mentoru Prof. dr Dejanu Markoviću na svemu što je za mene činio i što i dalje čini. Neizrecivo hvala na usmeravanju, dragocenim idejama, nesebičnoj podršci, savetima i pomoći. Posebna mi je čast i privilegija što učestvuje u mom stručnom usavršavanju i napredovanju.

Ko-mentor dr Mariji Glibetić, na sveukupnim savetima i podršci, datim sugestijama, ukupnom pozitivnom pristupu i ličnom doprinosu.

Doc dr Duški Blagojević, na usmeravanju, podršci i ukazanom poverenju od prvog dana susreta. Posebno hvala na razumevanju i savetima, prijateljskim, ljudskim i stručnim.

Dr Vukomanu Jokanoviću, na stručnoj pomoći i angažovanju, na entuzijazmu, idejama i sugetijama.

Dr Vesni Vučić, rukovodiocu izrade ove disertacije, na svesrdnoj pomoći i saradnji, na sveukupnom doprinosu, trudu i angažovanju.

Dr Snježani Petrović, na dragocenoj pomoći i idejama u obradi rezultata i izradi finalne verzije disertacije.

Aleksandri Konić, na velikoj pomoći u laboratorijskoj izradi disertacije.

Jasmini Debeljak Martačić, na sticanju znanja o kulturi ćelija i pomoći u izvođenju laboratorijskog dela disertacije.

Andrei, Vojinu, Slobodanu i Borisu na podršci, razumevanju, radosti i sreći.

Roditeljima, na ljubavi koju su mi pružili i na svemu što su mi omogućili. Hvala im što su bili to što jesu u mom životu!

“Uticaj različitih 3D biomaterijala na osteoblastnu diferencijaciju mezenhimalnih ćelija zubne pulpe”

IZVOD

Milioni pacijenata širom sveta pate od oboljenja kostiju ili koštanih defekata kao što su osteosarkom, osteoporoza i frakture kostiju. U cilju rešavanja problema izgubljenog koštanog tkiva, inženjerstvo koštanog tkiva glavni akcenat stavlja na tkivnu regeneraciju a ne na zamenu tkiva, zbog čega postaje predmet sve većeg interesovanja. Matične ćelije i skafoldi imaju esencijalnu ulogu u stvaranju novog tkiva putem tkivnog inženjerstva. Ćelijska komponenta je neophodna zbog stvaranja i uspostavljanja ekstracelularnog matriksa u novom tkivu, dok su skafoldi zaduženi za obezbeđivanje mehaničke stabilnosti i temelja trodimenzionalne organizacije novog tkiva.

Osnovni cilj doktorske disertacije bio je ispitati diferencijalni kapacitet izolovanih mezenhimalnih ćelija zubne pulpe u odnosu na 4 različita ćelijska nosača – skafolda: poroznog hidroksiapatita (pHAP) i poroznog hidroksiapatita u kombinaciji sa 3 polimera: polilaktid-koglikolnom kiselina (PLGA), alginatom i polimerom etilen vinil acetat/versatatom (EVA/EVV).

Istraživanje je podrazumevalo izolovanje mezenhimalnih ćelija zubne pulpe poreklom iz mlečnih zuba u fiziološkoj smeni “outgrowth” metodom i njihovu karakterizaciju metodom protočne citometrije. Sintetisani biomaterijali su okarakterisani uz pomoć Fourier transform infracrvene spektroskopije (FTIR), rentgen difrakcije (XRD), mikroskopije atomskih sila (AFM), skening elektronske mikroskopije (SEM) i metode analize specifične površine čestice praha hidroksiapatita (BET metoda). Citotoksičnost biomaterijala u prisustvu mezenhimalnih ćelija je ispitivana indirektnom metodom pomoću MTT testa i direktnom metodom pomoću LDH testa. Osteogena diferencijacija izolovanih mezenhimalnih ćelija u prisustvu različitih 3D biomaterijala praćena je bojenjem uzoraka alizarin crvenim, merenjem aktivnosti alkalne fosfataze i skening elektronskom mikroskopijom.

Diferencijacijom ćelija u 3 različite vrste ćelija – adipocite, hondrocite i osteoblaste, i karakterizacijom CD29, CD73, CD90 i CD34 antitelima, pokazano je da su izolovane ćelije iz zubne pulpe mezenhimalne matične ćelije. Takođe, rezultati

istraživanja pokazuju da su ispitivani skafoldi bili adekvatno dizajnirani i da su imali odgovarajuću morfologiju površine koja je neophodna za ćelijske nosače. Svi materijali su pokazali da su njihove površine u kontaktu sa mezenhimalnim ćelijama zubne pulpe pogodne za ćelijsku adheziju i proliferaciju i da se odlikuju karakteristikama koje omogućavaju rast ćelija. Vidljivi obojeni kompleksi u prisustvu osteogenog medijuma kod svih materijala nakon bojenja alizarin crvenim ukazuju na novodeponovani mineralizovani matriks i pokazatelj su diferencijacije izolovanih ćelija u osteoblaste. Nakon perioda inkubacije od 12 dana u osteogenom medijumu, kod ćelija inkubiranih na svim ispitivanim materijalima uočena je povećana aktivnost alkalne fosfataze u odnosu na aktivnost alkalne fosfataze ćelija u prisustvu Bio Oss-a, posebno kod pHAP sa PLGA. Nakon 21 dan gajenja ćelija u osteogenom medijumu, u prisustvu svih materijala, ekstracelularni matriks (ECM) je bio dominantan na SEM mikrofijama, prekrivajući i pore skafolda. Ovakva razvijena mreža ECM dokaz je izražene diferencijacije i veoma dobre biokompatibilnosti između ćelija i materijala.

Svi materijali, na osnovu ovog istraživanja, su se pokazali jednakim a po nekim parametrima i boljim od primenjivanog zlatnog standarda Bio Oss-a. Oni u daljim eksperimentima mogu da posluže kao osnova za dobijanje ćelijskog nosača u koštanom tkivnom inženjerstvu i da omoguće vezivanje osteoblasta ili prekursora osteoblasta, njihov rast i diferencijaciju. Posebno se u tome istakao pHAP sa PLGA.

Ključne reči: mezenhimalne ćelije zubne pulpe mlečnih zuba, ćelijski nosači (skafoldi), hidroksiapatit, osteogena diferencijacija, tkivno inženjerstvo kosti

Naučna oblast: stomatološke nauke i biologija

Uža naučna oblast: dečja stomatologija i ćelijska biologija

UDK broj: 602:611.314.18.018(043.3)

“Effects of various 3D biomaterials on osteoblastic differentiation of dental pulp mesenchymal cells”

ABSTRACT

Millions of patients worldwide suffer from bone disease or bone defects such as osteosarcoma, osteoporosis and bone fractures. In order to solve the problem of lost bone tissue, bone tissue engineering major emphasis is on tissue regeneration rather than tissue replacement, which is why it became the subject of growing interest. Stem cells and scaffolds have an essential role in the production of new tissue by tissue engineering. Cellular component is necessary for the generation and establishment of the extracellular matrix in new tissue, while scaffold is responsible for providing mechanical stability and the foundation of a new three-dimensional tissue organization.

The main objective of the dissertation was to examine the differential capacity of isolated dental pulp mesenchymal cells in relation to 4 different cell carriers - scaffolds: porous hydroxyapatite (pHAP) and porous hydroxyapatite combined with 3 polymers: poly lactic-co-glycolic acid (PLGA), alginate and ethylene vinyl acetate / ethylene vinyl versatate (EVA / EVV).

The research involved the isolation of dental pulp mesenchymal cells from human exfoliated deciduous teeth shift by "outgrowth" method and their characterization by flow cytometry. Characterization of synthesized biomaterials was performed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), atomic force microscopy (AFM), scanning electron microscopy (SEM) and methods of the specific surface area of hydroxyapatite powder (BET method). Cytotoxicity of biomaterials in the presence of mesenchymal cells was tested by an indirect method using the MTT test and by a direct method using the LDH test. Evaluation of osteogenic differentiation of isolated mesenchymal cells on 3D biomaterials samples was performed by alizarin red staining, alkaline phosphatase activity measurements and scanning electron microscopy.

The differentiation of isolated dental pulp cells in 3 different cell types - adipocytes, chondrocytes and osteoblasts, and characterization of these cells by CD29, CD73, CD90 and CD34 antibodies, showed the isolated cells were mesenchymal stem

cells. Furthermore, the results showed that scaffolds were appropriately designed and had an appropriate surface morphology which was necessary for cell carriers. All materials showed that their surfaces, in contact with dental pulp mesenchymal cells, were suitable for cell adhesion, proliferation and cell growth. Visible dye complexes in the presence of osteogenic medium after alizarin red staining indicated that new mineralized matrix was formed and confirmed that isolated cells were differentiated into osteoblasts.

After incubation period of 12 days in osteogenic medium, increased alkaline phosphatase activity of cells cultured on all studied materials was observed compared to alkaline phosphatase activity of cells cultured on Bio Oss, especially at pHAP combined with PLGA. After 21 days of cell culturing in osteogenic medium, extracellular matrix (ECM) was dominant at the SEM micrographs of all studied materials and Bio Oss, covering the scaffold pores. The developed ECM confirmed the differentiation and a very good biocompatibility between cells and materials.

This study indicates that all investigated materials, are equal or according to certain parameters even better than the wide used gold standard Bio Oss. They can serve in future studies as a basis for obtaining cellular carrier in bone tissue engineering and to allow binding of osteoblasts and osteoblast precursors, their growth and differentiation. In particular, the best results were obtained in pHAP combined with PLGA.

Key words: dental pulp mesenchymal stem cells, cell carriers (scaffolds), hydroxyapatite, osteogenic differentiation, bone tissue engineering

Scientific field: dentistry and biology

Scientific field specialized: paediatric dentistry and cell biology

UDC: 602:611.314.18.018(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Istorijat.....	1
1.2. Zubna pulpa – građa i funkcija.....	1
1.3. Matične ćelije.....	3
1.3.1. Klasifikacija matičnih ćelija.....	4
1.3.2. Klasifikacija matičnih ćelija zuba.....	5
1.3.3. Matične ćelije zubne pulpe.....	6
1.3.3.1. Ektomezenhimalne matične ćelije izolovane iz zubne pulpe molara.....	7
1.3.3.2. Matične ćelije poreklom iz eksfoliranih mlečnih zuba.....	7
1.3.3.3. Nezrele matične ćelije zubne pulpe.....	8
1.4. Kost – osobine i struktura.....	9
1.4.1. Periost.....	9
1.4.2. Koštani ekstracelularni matriks.....	10
1.4.3. Osteoblasti.....	11
1.4.4. Osteociti.....	13
1.4.5. Osteoklasti.....	13
1.5. Koštano – tkivno inženjerstvo.....	14
1.5.1. Matične ćelije zubne pulpe u koštano tkivnom inženjerstvu.....	17
1.5.2. Biomaterijali u koštano-tkivnom inženjerstvu.....	18
1.5.2.1. Bioaktivni neorganski materijali.....	19
1.5.2.2. Biološki i sintetički polimeri.....	21
1.5.2.3. Kompozitni materijali.....	22
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	25
3. MATERIJAL I METODE.....	26
3.1. Prikupljanje i ekstrakcija mlečnih zuba.....	26
3.2. Izolovanje mezenhimalnih ćelija zubne pulpe iz eksfoliranih mlečnih zuba metodom „outgrowth“.....	26
3.3. Pasažiranje i krioprezervacija mezenhimalnih ćelija zubne pulpe iz eksfoliranih mlečnih zuba.....	27
3.3.1. Pasažiranje ćelija.....	27

3.3.2. Tripsinizacija ćelija.....	27
3.3.3. Zamrzavanje ćelija.....	28
3.3.4. Odmrzavanje ćelija.....	28
3.3.5. Brojanje ćelija metodom tripan-plavog.....	28
3.4. Karakterizacija mezenhimalnih ćelija zubne pulpe metodom protočne citometrije.....	30
3.5. 3D biomaterijali – sinteza.....	31
3.5.1. Karakterizacija ispitivanih biomaterijala.....	33
3.6. Ispitivanje citotoksičnosti analiziranih materijala, procena ćelijske adhezije i proliferacije.....	35
3.6.1. Ispitivanje indirektne citotoksičnosti – MTT test.....	35
3.6.2. Ispitivanje direktne citotoksičnosti.....	38
3.7. Određivanje stepena osteoblastne diferencijacije bojenjem alizarin crvenim.....	39
3.8. Određivanje stepena osteoblastne diferencijacije merenjem aktivnosti alkalne fosfataze.....	41
3.9. Skening elektronska mikroskopija (SEM analiza).....	43
3.10. Statistička analiza.....	44
4. REZULTATI.....	45
4.1. Izolacija i karakterizacija mezenhimalnih ćelija zubne pulpe.....	45
4.1.1. Izolacija – “outgrowth” metod.....	45
4.1.2. Multipotentnost mezenhimalnih ćelija zubne pulpe.....	46
4.1.3. Karakterizacija mezenhimalnih ćelija zubne pulpe metodom protočne citometrije.....	48
4.2. Sinteza 3D biomaterijala – sinteza čestica hidroksiapatita, keramičkih hidroksiapatitnih ćelijskih nosača i nosača sa infiltriranim tankim polimernim filmovima.....	51
4.2.1. Karakterizacija hidroksiapatitnog praha.....	51
4.2.1.1. Metoda rentgenske difrakcije - XRD analiza.....	51
4.2.1.2. Infracrveni spektar hidrotermalno dobijenog hidroksiapatita.....	52

4.2.1.3. Analiza pomoću mikroskopije atomskih sila (AFM analiza).....	53
4.2.1.4. Analiza skening elektronskom mikroskopijom (SEM analiza).....	54
4.2.1.5. Analiza specifične površine čestice praha hidroksiapatita (BET) analiza.....	54
4.2.2. Karakterizacija keramičkog hidroksiapatitnog skafolda i keramičkog hidroksiapatitnog skafolda sa infiltriranim tankim polimernim filmovima.....	55
4.2.2.1. Makroskopska razmatranja keramičkog hidroksiapatitnog skafolda.....	55
4.2.2.2. AFM analiza keramičkog hidroksiapatitnog skafolda....	56
4.2.2.3. SEM analiza finalnih skafolda.....	58
4.2.2.3.1. SEM analiza poroznog hidroksiapatitnog skafolda.....	58
4.2.2.3.2. SEM analiza poroznog hidroksiapatitnog skafolda sa infiltriranim tankim polilaktidkoglolidnim filmom.....	58
4.2.2.3.3. SEM analiza poroznog hidroksiapatitnog skafolda sa infiltriranim tankim alginatnim filmom.....	59
4.2.2.3.4. SEM analiza poroznog hidroksiapatitnog skafolda sa infiltriranim tankim polimernim etilen vinil acetat/etilen vinil versatnim filmom.....	60
4.3. Ispitivanje citotoksičnost analiziranih materijala i procena ćelijske adhezije i proliferacije.....	60
4.3.1. Ispitivanje indirektno citotoksičnosti biomaterijala – MTT test....	60
4.3.2. Ispitivanje direktno citotoksičnosti – LDH test.....	64
4.4. Određivanje stepena osteoblastne diferencijacije bojenjem alizarin crvenim.....	65
4.5. Određivanja stepena osteoblastne diferencijacije merenjem aktivnosti alkalne fosfataze.....	68
4.6. Skening elektronska mikroskopija ćelija na skafoldima.....	70

5. DISKUSIJA.....	76
5.1. Mezenhimalne ćelije zubne pulpe.....	76
5.2. Karakteristike materijala.....	80
5.3. Citotoksičnost analiziranih materijala i procena ćelijske adhezije i proliferacije.....	86
5.3.1. Indirektni kontakt ispitivanih materijala sa mezenhimalnim ćelijama zubne pulpe – MTT test.....	86
5.3.2. Direktni kontakt ispitivanih materijala sa mezenhimalnim ćelijama zubne pulpe – LDH test.....	88
5.4. Step en osteoblastne diferencijacije procenjen bojenjem alizarin crvenim...89	
5.5. Određivanje stepena osteoblastne diferencijacije merenjem aktivnosti alkalne fosfataze.....	91
5.6. Analiza skening elektronske mikroskopije.....	94
6. ZAKLJUČAK.....	97
7. LITERATURA.....	99

1. UVOD

1.1. Istorijat

U irskoj epskoj priči „The Tain bo Cuailnge“, ratnika Cetherna su lečili od masivnih povreda i krvarenja trodnevnim kupanjem u koštanoj srži. Prema predanju, na taj način obnovljena je Cethernova snaga koja mu je omogućila da nastavi da se bori. U 19. veku postalo je popularno piti „šejk zdravlja“ pod nazivom Virol koji je bio napravljen od ekstrakata koštane srži i masti a za koji se verovalo da je koristan u terapiji displastičnih krvnih zrnaca.

Matične ćelije iz koštane srži prvi put su upotrebljene slučajno na klinici 1937. godine kada je nemački lekar Schreytzenmayr ubrizgao koštanu srž intramuskularno pacijentima obolelim od parazitarnih oboljenja u pokušaju da ih izleči.

Tokom 1950-ih godina postalo je jasno da matične ćelije koštane srži mogu izlečiti letalno ozračene miševе i obnoviti njihovu cirkulaciju i imuni sistem. 1956. godine, nobelovac E. Donall Thomas i njegove kolege sa Instituta za tehnologiju u Masačusetsu, pokazali su po prvi put da pacijenti oboleli od leukemije koji su bili na mijeloablativnoj zračnoj terapiji koja eliminiše bolest zajedno sa celokupnim hematopoetskim i imunim sistemom, mogu biti izlečeni alogenom transplantacijom koštane srži. Ovo je bila prva klinička terapija matičnim ćelijama.

Prve embrionalne matične ćelije humanog porekla izolovane su 1998. godine. Ovo je otvorilo nove mogućnosti istraživačima za stvaranje brojnih *in vitro* modela diferencijacije koji do tada nisu bili dostupni. Krajem prošlog veka, postalo je sve očiglednije da većina organa, ako ne i svi organi, u ljudskom telu sadrže matične ćelije. Ove ćelije nazvane su adultne matične ćelije ili somatske matične ćelije. Pokazano je da ova vrsta matičnih ćelija ima veliku sposobnost diferencijacije i plasticiteta.

1.2. Zubna pulpa – građa i funkcija

Zubna pulpa je vezivno tkivo mezodermalnog porekla koje se razvija iz dentalne papile a ispunjava šupljinu zuba (cavum dentis). Izgrađena je od ćelija, vlakana i osnovne supstance. U osnovnoj međućelijskoj supstanci koja potiče iz krvne plazme

nalaze se kolagena i elastična vlakna, krvni i limfni sudovi, nervna vlakna i ćelije – odontoblasti, fibroblasti, fibrociti, histiociti, limfociti, mastociti i nediferencirane mezenhimalne ćelije (1). Ćelijski elementi nisu ravnomerno raspoređeni, u strukturi pulpe razlikuju se 3 sloja:

- periferni (površni) sloj izgrađen od odontoblasta, visokospecijalizovanih ćelija koje stvaraju organski matriks dentina (pre dentin);
- Vejllova zona - zona siromašna ćelijama, ispunjena spletom nemijelinizovanih nervnih vlakana koji sadrže receptore za bol, krvnih i limfnih sudova;
- Hoelova multiceularna zona – sadrži fibroblaste, nediferencirane mezenhimalne ćelije-matične ćelije, preodontoblaste i ćelije odbrambenog sistema (limfocite, plazmocite, histiocite, eozinofilne granulocite i mastocite), kolagena i elastična vlakna, brojne kapilare i nerve.

U pulpi mlađih osoba sve zone su dobro razvijene i jasno uočljive osim u apeksnom delu zuba. Takođe, kod ovih osoba, broj fibroblasta je veći u odnosu na kolagena vlakna. Krvni sudovi zubne pulpe ne poseduju anastomoze što ima važnu ulogu u procesu zapaljenja. Cirkulaciju reguliše autonomni nervni sistem putem simpatikusa i parasimpatikusa i mala senzitivna nervna vlakna.

Tokom starenja u zubnoj pulpi dolazi do regresivnih promena koje nisu u vezi sa karijesom i drugim patološkim promenama zuba. Dolazi do zadebljanja zidova krvnih sudova i sužavanja njihovog lumena, kao i do smanjenja ćelija zubne pulpe, te se do 70. godine života može očekivati redukcija broja ćelija i do 50% (2).

Pulpa ima više uloga:

- Formativna – stvaranje kolagenih vlakana od strane fibroblasta i stvaranje dentina od strane odontoblasta. Tokom faze rasta i razvoja zuba nastaje tzv. primarni dentin, dentin izgrađen pre kompletnog formiranja korena zuba, do vremena kada počinju okluzija i artikulacija. Po završetku rasta korena zuba, nastaje fiziološki sekundarni dentin koji se stvara tokom celog života, sve dok je pulpa vitalna. Osim navedenih, može se javiti i tercijarni (reparatorni, nadražajni) dentin kao odgovor na stimulaciju odontoblasta određenim faktorima, kao što su karijes ili medikamenti koji se koriste u određenim

terapijskim procedurama. Nepravilne je strukture i stvara se na mestima izloženim spoljašnjim nadražajima. Za razliku od primarnog i sekundarnog dentina koji se stvaraju duž čitave pulpno-dentinske granice, tercijarni dentin stvaraju samo oni odontoblasti koji su direktno stimulisani.

- Nutritivna – prisustvo velikog broja krvnih i limfnih sudova omogućava nutritivnu ulogu pulpe koja je značajna zbog održavanja vitalnosti zuba.
- Senzorna (nervna) – vazomotorna i senzitivna nervna vlakna pulpe regulišu cirkulaciju i prenose bolne senzacije u koru velikog mozga.
- Odbrambena – sposobnost pulpe da na karijes i druga oboljenja odgovori upalom i stvaranjem tercijarnog dentina. Ukoliko se karijes ne sanira, može doći i do ireverzibilne upale (pulpitis) i izumiranja pulpe (nekroza, gangrena) (1, 3).

1.3. Matične ćelije

Matične ćelije su ključna podgrupa nespecializovanih ćelija organizma u vrlo ranom stadijumu razvića, koje u normalnim uslovima u datom tkivu mogu da se diferenciraju u različite tipove funkcionalno specializovanih zrelih ćelija. Postoje na svakom stepenu razvića organizma sisara, od oplodene jajne ćelije do odraslog organizma, pri čemu se njihove osobine i potencijali razlikuju zavisno od stepena razvića. Igraju važnu ulogu u embrionalnom razvoju i organogenezi (embrionalne matične ćelije – EMC i fetalne matične ćelije), kao i u tkivnoj homeostazi i regeneraciji (adultne matične ćelije - AMC). Izvor su svih novih tkiva nastalih reparaturom ili remodelovanjem (4, 5).

Dve funkcije definišu matične ćelije organizma: neograničena sposobnost samoobnavljanja (mogućnost kontinuirane deobe u smislu sopstvene reprodukcije, što ih čini potencijalno besmrtnim) i pluripotentnost (mogućnost diferencijacije u različite progenitorne ćelije – matične ćelije koje se opredeljuju za dalje sazrevanje u pravcu specifičnih vrsta ćelija). Osim toga matične ćelije karakteriše i veliki potencijal migracije i imunološke tolerancije. Sposobnost samoobnavljanja kontrolisana je unutrašnjim genetskim putevima koji su pod kontrolom regulacije spoljašnjih signala dospelih iz mikrosredine u kojoj je smeštena populacija matičnih ćelija (5, 6).

Poslednjih godina postignut je veliki napredak u proučavanju matičnih ćelija, a u neposrednoj budućnosti može se očekivati isti i u njihovoj terapijskoj primeni u tzv. “regenerativnoj medicini” ili “tkivnom inženjeringu” kako humanih adultnih matičnih ćelija koje mogu postati idealan izvor autologih matičnih ćelija za tkivnu regeneraciju, tako i humanih embrionalnih matičnih ćelija. Iako imaju manju sposobnost diferencijacije, danas se AMĆ daleko više primenjuju u regenerativnoj terapiji u odnosu na EMĆ, pre svega zbog relativno lake izolacije, činjenice da nemaju onkogeni potencijal i da njihova primena nema etičkih ograničenja (7).

1.3.1. Klasifikacija matičnih ćelija

Postoji nekoliko podela matičnih ćelija:

- u odnosu na razvojni potencijal matične ćelije mogu biti: a) totipotentne - imaju najveći razvojni potencijal, od njih može nastati bilo koji tip od preko 200 ćelija koje ima organizam čoveka. Totipotentne su embrionalne ćelije do stupnja od 8 blastomera; b) pluripotentne - nastaju razvićem totipotentnih i od njih ne mogu nastati svi tipovi ćelija, kao od totipotentnih, ali može nastati veliki broj; c) multipotentne - su malobrojne nediferencirane ćelije unutar tkiva odraslog organizma koje se mogu diferencirati u ćelije međusobno blisko povezane i slične; d) unipotentne ćelije mogu stvoriti samo jedan tip ćelija, ali imaju sposobnost samoobnavljanja koja ih razdvaja od nematičnih ćelija;
- u odnosu na funkciju matične ćelije mogu biti normalne i kancerske matične ćelije;
- u odnosu na mesto izolacije matične ćelije se dele na embrionalne, fetalne, matične ćelije iz krvi pupčanika i adultne matične ćelije. Humane embrionalne matične ćelije (hEMĆ) se dobijaju iz blastociste u periodu između 5-8. dana nakon oplodjenja. Fetalne matične ćelije se uglavnom dobijaju iz tkiva pupčanika (Vartonove pihtije) i *pars fetalis placentae*. Humane adultne matične ćelije (hAMĆ), označavane i kao humane mezenhimalne matične ćelije, do danas su izolovane iz koštane srži, periferne krvi, kože, epitela digestivnog trakta, skeletnih mišića, srca, pluća, retine, mozga, jetre, pankreasa, masnog tkiva, sinovijuma, periostijuma i zuba (5, 8-10).

Među adultnim matičnim ćelijama posebno mesto zauzimaju nehematopoetske mezenhimalne matične ćelije koštane srži koje se označavaju i kao stromalne ćelije koštane srži (*engl.* bone marrow stromal stem cells, BMSSC) ili multipotentne adultne progenitorne ćelije (*engl.* multipotent adult progenitor cells, MAPC). Na postojanje ovih ćelija ukazano je pre više od 40 godina (11). Znatno kasnije one su uspešno izolovane iz ćelijske suspenzije dobijene iz aspirata koštane srži, prečišćene i propagirane u uslovima *in vitro*. Mogu da se diferenciraju u osteoblaste, hondrocite i ćelije retine, najverovatnije procesom transdiferencijacije u najmanje dva klicina lista (12, 13). Mezenhimalne matične ćelije koštane srži imaju sposobnost diferenciranja u pravcu nastanka nehematopoetskih ćelija. Takođe, dokazano je da ulaze u cirkulaciju i da mogu da naseljavaju udaljena mesta u organizmu gde se diferenciraju u cilju reparacije oštećenog tkiva. Nakon transplantacije ovih ćelija u imunokompromitovanog miša, dokazana je sposobnost njihove migracije u jetru i mozak (14, 15). Smatra se da među svim hAMC, najveći plasticitet poseduju BMSSC, tj. da one imaju najveću sposobnost da se diferenciraju u ćelije različite od ćelija tkiva odakle potiču (15).

Posebno mesto zauzima mogućnost diferencijacije mezenhimalnih ćelija koštane srži u cementoblaste i ameloblaste, što otvara nove mogućnosti u regenerativnoj stomatologiji ne samo upotrebom matičnih ćelija zubne pulpe već i BMSSC (16, 17). Najnovije studije pokazale su pozitivan efekat proteina matriksa gleđi na diferencijaciju BMSSC svinje u cementoblaste (18). Pokazana je i nova mogućnost regeneracije periodontalnog tkiva kombinacijom mezenhimalnih matičnih ćelija i plazmom obogaćenom trombocitima upotrebom tehnologije tkivnog inženjerstva (19).

1.3.2. Klasifikacija matičnih ćelija zuba

Matične ćelije zuba mogu se dobiti iz:

- zubnog epitela – zubne epitelne matične ćelije;
- zubne pulpe – matične ćelije zubne pulpe (*engl.* dental pulp stem cells, DPSC), matične ćelije poreklom iz eksfoliranih humanih mlečnih zuba (*engl.* stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHED) i nezrele matične ćelije zubne pulpe (*engl.* immature dental pulp stem cells, IDPC);

- periodontalnog ligamenta – matične ćelije periodontalnog ligamenta (*engl.* periodontal ligament stem cells)
- zubnog folikula – zubne folikularne prekursorske ćelije (*engl.* dental follicle progenitor cells)
- apikalne papile zuba – matične ćelije apikalne papile (*engl.* stem cells from the apical papilla) (20).

Osnovni diferencijalni potencijal matičnih ćelija zuba je u njihovoj sposobnosti da formiraju dentin i tkivo periodoncijuma.

Sve nabrojane matične ćelije zuba su ektomezehimalnog porekla (iz nervnog grebena), izuzev zubnih epitelnih matičnih ćelija koje potiču od ektoderma i gube se kod dece nakon nicanja zuba. Karakterizacija različitih matičnih ćelija zuba na osnovu ekspresije površinskih proteinskih markera je veoma kompleksna. Međutim, neki površinski proteinski markeri, kao što su Stro-1 i CD73 su ubikvitarno eksprimirani na svim matičnim i prekursorskim ćelijama zuba. Bolje poznavanje ekspresije ovih markera i njihov odnos prema ćelijskoj diferencijaciji i plasticitetu, svakako će u budućnosti doprineti razvoju terapije bazirane na primeni ovih ćelija (20).

1.3.3. Matične ćelije zubne pulpe

Za razliku od zubnih epitelnih matičnih ćelija, nediferencirane matične ćelije poreklom iz ektomezehimalne se ne gube u potpunosti kod čoveka nakon nicanja zuba. Sredinom devedesetih godina 20. veka došlo je do uspešne izolacije prekursorskih ćelija zubne pulpe (21). Kasnije su dentalne ektomezehimalne matične ćelije izolovane iz zubne pulpe molara i nazvane matične ćelije zubne pulpe (DPSC) (22). Nakon toga uspešno su izolovane još dve populacije matičnih ćelija iz zubne pulpe – matične ćelije iz eksfoliranih humanih mlečnih zuba (SHED) i nezrele matične ćelije zubne pulpe koje po svemu sudeći čine najprimitivniju populaciju matičnih ćelija zubne pulpe. Pretpostavlja se da su ove poslednje navedene matične ćelije zubne pulpe u stvari multipotentni prekursori DPSC i SHED (23).

Matične ćelije zubne pulpe mogu da se izoluju i 5 dana nakon ekstrakcije zuba, a njihova izolacija i kultivacija moguća je i iz intaktnih zuba koji su prethodno krioprezervirani. Navedeni podaci ukazuju da su potrebni minimalni zahtevi za stvaranje banke ovih ćelija u cilju buduće primene u medicinske svrhe (24).

1.3.3.1. Ektomezenhimalne matične ćelije izolovane iz zubne pulpe molara

Ove ćelije ispoljavaju slične karakteristike kao mezenhimalne matične ćelije koštane srži (BMSSC): adheriraju na plastičnu podlogu i formiraju kolonije. Lokalizovane su u perivaskularnoj niši i eksprimiraju marker matičnih ćelija Stro-1 (25). Za razliku od mezenhimalnih matičnih ćelija koštane srži, DPSC mogu da se diferenciraju u odontoblaste. Ove ćelije takođe imaju neke karakteristike identične sa osteoblastima. Metodom DNK mikroereja ustanovljene su razlike između BMSSC i DPSC, koje se ogledaju pre svega u povećanoj ekspresiji gena koji kontrolišu ćelijski ciklus kod DPSC (26). U skladu sa tim može se objasniti viša stopa proliferacije DPSC u odnosu na BMSSC (22). Dokazana je diferencijacija DPSC i u adipocite i u ćelije slične neuronima (27).

1.3.3.2. Matične ćelije poreklom iz eksfoliranih mlečnih zuba

Posebna populacija matičnih ćelije zubne pulpe ektomezenhimalnog porekla izolovana je iz mlečnih zuba (sekutića) u periodu njihove fiziološke smene (eksfolijacije) i označena kao SHED. Ove ćelije mogu da se kultivišu kao adherentne ćelije slične fibroblastima ili u vidu neurosfera, slično ćelijama nervnog sistema. SHED su sposobne da se diferenciraju u odontoblaste, adipocite i nervne ćelije. U *in vivo* uslovima indukuju formiranje kosti i produkciju dentina. Nakon transplantacije u miša sa kompromitovanim imunološkim sistemom one migriraju u mozak gde su sposobne za preživljavanje (28).

1.3.3.3. Nezrele matične ćelije zubne pulpe

Poslednja okarakterisana populacija matičnih ćelija zubne pulpe su nezrele matične ćelije zubne pulpe izolovane iz fiziološki ekfoliranih mlečnih zuba. Smatra se da je to najprimitivnija populacija matičnih ćelija zubne pulpe. Ove ćelije eksprimiraju markere embrionalnih matičnih ćelija Oct-4, Nanog, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 i TRA-1-81, kao i neke druge markere mezenhimalnih ćelija. U toku kultivisanja kroz 25 pasaža, u toku 4 meseca, one zadržavaju normalni kariotip i stopu ekspanzije karakterističnu za matične ćelije. U hemijski definisanim uslovima kultivisanja *in vitro*, IDPC mogu da se diferenciraju u glatke i poprečnoprugaste mišićne ćelije, neurone, hondroците i osteoblaste. U uslovima *in vivo*, ukoliko se transplantiraju miševima sa imunološkim deficitom, ove ćelije se dobro kaleme u različitim tkivima (29). Pretpostavlja se da su IDPC u stvari multipotentni prekursori DPSC i SHED, slično kao ćelije BMSSC izolovane iz koštane srži (23).

Sve matične ćelije zubne pulpe imaju osobine potrebne za uspešnu terapijsku primenu: izolacija je jednostavna i efikasna, poseduju multipotentni potencijal, dugovečne su i uspešno se krioprezerviraju (24, 30, 31). Takođe, pokazuju interakciju sa biomaterijalima koji upotrebljeni kao matrice indukuju intenzivnu proliferaciju ovih ćelija (32, 33).

Studijama *in vitro* je dokazano da matične ćelije zubne pulpe imaju izrazit plasticitet. Najnoviji radovi pružaju dokaze i o njihovom plasticitetu u *in vivo* uslovima. U uslovima *in vitro* ili *in vivo* ove ćelije mogu da se diferenciraju u pravcu odontoblasta, osteoblasta, hondrocity, adipocita, neurona, glatkih i skeletnih mišićnih ćelija, melanocita i endotelnih ćelija (22, 25, 27, 29, 34-38). Nakon implantacije u *in vivo* uslovima, pokazuju različit potencijal za formiranje dentina, kao i koštanog i masnog tkiva (39).

Ako se matične ćelije zubne pulpe postavljaju na površinu dentina humanog porekla i implantiraju mišu sa imunološkim deficitom, na površini dentina doći će do deponovanja novih slojeva dentina (40, 41). Ova istraživanja otvorila su vrata za uspostavljanje novih protokola za regeneraciju zubne pulpe i sintezu dentina u cilju terapijske kliničke primene.

Najnovija istraživanja pokazuju da humane matične ćelije zubne pulpe izolovane iz mlečnih zuba, koje u uslovima *in vitro* pokazuju osteogeni, adipogeni i miogeni potencijal diferencijacije, transplantirane pacovima sa velikim defektom parijetalne regije, dovode do stvaranja nove kosti nakon 1 meseca od načinjene lezije, bez upotrebe imunosupresivne terapije (34). To daje nadu da će se ove ćelije u budućnosti moći upotrebiti u rekonstruktivnoj hirurgiji kraniofacijalne regije.

Matične ćelije zubne pulpe su visoko proliferativne, klonogene, multipotentne i ispoljavaju visok stepen plasticiteta. Zbog lake dostupnosti, smatra se da će zubna pulpa, pored koštane srži, u budućnosti predstavljati najvažniji izvor adultnih multipotentnih mezenhimalnih matičnih ćelija, koje mogu da nađu široku primenu u regenerativnoj medicini (24).

1.4. Kost – osobine i struktura

Više od 206 različitih kostiju čini skelet čoveka, u rasponu od dugih kostiju ekstremiteta, preko kratkih kostiju zglobova, pljosnatih kostiju grudnog koša i lobanje do kostiju nepravilnog oblika kao što su karlica i pršljenovi (42, 43). Koštano tkivo javlja se u dva osnovna oblika: kao kompakta ili kortikalna kost i kao spongioza ili trabekularna kost. Kompakta se nalazi na površini kostiju i predstavlja gusto solidno koštano tkivo prožeto mikroskopski vidljivim kanalićima. Meko-tkivni elementi kao što su krvni kapilari, ćelije zauzimaju samo 10% od ukupne zapremine kompakte. Spongioza je sunderasta masa sastavljena od koštanih gredica i pločica sa brojnim šupljinama u kojima je smeštena koštana srž ili druga meka tkiva koja čine 75% volumena spongioze. Kompakta predstavlja najveći deo koštanog tkiva (80%), dok trabekularna kost učestvuje sa svega 20% u ukupnoj masi tvrde supstance čitavog skeleta (44).

1.4.1. Periost

Periost je vezivno-tkivna struktura koja oblaže oblaže spoljašnju stranu kosti i vezuje se za nju penetrirajućim snopovima kolagenih vlakana koja se nazivaju

Šarpejeva vlakna. Sastoji se iz spoljašnjeg sloja sastavljenog od gustog vlaknastog vezivnog tkiva i unutrašnjeg, koji je rastresitije građe, sa više krvnih sudova i ćelija. Igra važnu ulogu u srastanju koštanih preloma (45). Endosteum je tanak sloj specijalizovanog vezivnog tkiva koji oblaže unutrašnje koštane površine prema koštanoj srži a sadrži osteoprogenitorske ćelije i osteoblaste (46).

1.4.2. Koštani ekstracelularni matriks

Matriks zrele kosti deponovan je u obliku koštanih lamela koje se sastoje od organskog dela u kome su u vidu kristala organizovane mineralne materije. Neorganski deo sačinjava oko 65% koštane mase, organski nešto više od 20%, dok oko 10% mase čini voda. Organski deo matriksa naziva se osteoid i sastoji se pretežno iz proteina kolagena (90%) u vidu kolagenih vlakana i manjeg dela glikoproteina, proteoglikana i lipida koji čine osnovnu supstancu matriksa (47, 48). U okviru osnovne supstance najzastupljeniji je mali protein, osteokalcin koji je specifičan za kost i čini 1-2% ukupne mase proteina. U nešto manjoj meri zastupljeni su i osteonektin koji vezuje mineralne kristale za matriks, osteopontin koji ima ulogu u vezivanju ćelija za matriks, koštani sijaloprotein - modulator mineralizacije, kiseli koštani glikoprotein-75 koji vezuje kalcijum, adhezivni proteini (fibronektin, vitronektin i trombospondin), proteini bogati leucinom, kao i mali proteoglikani (dekorin i biglikan), lipidi, itd (49). Iako nisu sve dovoljno okarakterisane, smatra se da su navedene supstance neophodne za proces mineralizacije koštanog tkiva. Pored navedenog, u malim količinama prisutni su i različiti faktori rasta i citokini, kao što su: faktor transformacije rasta β (TGF- β), koštani morfogenetski proteini (BMP 1-6) insulinu slični faktori rasta (IGF) i interleukini (IL-1, IL-6). Oni učestvuju u diferencijaciji, aktivaciji i proliferaciji koštanih ćelija, kao i regeneraciji koštanog tkiva (50-52).

Kolagena vlakna se najvećim delom sastoje od molekula kolagena tipa I, a u znatno manjoj koncentraciji nalaze se i kolageni tipa III i V. Kolagen tipa V smešten je u unutrašnjosti fibrila, dok se kolagen tipa III nalazi na periferiji. Kolageni fibrili ispoljavaju tipičnu poprečnu ispruganost, daju čvrstinu koštanom tkivu i predstavljaju osnovu za mineralizaciju kosti (47).

Neorganski deo matriksa čine kristali slični hidroksiapatitu, samo što se za razliku od čistog hidroksiapatita, u koštanim kristalima pored kalcijuma i fosfata nalaze karbonati, magnezijum, natrijum citrat, u manjoj meri fluoridi. U tragovima su prisutni gvožđe, bakar, olovo, mangan i aluminijum (49). Kristali su dužine oko 10 nm i prečnika 1,5-3 nm a raspoređeni su u vidu iglica, tankih pločica ili listića. Kristali hidroksiapatita su vezani za kolagena vlakna, čije prisustvo je, kao i prisustvo nekolagenih proteina koštanog matriksa, neophodno za proces mineralizacije. Dve osnovne funkcije neorganskog dela matriksa su da obezbeđuje čvrstinu kostima i kompresivnu snagu (53, 54), ali služi i kao rezervoar jona kalcijuma, fosfata, magnezijuma i cinka. Čelijske populacije koštanog tkiva se dele na one koje učestvuju u stvaranju i održavanju koštanog matriksa (osteoblasti i osteociti), i na one koje omogućavaju resorpciju koštanog matriksa i na taj način remodelaciju koštanog tkiva (osteoklasti). Pored ovih ćelija, u unutrašnjem ćelijskom sloju periosta i endosteumu nalaze se progenitorske ćelije, vretenastog oblika sa svetlim okruglastim jedrom. Potiču od mezenhimalnih matičnih ćelija a imaju sposobnost diferencijacije u osteoblaste (47, 55-57).

1.4.3. Osteoblasti

Osteoblasti su kockastog ili nisko prizmatičnog oblika i nalaze se grupisani na koštanim površinama. Vode poreklo od osteoprogenitorskih ćelija i imaju ulogu u sintezi skoro svih organskih komponenti matriksa, uključujući molekule kolagena, nekolagenih proteina i proteoglikana (58). Jasno su polarizovane ćelije, čija se ekscentrično postavljena okrugla jedra nalaze udaljena od koštane površine na koju izlučuju i deponuju organski materijal (59). Čelije su međusobno povezane posebnim tipom ćelijskih veza – neksusima, koje omogućavaju međućelijsku komunikaciju i propuštanje malih molekula iz jedne ćelije u drugu. Izlučen organski deo matriksa – osteoid, koji se nalazi neposredno uz osteoblaste je svetlije boje u odnosu na dublje, mineralizovane delove matriksa. U toku procesa mineralizacije, soli kalcijuma deponuju se u osteoid, ali tanak sloj nemineralizovanog osteoida uvek deli površinske osteoblaste od mineralizovanog matriksa. Deponujući osteoid, osteoblasti ostaju povezani dugačkim citoplazmatskim produžecima ali se polako udaljuju jedan od drugoga i bivaju okruženi

matriksom sa svih strana. Tada se transformišu u zrele koštane ćelije, osteocite (60). Pored toga, deo osteoblasta po obavljenoj funkciji iščezava putem programiranog procesa ćelijske smrti - apoptoze (61). Osteoblasti poseduju receptore za hormon paratiroidne žlezde (parathormon, PTH) na ćelijskoj membrani. PTH po vezivanju za receptore inhibira sintezu alkalne fosfataze, a stimuliše osteoblaste da oslobađaju faktore kojima stimulišu aktivnost osteoklasta koji onda vrše resorpciju koštanog matriksa. Istovremeno, osteoblasti luče enzime koji uklanjaju osteoid, te na taj način ogoljuju mineralizovani matriks koji tada privlači osteoklaste. Na osteoblaste deluje i vitamin D3, koji stimuliše sintezu osteokalcina (62). Takođe, glukokortikoidi, estrogen, leptin, insulin, prostaglandini i faktori rasta ostvaruju svoj efekat na osteoblastnu aktivnost. Stvaranje koštanog matriksa započinje tako što osteoblasti luče osteoid koji potom mineralizuje. Nakon što je koštano tkivo mineralizovano, ono može da se uvećava jedino dodavanjem novog koštanog matriksa na površinu već postojećeg. Na taj način kost raste putem apozicije. Tako, pre početka stvaranja novog koštanog matriksa, na koštanoj površini se nalaze preosteoblasti i osteoblasti, koji posle oko nedelju dana od pojavljivanja počinju da luče osteoid. Sinteza osteoida traje narednih 10-15 dana pre nego što on počne da mineralizuje. Mineralizacija se odvija na spoju osteoida i tek mineralizovanog matriksa, na mestu nazvanom mineralizacioni front ili lamina limitans, koji je oko 8-10 μm udaljen od osteoblasta. Proces mineralizacije napreduje dok kompletan osteoid ne postane mineralizovan. Jedino tanak deo osteoida ostaje nemineralizovan oko samih ćelija. Sam proces mineralizacije povezan je i sa kolagenim vlaknima. Pretpostavlja se da se određeni nekolageni proteini, neophodni za proces mineralizacije, vezuju za kolagene fibrile i omogućavaju taloženje kalcijumovih i fosfatnih jona i stvaranje kristala. Iako se mineralizacija odigrava kontinuirano, sam proces može da se podeli u dve faze, primarnu i sekundarnu fazu. Primarna mineralizacija traje nekoliko dana i dovodi do blizu 70% od ukupnog stepena mineralizacije. Sekundarna mineralizacija, koja se odvija tokom sledećih nekoliko meseci, obezbeđuje kompletiranje ovog procesa (63).

1.4.4. Osteociti

Kada osteoblasti koji se nalaze na površini, deponujući matriks postanu potpuno okruženi matriksom i prestanu da ga luče, prelaze u mirujuće stanje, smanjuju se i nazivaju površinski osteociti. Osteociti su zrele koštane ćelije i najbrojnije su ćelije u kostima. Pravilno su raspoređeni u mineralizovanom matriksu, smešteni u malim šupljinama - lakunama. Poseduju brojne tanke citoplazmatske produžetke kojima se povezuju sa istim takvim produžecima drugih osteocita. Ovi produžeci ispunjavaju tanke koštane kanaliće koji međusobno povezuju susedne lakune. Osteociti putem koštanih kanalića dobijaju neophodne hranjive materije i gasove iz kapilara (64). Zbog toga, oštećenje međusobne povezanosti osteocita povećava i koštanu fragilnost. Osteociti su značajno manjeg volumena od osteoblasta, telo im je vretenastog oblika i ispunjava lakunu u kojoj se nalazi. Međutim i pored znatno manje aktivnosti u odnosu na osteoblaste, njihovo prisustvo u koštanom tkivu je neophodno za održavanje vijabilnosti, jer uklanjanjem osteocita koštani matriks brzo biva razgrađen (3).

1.4.5. Osteoklasti

Osteoklasti su ćelije koje nastaju fuzijom mononukleusnih progenitora monocitno-makrofagne ćelijske loze. Njihova osnovna uloga je resorpcija kosti, pa zajedno sa osteoblastima učestvuju u stvaranju skeleta i regulisanju ukupne koštane mase. Osteoklasti su krupne (oko 150 μ m), pokretljive, višejedarne ćelije koje sadrže od 2 do 50 jedara. Razgrađuju kost i stvaraju udubljenje - resorpcionu lakunu ili Haušipovu lakunu. Resorpcija koštanog tkiva je višefazni proces, započinje proliferacijom prekursora osteoklasta, njihovom diferencijacijom u osteoklaste i konačno se završava razgradnjom neorganskog i organskog dela koštanog tkiva. Za razvoj osteoklasta neophodno je prisustvo mezenhimalnih stromalnih ćelija (stroma kostne srži) ili osteoblasta, odnosno njihovih prekursora. Inhibiciju aktivacije osteoklasta može da izazove sekrecija proteina osteoprotegerina (OPG) (65) dok pozitivan efekat na osteoklastogenezu imaju neki citokini, interleukin-1 i faktor tumorske nekroze (TNF) (66). Razgradnja kosti započinje pripajanjem osteoklasta za ogoljen mineralizovani matriks. Priljublivanjem za koštanu površinu stvara se izolovan vanćelijki deo između

dela ćelije okružene pripojem i same koštane površine. Nije sasvim jasno da li čvrsto slepljivanje osteoklasta za matriks ima ulogu u potpunom odvajanju resorptivne mikrosredine od okolnog vanćelijskog prostora da bi se omogućilo koncentrisanje molekula u ovom delu ili jednostavno pripoj aktivira osteoklaste da započnu proces resorpcije. Po prestanku resorpcije, osteoklast se odvaja od kosti i kreće ka nekom drugom mestu gde započinje novi ciklus degradacije ili umire putem apoptoze.

1.5. Koštano – tkivno inženjerstvo

Milioni pacijenata širom sveta pate od oboljenja kostiju ili koštanih defekata kao što su osteosarkom, osteoporoza i frakture kostiju (28). Danas se izgubljeno koštano tkivo konvencionalnom terapijom nadoknađuje odgovarajućim zamenicima za kost – koštanim graftovima. Najveći broj koštanih defekata zaraste uz pomoć standardnih konzervativnih ili hirurških metoda. Međutim, veliki defekti nastali nakon operacija tumora, cista, multiplih preloma ili kao posledica nesrastanja fragmenata frakturirane kosti zahtevaju složenije procedure nadoknade koštanog tkiva uz pomoć zamenika kosti. U protekloj deceniji, glavni cilj koštano-tkivnog inženjerstva bio je da se pronađu biorazgradivi materijali - zamenici kosti za popunjavanje velikih koštanih defekata (67, 68). Ovi koštani zamenici koji mehanički popunjavaju defekte mogu biti implantacioni ili transplantacioni materijali, humanog, životinjskog ili sintetskog porekla. Na kost domaćina reaguju na četiri različita načina: osteokondukcijom, osteoindukcijom, osteogenezom ili osteointegracijom (69). Osteokondukcija je tip zarastanja kosti apozicijom osteoblasta iz biomaterijala na kost domaćina i obrnuto. U najmanju ruku, koštani zamenici treba da su osteokonduktivni. Osteoindukcija predstavlja stimulaciju i aktivaciju osteoprogenitora - mezenhimalnih matičnih ćelija iz okolnog tkiva da se diferenciraju u pravcu osteoblasta i na taj način započnu formiranje nove kosti. Ovaj proces je omogućen nizom kaskadnih signala i aktiviranjem većeg broja intra- i ekstracelularnih receptora. Do sada, najviše proučavani tip osteoinduktivnih ćelijskih medijatora su koštani morfogenetski proteini (*engl.* bone morphogenetic proteins, BMP) (70). Koštani zamenici koji su i osteokonduktivni i osteoinduktivni ne služe samo kao matrica za već postojeće osteoblaste nego podstiču i stvaranje novih osteoblasta. Osteogeneza označava sposobnost stvaranja kosti čak i u odsustvu lokalnih

osteoprogenitornih ćelija. Osteoprogenitorne ćelije se nalaze unutar zamenika koštanog tkiva, sposobne su da prežive proces implantacije nakon čega mogu da migriraju i da se diferenciraju u pravcu osteoblasta. Osteointegracija predstavlja premošćavanje površine kosti domaćina i površine koštanog zamenika koštanim tkivom. Osteokondukcija, osteoindukcija i osteogeneza su elementi koštane regeneracije koji rezultiraju osteointegracijom tj definitivnim spajanjem kosti domaćina i zamenika koštanog tkiva. Podela koštanih zamenika prema aktivnostima koje poseduju prikazana je u Tabeli 1 (71).

Tabela 1. Koštani zamenici – podela prema aktivnosti.

	Osteokondukcija	Osteoindukcija	Osteogeneza
Aloplastični materijali (sintetski materijali - keramika, polimeri kompoziti)	+	-	-
Ksenograftovi (zamenici životinjskog porekla, Bio Oss)	+	-	-
Alograftovi (zamenici poreklom od druge osobe, zamrznuta kost, zamrznuta suva kost, zamrznuta suva demineralizovana kost)	+	+/-	-
Autograftovi (zamenici poreklom od iste osobe, transplantacija sa jednog dela tela na drugi)	+	+	+

U cilju rešavanja problema izgubljenog koštanog tkiva, inženjerstvo koštanog tkiva glavni akcenat stavlja na tkivnu regeneraciju a ne na zamenu tkiva, zbog čega postaje predmet sve većeg interesovanja (72). Imajući u vidu široki spektar oboljenja i nedovoljan broj donora, matične ćelije različitog porekla se sa razlogom razmatraju kao potencijalni instrument u stvaranju materijala koji imitira prirodno koštano tkivo (73, 74).

Proces stvaranja kosti podrazumeva 4 faze: 1) migraciju mezenhimalnih ćelija sa osteogenim potencijalom na mesto buduće skeletogeneze, 2) mezenhimalno-epitelnu interakciju, 3) kondenzaciju (ili agregaciju) mezenhimalnih ćelija i 4) diferencijaciju u osteogene tipove ćelija (75). Molekularni i ćelijski mehanizmi koji čine osnovu diferencijacije mezenhimalnih ćelija u osteogene su predmet mnogih studija. Nekoliko faktora je identifikovano koji utiču na ove procese. Jedni od tih faktora su BMP (76) članovi superfamilije transformišućeg faktora rasta β (TGF- β). BMP se vezuju za svoje BMP receptore i indukuju fosforilaciju receptora koji su regulisani Smad proteinima. To su intracelularni proteini koji prenose ekstracelularne signale od TGF- β do jedra čime se aktivira transkripcija određenih gena (R-Smad – *engl.* receptor regulated-Smad). R-smad zatim formiraju celinu sa Co-Smad (*engl.* Common-mediator Smad) i odlaze do jedra gde interaguju sa drugim proteinima. Ovi proteini uključuju transkripcione faktore (Cbfa), koji zatim regulišu transkripciju ciljanih gena (77). Cbfa1 protein može da se veže za promotore nekoliko gena koji se nalaze pretežno u osteoblastima i pokazano je da učestvuju u zrelih osteoblastima kontrolišući gensku ekspresiju kolagena tip I i sijaloproteina kosti, kao što su osteokalcin i osteopontin. Takođe, služe za ekspresiju gena za alkalnu fosfatazu (78). U *in vitro* nastaloj koštanoj strukturi, mineralizovani koštani noduli su sačinjeni od osteoblasta kuboidalnog oblika uronjenih u koštani matriks (79). Ovaj koštani matriks je najvećim delom izgrađen od gusto zbijenih vlakana kolagena tip I prožetih kristalima hidroksiapatita i malom količinom proteina kosti, osteopontinom. Kolagen tip I je najzastupljeniji protein u kosti (80) i neophodan je za rast i razvoj kosti. Takođe, osteopontin je jedan od glavnih sijaloproteina kosti koji igra veoma značajnu ulogu u procesu mineralizacije (81). Gen za osteokalcin vrši kodiranje za osteoblast-specifičan protein koji se stvara sa nastankom mineralizacije, u kasnim stadijumima diferencijacije (82). Ovakvi sijaloproteini kosti imaju γ -karboksiglutamat rezidue, specifične aminokiseline koje imaju dve karboksilne grupe koje igraju ulogu u inicijaciji mineralizacije povezujući se sa jonom kalcijuma (83). Ekspresija ovih molekula je kontrolisana za vreme osteogene diferencijacije (84, 85). Mineralni depoziti poreklom iz ćelija su stvoreni u *in vitro* uslovima u prisustvu β -glicerofosfata koji služi kao dodatni izvor fosfatnih jona (86, 87). Pokazano je i da alkalna fosfataza kovalentno vezana za spoljašnju površinu plazma membrane učestvuje u mineralizaciji tvrdih tkiva (88). Alkalna fosfataza koja se nalazi u osteoblastima se

oslobađa u medijum tokom sazrevanja ovih ćelija. Aktivnost alkalne fosfataze je neophodna za hidrolizu β -glicerofosfata čime započinje proces mineralizacije (89). Razumevanje osnovnih mehanizama za nastanak osteogene diferencijacije matičnih ćelija može biti od pomoći za dizajniranje funkcionalnih biomaterijala za poboljšavanje osteogeneze i izgradnju 3D koštanih tkiva.

Osteokonduktivni biomaterijali – skafoldi poboljšavaju vezivanje, migraciju i distribuciju ćelija koje učestvuju u procesu zarastanja kosti (73, 90, 91). Kada se porozan osteokonduktivni matriks implantira u kost, ćelije migriraju u slobodan prostor matriksa. Proces karakteriše inicijalno urastanje fibrovaskularnog tkiva i novih krvnih sudova. Ovo tkivo popunjava prazan prostor skafolda i praćeno je stvaranjem nove kosti (73).

Inženjerstvo koštanog tkiva, se zbog svoje uloge u polju interdisciplinarnog preseka inženjerstva, biologije i medicine, svrstava u jedan od najatraktivnijih pristupa u razvoju bioloških koštanih supstituenata koji imaju za cilj rekonstrukciju, očuvanje ili poboljšanje funkcije koštanog tkiva (73, 92).

1.5.1. Matične ćelije zubne pulpe u koštano tkivnom inženjerstvu

Nedavno otkriće matičnih ćelija periodontalnog tkiva kao što je zubna pulpa sugerise upotrebu ovih ćelija kao potencijalni izvor za koštano tkivno inženjerstvo. Opisana je mogućnost multipotentne diferencijacije ovih ćelija u odontoblaste, hondrocyte, osteoblaste kao i u endotelne ćelije, adipocyte i nervne ćelije (37, 93-95). Ove ćelije su klonogene i visoko proliferativne. Takođe, poseduju i tipičan profil imunoreaktivnosti kao i mezenhimalne ćelije koštane srži (22).

DPSC je dokazano da se diferenciraju u prekursor osteoblasta a potom i u osteoblaste u prisustvu medijuma za gajenje ćelija u kulturi, α -MEM sa 20% fetalnog goveđeg seruma (*engl.* fetal bovine serum, FBS), 2-fosfatnom askorbinskom kiselinom i L-glutaminom. *In vitro* je pronađeno da osteogena kultura za nekoliko nedelja proizvodi novo sintetisano fibrozno koštano tkivo sa gusto mineralizovanim matriksom. *In vivo* transplantacijom takvih DPSC u imunokopromitovanog miša stvoreno je

fibrozno lamelarno koštano tkivo koje sadrži osteocite (96). Nedavne studije o koštanotkivnom inženjerstvu su takođe pokazale potencijal za upotrebu DPSC u kombinaciji sa 3D matriksom kao podlogom. Implantacijom DPSC/3D poroznog kalcijum fosfatnog keramičkog konstrukta stvoreno je tvrdo tkivo nalik koštanom. DPSC su izolovane i kultivisane na HAP/TPC (hidroksiapatit/trikalcijumfosfat) keramičkim diskovima s 90% poroznosti. Osteogena diferencijacija *in vitro* je indukovana dodavanjem osteogenih suplemenata BMP-2, deksametazona, β -glicerofosfata i askorbinske kiseline u osteogenom medijumu. Ovi ćelije/nosači kompoziti su kultivisani 8 dana *in vitro* pre implantacije u imunokompromitovanog miša. Nakon 12 nedelja, nastala je dobro mineralizovana tvrda koštana formacija sa jasno vidljivim koncentričnim lamelarnim strukturama i delimično razvijenim hematopoetskim tkivom nalik koštanoj srži (97). U drugoj studiji, mineralizovano tkivo je nastalo autolognom implantacijom DPSC sa PLGA skafoldom (98). DPSC su izolovane iz zuba zeca i kombinovane sa 50/50 PLGA kopolimerom. Ovi konstrukti su zatim transplantovani subkutano u zečeve. Histološka analiza transplantiranih DPSC/skafold konstrukata pokazala je visoko mineralizovano tkivo koje ukazuje na potencijalnu kliničku upotrebu DPSC u koštano tkivnoj regeneraciji. Zamenici kosti treba da obezbede adekvatnu mehaničku jačinu, osteokonduktivnost, i kontrolisanu degradaciju u cilju stvaranja prostora za formiranje nove kosti. Priprema i karakterizacija skafolda za tkivno inženjerstvo, njegova poroznost, čvrstoća na pritisak i podesnost za migraciju ćelija glavni su kriterijumi za dobar skafold (72).

1.5.2. Biomaterijali u koštano-tkivnom inženjerstvu

Glavni sastav svakog tkiva u organizmu su ekstracelularni matriks (ECM) i ćelije. Matriks predstavlja biološki trodimenzionalni nosač (skafold) ćelijama i omogućava im adekvatnu sredinu i arhitekturu specifičnu za svako tkivo ponaosob (99). Služi ćelijama kao rezervoar za vodu, hranljive materije, citokine i faktore rasta i omogućava im da iste koriste.

Stvaranje novog tkiva nakon zasejavanja i proliferacije ćelija na različitim ćelijskim nosačima od biomaterijala predstavlja osnovu inženjerstva tkiva. Biomaterijali

koji se u ove svrhe upotrebljavaju moraju izazvati specifičnu reakciju ćelija na molekularnom nivou. Poželjno je da dođe do razgradnje biomaterijala tokom formiranja novog tkiva. Iz tog razloga, biokompatibilnost skafolda je najznačajnija kod ovih procesa. Ključ uspeha biokompatibilnosti je postizanje fizičke i mehaničke funkcije bez izazivanja bilo kakve nepoželjne reakcije domaćina. Od biomaterijala kao ćelijskog nosača očekuje se da izazove željenu reakciju domaćina. Iz toga razloga je izbor biomaterijala u ulozi skafolda ključna tačka u tkivnom inženjerstvu (100).

Uloga ćelijskih nosača je da odrede oblik novostvorenog tkiva i olakšaju migraciju ćelija na željeno mesto, njihov rast i diferencijaciju. Ćelije koje su zasejane na nosač u mogućnosti su da i samostalno regenerišu tkivo, bez uticaja nosača. Međutim, nosači u okviru svoje molekulske strukture uglavnom poseduju ligande (molekule za vezivanje ćelija) koje ćelije prepoznaju u odgovarajućem vremenskom trajanju i količini. Zato, skoro da više nema smisla koristiti potpuno inertne materijale niti materijale koji nemaju jasno definisanu aktivnost.

Tri osnovne grupe biomaterijala koji se koriste u konstrukcijama ćelijskih nosača u koštano-tkivnom inženjerstvu su: bioaktivni neorganski materijali (bioaktivna keramika, bioaktivno staklo), biološki ili sintetski polimeri, i kompoziti ovih materijala. Svi navedeni materijali imaju ulogu da privremeno ili stalno, preuzmu na sebe funkcije oštećenih koštanih tkiva. Osnovna pretpostavka paradigme tkivnog inženjerstva je da će se materijali resorbovati i vremenom biti zamenjeni sa novim regenerisanim biološkim tkivom samog organizma (101).

1.5.2.1. Bioaktivni neorganski materijali

Širok spektar bioaktivnih neorganskih materijala sličnih po sastavu mineralnoj fazi kosti su od kliničkog značaja, npr trikalcijum-fosfat, hidroksiapatit, bioaktivno staklo i njihove kombinacije (102).

Struktura apatita je veoma pogodna za supstituciju drugim jonima. Zamenom Ca^{2+} , PO_4^{2-} i OH^- jona drugim jonima može doći do promene u parametrima rešetke, morfologiji i rastvorljivosti. Biološki hidroksiapatit koji ulazi u sastav kostiju i zuba

razlikuje se od čistog – po stehiometriji, sastavu, fizičkim i mehaničkim osobinama. On je uvek karbonatno supstituisan i najčešće kalcijumom deficitaran što može značajno uticati na mehaničke osobine ovog minerala. Mehaničke osobine sintetskog hidroksiapatita uglavnom zavise od načina sinteze – temperature, pritiska, pH, uslova naknadne termičke obrade (sinterovanje) i sl. Hidroksiapatit (HAP) je krt i ne pokazuje adekvatnu otpornost na mehaničke stresove što je usko povezano sa njegovom poroznošću. Po svojoj strukturi, HAP može biti neporozan i porozan. Maksimalna poroznost neporoznog HAP-a (preciznije rečeno mikroporoznog) je do 5% od ukupne zapremine, veličina mikropora je oko 1 μ m dok je veličina kristala preko 2000Å. HAP ovakve strukture ima široku primenu u medicini i stomatologiji. Porozni HAP (pHAP) ima pore veličine najmanje 100 μ m čime je omogućeno prožimanje koštanim tkivom. Kalcijum-HAP se može dobiti i u formi bifaznog kalcijum fosfata kada je HAP u velikom delu u smesi sa trikalcijumfosfatom (103).

Bioaktivno staklo ako se uroni u biološku tečnost može u kratkom roku da proizvede bioaktivni sloj karbonatnog hidroksiapatita koji može da se veže za biološko tkivo. Osim toga, stakla se mogu sintetisati tako da oslobađaju jone silicijuma koji su sposobni da aktiviraju složene puteve genske transdukcije što dovodi do brže ćelijske diferencijacije i osteogeneze (104). Stopa resorpcije bioaktivnog stakla i keramike može se kontrolisati kristalnim hidroksiapatitom postojanim godinama nakon implantacije, dok ostali kalcijumovi fosfati imaju veću sposobnost resorpcije ali manju sposobnost da podnesu opterećenja (101).

Hidroksiapatit i drugi kalcijum fosfatni materijali smatraju se osteokonduktivnim i više od dve decenije su široko upotrebljavani kao koštani zamenici. Pokazano je da bioaktivna keramika koja se koristi u dentalnoj i ortopedskoj hirurgiji poboljšava rast i diferencijaciju osteoblasta. Osobina krtosti bioaktivnih neorganskih materijala znači da njihova mehanička slabost ne odgovara osobinama strukture kosti i da sami nisu dovoljno dobri materijali za ćelijske nosače. Međutim, njihova klinička primena je ograničena zbog mehaničke slabosti, krtosti i ekstremno sporog vremena degradacije (105).

1.5.2.2. Biološki i sintetički polimeri

Biološki polimeri, poput kolagena i hijaluronske kiseline, su takođe zanimljivi kandidati za tkivno inženjerstvo jer imaju osobine koje favorizuju vezivanje ćelija i podstiču hemotaksu. Međutim, postoji zabrinutost zbog imunogenosti, potencijalnog rizika od prenošenja bolesti, porekla izvora i slabih mehaničkih svojstava polimera.

Sintetički polimeri kao što su polifumarati, polilaktička kiselina (PLA), poliglitolna kiselina (PGA), kopolimeri PLA i PGA – polilaktid-koglikolna kiselina (PLGA) i polikaprolakton predstavljaju adekvatnu alternativu. Oni mogu biti obrađeni korišćenjem različitih tehnika da oblikuju niz različitih formi trodimenzionalnih skafolda, različite poroznosti i površinskih karakteristika (90, 106). Bitna osobina navedenih polimera je da njihova resorbilnost i mehaničke karakteristike zadovoljavaju razne vrste primena u maksilofacijalnoj i ortopedskoj hirurgiji na zbrinjavanju defekata kritične veličine. Takođe, pokazali su se pogodnim i kao fiksatori za podršku srastanja koštanih tkiva bez dodatne hirurške intervencije njihovog uklanjanja nakon srastanja (kod preloma kostiju). Zahvaljujući sposobnosti degradacije ovi materijali su veoma podobni i za razne druge primene koje obuhvataju i primene vezane za inkapsulaciju lekova sa kontrolisanim brzinama otpuštanja. Mogućnost kontrolisanja oblika i 3D mikroarhitekture skafolda je od koristi za napredak u izradi čvrstih polimera željene morfologije. Ovakvi polimeri podrazumevaju procese izrade jednog po jednog sloja skafolda koji će omogućiti izradu složene 3D anatomske arhitekture skafolda korišćenjem kompjuterski dizajnirane tehnike i podataka dobijenih skeniranjem pacijenta (107, 108).

Većina istraživanja je fokusirana na polimere koji se koriste u sredstvima odobrenim od strane američke uprave za hranu i lekove (US food and drug administration - FDA) ali su veliki naponi uloženi i u praćenje i ocenjivanje efekata mnogih novih polimera (109). Hidrogelovi (alginatni, npr polietilen glikol) su takođe popularni zbog minimalno invazivnog načina izolovanja i prevođenja u gel fazu *in situ* što im omogućava stvaranje 3D ćelijske mikrosredine sa visokim sadržajem vode. Njihova osobina viskoelastičnosti čini se posebno pogodnom za regeneraciju hrskavice mada su mnoga ispitivanja mogućnosti primene u kosti takođe u toku (101, 110). Prednost hidrogelova je u njihovom jednostavnom načinu izolovanja, hemijskoj

biofunkcionalnosti, sličnosti prirodnom ECM i pogodnosti za ćelijsku inkapsulaciju (111).

1.5.2.3. Kompozitni materijali

Kompozitni nosači moraju biti tako dizajnirani da se neorganske čestice ugrade u polimerni matriks i da se nalaze na površini kako bi ostvarili osteokonduktivnu funkciju. Neorgansko-organski kompoziti imaju za cilj da imitiraju prirodnu kost kombinujući viskoelastične osobine polimera sa čvrstoćom neorganskog dela kompozita za stvaranje bioaktivnih materijala sa poboljšanim mehaničkim svojstvima i vremenom degradacije. Takođe, bazni proizvodi razgradnje hidroksiapatita i trikalcijum-fosfata neutrališu kiselost polimernih jedinjenja. Zbog veće biaktivnosti, veće interesovanje se pokazuje za neorganske komponente nano strukture nego za iste mikrostrukture. Nanokompoziti na bazi hidroksiapatit-kolagen se posebno brzo razvijaju i pokazuju najbolje rezultate (112).

Upotreba prirodnih ili sintetičkih skafolda sa visokom poroznošću (slabe mehaničke osobine) i brzom kinetikom degradacije dovela je do proizvodnje graftova koji se mogu koristiti u sferama niskog opterećenja. Sredinom prošle decenije objavljena je upotreba jedinstvenog kompozitnog nosača u oblasti koštano tkivnog inženjerstva koji se sastojao od kombinacije biodegradabilnog PLGA i bioresorptivnog kalcijum fosfatnog cementa. Ovaj nosač je karakterističan po svojoj visokoj poroznosti (81-91%), sa makroporama od 0.8 – 1.8 mm, i poboljšanim mehaničkim osobinama zahvaljujući polimeru (113). Kombinacijom degradabilnog PLGA u obliku mikrosfera i kalcijum fosfatne keramike (slabo kristalnog CaP) koja je fuzionisana u te mikrosfere, dobijen je 3D skafold za regeneraciju kosti sa poroznom interkonekcijom i mehaničkim osobinama sličnim trabekularnoj kosti (114). Danas, jedan od najčešće korišćenih polimera za izradu kompozitnih skafolda je PLGA zbog svoje proverene biokompatibilnosti i stepena degradacije koji se može regulisati međusobnim odnosom kopolimera (PLA i PGA) (67, 115). U najnovije vreme razvijaju se materijali na bazi kompozita HAP/HDPE (HAP/polietilen visoke gustine) i PLGA/HAP kompozita čije su osobine slične osobinama kosti jer su visoko biokompatibilni i mogu da oponašaju

prirodnu kost. Na taj način, ovi materijali postaju obećavajuće matrice kosti pod opterećenjem koje bi mogle da obezbede optimalnu ćelijsku diferencijaciju i mineralizaciju koštanih tkiva. Ćelije na takvim materijalima lako adheriraju, posebno na hidroksiapatitnoj površini, što ukazuje na dobru ćelijsku proliferaciju i integraciju koštanih implanta (116).

Sol-gel obrada, termički indukovana fazna separacija, jedan je od interesantnih načina na koji se mogu kombinovati neorganska i organska komponenta 3D nanokompozitnog skafolda sa kontrolisanom mikro i makrostrukturom za nesmetanu proliferaciju koštanog tkiva (117). Za proizvodnju pomenutih skafolda koriste se razne tehnike: konvencionalne tehnike livenja u polimernoj matrici u dobro definisanim formama kalupa, fazna separacija, sinterovanje mikrosfera, kreiranje skafolda korišćenjem tehnike templejta polimernih pena, tehnike proizvodnje skafolda primenom vlakana ili tehnika umakanja, elektroforetske depozicije, biomimetsko asembliranje tehnikom superkritičnih pritisaka (kao kod pripreme skafolda na bazi kompozita HAP i PLGA), tehnike membranske laminacije, tehnike visokih pritisaka, tehnika liofilizacije i tehnika brzog štampanja različitih formi skafolda unapred kreiranih pomoću odgovarajućih kompjuterizovanih programa (116).

Ključni zahtev za adekvatnu primenu skafolda je visok nivo kontrole njihovih mikro i makrostrukturnih osobina pri procesu izrade. Tehnike izrade treba da budu odabrane tako da ne menjaju hemijske i biokompatibilne osobine materijala jer bi i minimalne promene mogle ograničiti efekte kliničke primene skafolda. Neophodno je da materijal bude proizveden u preciznoj geometriji da bi se uklapao na mestu implanta, da ima međusobno povezane pore i dovoljno visoku gustinu pora pravilne morfologije, veličine i distribucije i da, pri tom, njegov kvalitet bude visoko reproduktivan.

Pokušaj postizanja iste organizacije na nano nivou kao što je organizacija prirodne kosti je i dalje u pokušaju. Mehaničke osobine dosadašnjih kompozita još uvek ne zadovoljavaju u potpunosti osobine prirodne kosti niti pokušavaju da dostignu njihovu anizotropiju (101).

Matične ćelije i skafoldi imaju esencijalnu ulogu u stvaranju novog tkiva putem tkivnog inženjstva. Ćelijska komponenta je neophodna zbog stvaranja i uspostavljanja

ekstracelularnog matriksa u novom tkivu, dok su skafoldi zaduženi za obezbeđivanje mehaničke stabilnosti i temelja trodimenzionalne organizacije novog tkiva (73, 118). Iz tih razloga, usklađenost ćelijskih komponenti i skafolda je veoma važna za uspeh tkivnog inženjstva.

Oblast istraživanja ove doktorske disertacije obuhvata ispitivanje uticaja prirodnih i sintetskih osteokonduktivnih biomaterijala na diferencijaciju mezenhimalnih ćelija izolovanih iz zubne pulpe mlečnih zuba sa resorbovanim korenom. Dosadašnje studije su pokazale da obe grupe materijala u ulozi skafolda ispoljavaju pozitivan osteogeni potencijal (114, 119). Međutim, komparativne studije su ostale nedovoljno ispitane kao i poređenje uticaja skafolda na diferencijalni kapacitet mezenhimalnih ćelija zubne pulpe. Iz navedenih razloga, napredak u tehnikama za ekspanziju matičnih/progenitornih ćelija i efekat biomaterijala na osteogenu diferencijaciju ćelija predstavlja istraživačko polje sa velikom perspektivom. Istraživanje je od izuzetnog značaja sa aspekta koštano tkivnog inženjstva i primene ispitivanih poroznih biokompatibilnih osteokonduktivnih materijala u regenerativnoj medicini.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Za potrebe naučnog ispitivanja definisan je sledeći cilj istraživanja ove doktorske disertacije:

- Ispitivanje diferencijalnog kapaciteta mezenhimalnih ćelija zubne pulpe u odnosu na 4 različita ćelijska nosača – skafolda.

Za postizanje postavljenog cilja istraživanja, definisani su sledeći zadaci:

- Izolovanje mezenhimalnih ćelija zubne pulpe poreklom iz humanih mlečnih zuba u fiziološkoj smeni;
- Karakterizacija izolovanih ćelija metodom protočne citometrije;
- Ispitivanje osteogenog potencijala diferencijacije mezenhimalnih ćelija zubne pulpe poreklom iz humanih mlečnih zuba;
- Određivanje citotoksičnosti ispitivanih biomaterijala i evaluacija ćelijske vijabilnosti mezenhimalnih ćelija nakon kontakta sa njima;
- Procena stepena ćelijske adhezije i proliferacije na različitim osteokonduktivnim biomaterijalima;
- Ispitivanje uticaja različitih osteokonduktivnih materijala na potencijal diferencijacije mezenhimalnih ćelija zubne pulpe u osteoblaste.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Prikupljanje i ekstrakcija mlečnih zuba

U istraživanje je bilo uključeno 24 dece oba pola uzrasta 6 do 9 godina koja su se javila na Kliniku za dečju i preventivnu stomatologiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu radi ekstrakcije zdravih mlečnih zuba u fiziološkoj smeni. Roditelji svih učesnika su bili obavješteni o postupku ispitivanja i potpisali su informisani pristanak. Za obavljanje istraživanja i prikupljanje humanog materijala dobijena je saglasnost Etičkog odbora Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu broj 36/8, 25. marta 2011. godine.

Neposredno pre ekstrakcije krunice zuba su bile premazane 0.3% hlorheksidin gelom u trajanju od 2 minuta. Ekstrakcija zdravih mlečnih zuba u fiziološkoj smeni se radila u lokalnoj anesteziji uobičajenom stomatološkom metodom. Postupak ekstrakcije nije bio izmenjen, nije trajao duže i nije odstupao ni na koji način od uobičajene stomatološke procedure ekstrakcije navedenih zuba. Ekstrahovani zubi su se čuvali u sterilnom fosfatnom puferu (PBS-u, *engl.* phosphate buffered saline, 0.01M, pH 7.4) kome su dodati antibiotici (100 U/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina), ohlađenom na 4°C najduže 6 h nakon ekstrakcije.

3.2. Izolovanje mezenhimalnih ćelija zubne pulpe iz eksfoliranih mlečnih zuba metodom „outgrowth“

Zubna pulpa je pažljivo izdvojena pomoću dentalnog ekskavatora i/ili nerv igle, zatim isprana 2 puta u sterilnom PBS-u kome su dodati antibiotici (100 U/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina), i uz minimalnu disekciju preneti u 35 mm Petri šolju u kojoj se nalazio kompletan medijum sačinjen od Dulbecco modifikovanog Iglvog medijuma (Dulbecco modified Eagles medium, DMEM/Ham's F12 with Glutamax, 1:1, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) sa dodatkom 15% fetalnog govedeg seruma (*engl.* fetal bovine serum, FBS, PAA Laboratories, Pasching, Austrija), 100 U/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina. Ovako pripremljeni tkivni eksplant zubne pulpe je upotrebljen za izolovanje mezenhimalnih ćelija zubne pulpe. Prve mezenhimalne ćelije uočene su nakon 3 dana, dok je za prvu tripsinizaciju bio potreban period od dve nedelje

inkubacije na 37°C u prisustvu 5% CO₂ (3 GAS RTG 5000 T-9-VBC Incubator, Thermo Electron Corporation, Valtham, MA, SAD)

3.3. Pasažiranje i krioprezervacija mezenhimalnih ćelija zubne pulpe iz eksfoliranih mlečnih zuba

3.3.1. Pasažiranje ćelija

Pasažiranje ćelija (subkultivacija ili razdvajanje ćelija) podrazumeva presejavanje određenog, manjeg broja ćelija u novu posudu/flask. Ćelije se mogu gajiti duži vremenski period ako se redovno vrši njihova podela koja podrazumeva izbegavanje visoke konfluencije odnosno prevelike gustine ćelija. Ćelijske suspenzije se pasažiraju kultivisane u adekvatnoj zapremini svežeg medijuma potrebnog za ćelijsku proliferaciju (razmnožavanje). Adherentne ćelijske kulture, kao što su kulture mezenhimalnih ćelija zubne pulpe, zahtevaju prethodno odvajanje od dna posude u kojoj su kultivisane metodom tripsinizacije.

Za pasažiranje, ćelijske suspenzije su nakon tripsinizacije centrifugirane u Eppendorf 5804 centrifugi (7 min, 1700 obrtaja/min.) i resuspendovane u 2 ml kompletnog medijuma a zatim zasejavane u flaskove površine 75 cm² (BD Falcon tissue-culture treated flasks, Bedford, MA, SAD) i inkubirane. Medijum je menjan svakih 48 h narednih 4-5 dana dok ćelije nisu dostigle konfluenciju od 70-80%. Na taj način dobijena je naredna pasaža gajene ćelijske kulture.

Za potrebe istraživanja, korišćene su pasaže 4, 5 i 6.

3.3.2. Tripsinizacija ćelija

Tripsinizacija ćelija podrazumeva proces odvajanja adherentnih ćelija od dna posude u kojoj su zasejane.

Iz inkubiranog flaska sa ćelijama (u 70-80% konfluenciji) je odliven medijum, ćelije su isprane u PBS-u 2 puta, a zatim disocirane sa 2 ml tripsina (TrypLE Express Stabile Trypsin Replacement Enzyme without Phenol Red, Invitrogen, Danska) koncentracije 0.05%, nakon čega je usledila inkubacija 1-2 minuta tokom koje su se ćelije „odlepile“ od dna flaska i zaokruglile. Zatim je dodato 2 ml FBS koji inhibira dejstvo tripsina i kompletna suspenzija je presuta u epruvetu zapremine 15 ml. Epruveta

je dopunjena sa DMEM/F12 medijumom i centrifugirana 7 minuta na 1700 obrtaja/min. Po zavšetku centrifugiranja supernatant je odliven, a talog sa tripsinizovanim ćelijama je resuspendovan sa 2 ml kompletnog medijuma. Tako dobijena ćelijska suspenzija je blago promućkana da bi se ćelije homogenizovale.

Nakon tripsinizacije ćelijska suspenzija je korišćena za zasejavanje za potrebe eksperimenata, zamrzavana na -80°C ili zasejavana u novi flask u svrhu narednog pasažiranja.

3.3.3. Zamrzavanje ćelija

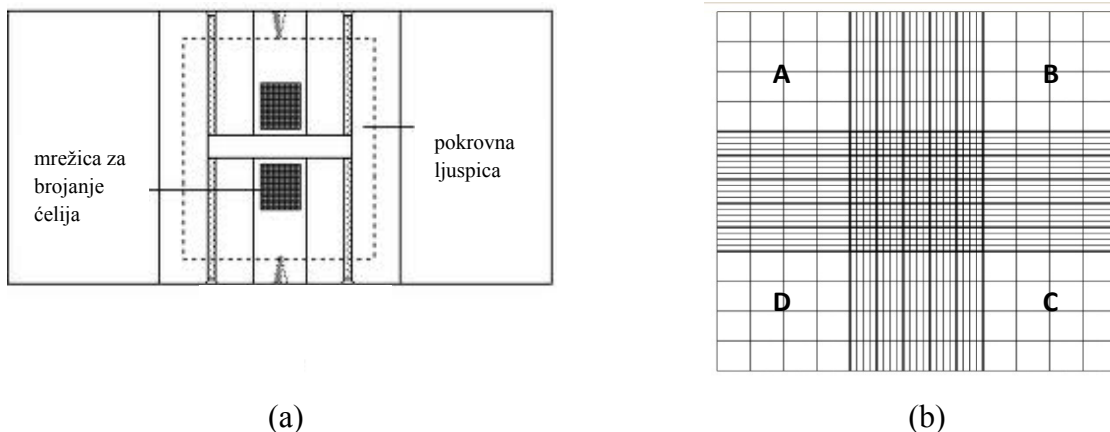
Ćelijska suspenzija koja je predviđena za zamrzavanje je centrifugirana 7 minuta na 1700 obrtaja/min. Nakon odlivanja supernatanta, ćelije su resuspendovane u DMEM/F12 medijumu sa 20% FBS i 10% dimetil-sulfoksidom (*engl.* dimethylsulfoxide, DMSO, Sigma, St. Louis, Mo., SAD) i tako zamrznute u prethodno obeleženim kriovajlama. Broj ćelija u 1.5 ml medijuma za zamrzavanje je bio oko 1×10^6 .

3.3.4. Odmrzavanje ćelija

Ćelijske suspenzije zamrznute u kriovajlama su odmrzavane na 37°C u vodenom kupatilu u trajanju od 2 minuta, a zatim isprane 2 puta u kompletnom medijumu kako bi se odstranio toksični DMSO i centrifugirane (7 min, 1700 obrtaja/min). Nakon odlivanja supernatanta, ćelije su resuspendovane u 1 ml kompletnog medijuma, zasejane u flask (75 cm^2) sa 20 ml kompletnog medijuma i inkubirane.

3.3.5. Brojanje ćelija metodom Tripan-plavog

Za potrebe eksperimenta bilo je neophodno zasejati određeni broj ćelija na skafold ili zamrznuti određeni broj ćelija. Da bi se izdvojio željeni broj, ćelije je bilo potrebno prethodno izbrojati. U jedan bazen mikroploče sa 96 bazena sipano je u jednakoj razmeri 0.4% tripan plavog rastvorenog u PBS-u i ćelijske suspenzije. Uzeto je 10 μl dobijene obojene suspenzije i sipano na hemocitometar za brojanje ćelija u predelu ivice pokrovne ljustice tako da je suspenziji omogućeno da „sklizne“ ispod ljustice.



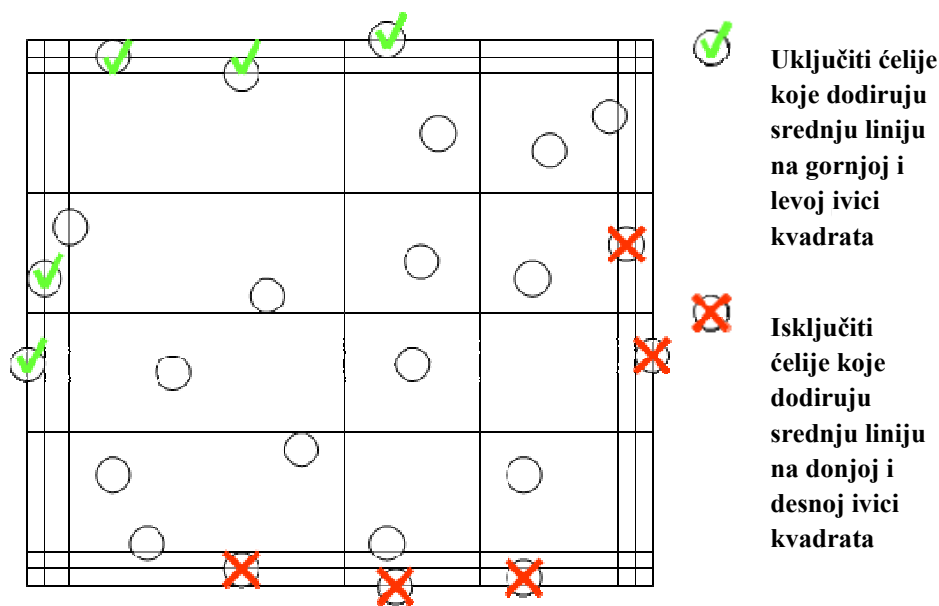
Slika 1. (a) Hemocitometar, (b) mrežica za brojanje ćelija

Komora (hemocitometar) (Slika 1a) je staklena pločica na kojoj se nalaze 4 žljeba koja ograničavaju tri polja. Srednje polje je podeljeno na dva dela, i na njima su urezane mrežice za brojanje ćelija. Površina mrežice je podeljena na 9 velikih kvadrata od kojih svaki ima površinu po 1 mm^2 . Za potrebe eksperimenta, računat je broj ćelija u 4 velika kvadrata, na Slici 1b obeležena sa A, B, C i D. Svi veliki kvadrati su podeljeni na 16 srednjih kvadrata površine $1/16 \text{ mm}^2$. Svaki kvadrat pokriva tečnost u kojoj su ćelije, zapremine $0,1 \text{ mm}^3$ ($0.1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}^2$), što je u stvari 10^{-4} cm^3 . Pošto je 1 cm^3 jednak 1 ml , onda se ukupan broj živih (vijabilnih) ćelija (N) u 1 ml izračunava po formuli:

$$N = n/4 \times 2 \times 10^4 \text{ cel/ml}$$

Po formuli, broj ćelija u 1 ml jednak je proizvodu srednjeg broja izbrojanih ćelija po kvadratu ($n/4$), faktora razblaženja (2) i konstante komore (10^4). Ukupan broj ćelija zavisi od toga iz kolike je zapremine uzeto $50 \mu\text{l}$ uzorka za brojanje, dakle izračunava se množenjem broja ćelija u jednom mililitru sa brojem mililitara ćelijske suspenzije.

Shematski prikaz brojanja ćelija prikazan je na Slici 2.



Slika 2. Shematski prikaz brojanja ćelija na hemocitometru.

3.4. Karakterizacija mezenhimalnih ćelija zubne pulpe metodom protočne citometrije

Protočna citometrija je metoda kojom se mere fenotipske, biohemijske i molekularne karakteristike ćelija u trenutku kada one prelaze preko laserskog zraka stvarajući optičke signale koje registruje niz detektora. Ćelijska svojstva kao što su veličina, intra- i ekstracelularne komponente i sadržaj DNK se takođe mogu meriti metodom protočne citometrije. Adultne humane mezenhimalne ćelije su retke ćelije nalik fibroblastima koje su sposobne za diferencijaciju u različite ćelijske tipove, uključujući osteoblaste, hondroците i adipocite. Konvencionalni površinski markeri za karakterizaciju humanih mezenhimalnih matičnih ćelija su CD29, CD73, CD90, i CD105 kao pozitivni i CD14, CD19, CD34, CD45 i HLA-DR kao negativni markeri, odnosno markeri kojima se potvrđuje odsustvo drugih tipova ćelija (120). U svrhu istraživanja korišćena su 3 pozitivna markera: PE-Cy5 Mouse Anti-Human CD29, PE Conjugated Mouse Anti-Human CD 73, PE Mouse Anti-human CD90 (Thy-1) i jedan negativni marker, marker primitivnih hematopoetskih progenitora: PE Mouse Anti-Human CD34. Na taj način je pokazano da sve ispitivane ćelije (tj. preko 99%) pripadaju grupi mezenhimalnih ćelija, kao i da nije detektovano prisustvo drugih tipova ćelija. Svi navedeni markeri su proizvedeni od strane BD Biosciences Pharmingen,

SAD. Kao izotipska kontrola, za određivanje nespecifičnog vezivanja, kod svih markera je korišćen mišji imunoglobulin-1 (IgG1) istog proizvođača.

U epruvetu sa 1×10^6 ćelija (pasaže 4) je sipano 2 ml PBS-a i centrifugirano (7 min, 1700 obrtaja/min). Nakon odlivanja supernatanta postupak je ponovljen i time su ćelije isprane od medijuma. Zatim su ćelije resuspendovane u 100 μ l pufera (PBS) i podeljene u dve epruvete po 50 μ l, u koje je zatim dodato po 5 μ l konjugovanih primarnih antitela navedenih pozitivnih i negativnih markera. Sadržaj u epruveti je inkubiran 30 min na sobnoj temperaturi, u mraku, kako bi se antitela vezala za receptore na površini ćelija. Ćelije su zatim isprane u 300 μ l komercijalne tečnosti za ispiranje ćelija "cell-wash" (Wash buffer BD Biosciences, San Diego, SAD), da bi se odstranio višak antitela koja se nisu vezala za ćelije. Suspenzija je resuspendovana u 0.5 ml PBS-a i analizirana na protočnom citometru (FACS calibur cytometer/ FACS calibur BD Biosciences, San Diego, SAD). Monoklonska antitela koja su se vezala za površinu ćelija, su obeležena fluorescentnom bojom, tako da protočni citometar detektuje emitovanu fluorescencu. Na taj način detektovane su i izbrojane ćelije koje eksprimiraju molekule za koje su se vezala obeležena antitela. Podaci su analizirani na Cell Quest softveru.

3.5. 3D biomaterijali – sinteza

Za potrebe ovog istraživanja korišćen je novi sintetički biomaterijal, porozni hidroksiapatit, dobijen metodom templejta polimerne pene na bazi poliuretana u Laboratoriji za radijacionu hemiju i fiziku Instituta za nuklearne nauke "Vinča" u Beogradu.

Postupak dobijanja kompozitnog keramičkog nosača, poroznog hidroksiapatita (pHAP) sa polimernim tankim filmom, odvijao se u nekoliko faza. Početna faza odnosila se na sintezu praha hidroksiapatita. Kao prekursor u ovom procesu korišćena je smeša koja se sastojala od 500 ml vodene smeše $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ($3,02 \text{ cmol}^{-2}$) i 500 ml vodenog rastvora $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ($2,32 \text{ cmol}^{-2}$). Nakon intenzivnog mešanja, pH vrednost smeše je podešena na 9 dodavanjem uree, nakon čega je u autoklavu pod pritiskom od 15 bara, na temperaturi od 150°C tokom 8 h tretmana, usledila hidrotermalna sinteza pHAP-a u obliku praha. Tako su dobijene čestice veličine ispod 200 nm sa veoma pravilnom geometrijom.

U drugoj fazi radilo se na dobijanju čestica što veće aktivnosti, veće specifične površine i stepena amorfizacije površine praha. U tu svrhu pHAP prah je tretiran mehanohemijski. Dobijene su čestice nanometarskog reda veličine (< 20 nm), što je odgovaralo redu veličine kristalnih domena (uređenih delova čestice), pre mehanohemijskog tretmana. Radi dobijanja odgovarajuće suspenzije podešen je odnos tečne i čvrste faze tako da suspenzija ima odgovarajuću konzistenciju i reologiju pogodnu za izlivanje. Kad je postignut optimum viskoznosti suspenzije, njome je natopljena poliuretanska pena dobro definisane poroznosti. Potom je celi sistem podvrgnut procesu pirolize i sinterovanja na 800°C u prvom koraku, a na 1300°C u drugom koraku, čime su dobijeni visokoporozni kompakti kalcijum hidroksiapatita-skafoldi. Usledila je granulacija skafolda.

Delići granula koji su manji od $300\ \mu\text{m}$ korišćeni su za dobijanje ekstrakta za potrebe testa citotoksičnosti materijala i za taloženje (depoziciju) tankog filma na plastičnim pločama, kao i za određivanje ćelijske adhezije i proliferacije i stepena osteoblastne diferencijacije mezenhimalnih ćelija. Deponovanje granula na plastične pločice izvedeno je uz pomoć polistirenskog lepka prema sledećoj proceduri: Okrugle plastične pločice prečnika $13\ \text{mm}$ debljine oko $1\ \text{mm}$ su premazane slojem polistirenskog lepka, nako čega su na njih deponovane fine čestice ($\leq 300\ \mu\text{m}$) hidroksiapatita. Došlo je do „lepljenja“ monosloja granula za površinu pločica, a ostatak granula je uklonjen.

Završna faza je obuhvatala dobijanje visoko aktiviranih površina na keramičkim pHAP nosačima depozicijom tankih polimernih filmova. Polimeri koji su korišćeni u procesima deponovanja bili su: alginat, PLGA (polilaktid-koglikolna kiselina) i polimer etilen vinil acetat/versatata (EVA/EVV). Na taj način dobijena su 3 različita skafolda, označena kao pHAP+alginat, pHAP+PLGA i pHAP+EVA/EVV, koji su korišćeni u ovom doktoratu za ispitivanje diferencijalnog kapaciteta mezenhimalnih ćelija zubne pulpe.

Nadoknada izgubljenog koštanog tkiva upotrebom Bio Oss-a, se u praksi koristi kao „zlatni standard“. Ovaj prirodni zamenik kosti pospešuje rast kosti u koštanim defektima. Zbog spore degradacije, Bio Oss granule se koriste i u oralnoj implantologiji da bi nadoknadili gubitak koštane mase nastao resorpcijom kosti ili remodelovanjem nakon augmentacijskih procedura. Iz navedenih razloga, kao pozitivna kontrola

upotrebljen je upravo Bio Oss koji se u praksi najčešće koristi kao zamenik kosti u nadoknadi koštanog tkiva (Bio Oss®, cancellous granule 0.25-1.0 mm veličine, Geistlich AG, Wolhusen, Švajcarska).

Prekrivanje pHAP nosača odgovarajućim polimernim filmom izvedeno je korišćenjem vodenih rastvora, osim u slučaju PLGA koji je hidrofoban, zbog čega je kao rastvarač korišćen hloroform. Nakon infiltracije rastvora unutar pora pHAP nosača, nosač je sušen da bi se dobio film polimera na površini i da bi se uklonio rastvarač. Prosečna debljina deponovanih polimernih filmova bila je 10 μm . Okrugla plastična pločica sa skafoldom je zatim polistirenskim lepkom zalepljena za dno bazena ploče sa 24 bazena.

Biomimetski postupak je izveden tako što su granule potopljene u superzasićenu simuliranu telesnu tečnost (*engl.* simulated body fluid, SBF). Granule su stajale u SBF 6 nedelja na temperaturi od 37 °C u univerzalnim pećima (UNB 400, Memmert, Schwabach, Nemačka). Tokom inkubacije volumen SBF je kontrolisan i održavan konstantnim dodavanjem dejonizovane vode, pH 7.4. Koncentracija Ca^{2+} je periodično verifikovana uz pomoć atomske apsorpcione spektroskopije. Posle inkubacije, uzorci su se sklanjali sa medijuma, ispirali dejonizovanom vodom i određivale su se njihove karakteristike. Ovom metodom dobijen je biomimetski apatit na površini nosača (na tankom filmu polimera), vrlo sličan biološkom apatitu i veoma pogodan za naseljavanje ćelija.

3.5.1. Karakterizacija ispitivanih biomaterijala

Struktura hidroksiapatita, tankih polimernih filmova i faza koje su biomimetskim procesom nastale na različitim polimernim filmovima su ispitane uz pomoć Fourier-ove transform infracrvene spektroskopije (*engl.* Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR, Nicollet 380 FTIR, Thermo Electron Corporation, Valtham, MA, SAD) u prigušenoj totalnoj refleksiji (*engl.* attenuated total reflection, ATR). FTIR spektar je sniman u spektralnom opsegu 4000-400 cm^{-1} . Ovim snimanjem dobijena je informacija o morfologiji i mikrostrukturi ispitivanih uzoraka.

Metod rentgenske difrakcije (*engl.* X-ray diffraction, XRD, Philips PW 1050, Eindhoven, Holandija) je korišćen za strukturnu analizu faza hidrotermalno dobijenog pHAP i pHAP koji je biomimetski nastao na površini polimernih filmova deponovanih

na pHAP nosačima. Podaci su analizirani u opsegu 2θ od 9 do 67° sa korakom skeniranja od 5° i vremenom ekspozicije od 2 sekunde po koraku. Veličina kristalita je izračunata pomoću Šererove jednačine:

$$d = K\lambda/B\cos\theta,$$

gde d (u nm) predstavlja prosečan prečnik kristalita,

K - faktor oblika,

B - širina difrakcije (121) na polovini njene maksimalne visine,

λ - talasna dužina korišćenih rentgenskih zraka,

θ - Brag-ov ugao difrakcije.

Skening elektronska mikroskopija je korišćena da bi se ispitala morfologija i mikrostruktura svih uzorka, posebno hidrotermalno sintetisanog pHAP i iz njega dobijenih keramičkih nosača, kao i faza biomimetskog pHAP deponovanih na površini tankih filmova polimera, prethodno deponovanih na pHAP nosačima. Postupkom spaterovanja uzorci su prevučeni zlatom, a potom su njihova morfologija i energetsko disperzivna analiza (*engl.* energy disperse spectroscopy, EDS) praćene pomoću skening elektronskog mikroskopa (SEM, JSM-5300, Jeol, Japan). Za snimanje površine pHAP nosača korišćena je mikroskopija atomskih sila (*engl.* atomic force microscopy, AFM Q-Scope 350, AFM Quesant Instrument Corporation, Santa Cruz, CA, SAD).

Za određivanje specifične površine pHAP praha i njegove mikro- i nanoporoznosti korišćena je tzv. BET metoda (121), koja se zasniva na merenju adsorpcije azota na -196 °C na odgovarajućoj aparaturi opremljenoj sa TCD detektorom (Gas chromatograph Varian Aerograph, model 920, Zug, Švajcarska). Specifična površina se izračunava sa BET metodom u jednoj tački. Polazi se od pretpostavke da su sintetizovane čestice sferoidnog oblika što omogućava određivanje njihovog srednjeg prečnika na osnovu formule:

$$dBET = 6/\rho Sw$$

gde je Sw specifična površina, a ρ teorijska gustina HAP (3.156 g/cm³).

3.6. Ispitivanje citotoksičnosti analiziranih materijala, procena ćelijske adhezije i proliferacije

Ovaj deo istraživanja sproveden je u Institutu za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu. Ispitivanje indirektno citotoksičnosti analiziranih biomaterijala i evaluacija ćelijske viabilnosti urađeni su MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testom, a kvantitativna procena ćelijske adhezije i proliferacije metodom direktne citotoksičnosti pomoću laktat-dehidrogenaza (LDH) testa.

U ispitivanjima direktne i indirektno citotoksičnosti korišćene su mezenhimalne matične ćelije zubne pulpe ekfoliranih mlečnih zuba. Za postizanje optimalnih uslova ćelije su gajene u odgovarajućim posudama, u hranljivom medijumu (DMEM/F12) uz dodatak 10% fetalnog goveđeg seruma, penicilina (100 IU/ml) i streptomicina (100µg/ml). Nakon suplementacije, pH hranljive podloge je rastvorom bikarbonatnog pufera doveden do vrednosti 7,2 i podloga je sterilisana filtriranjem kroz filter veličine pora 0,22 µm. Uslovi gajenja su podrazumevali temperaturu od 37°C, u atmosferi vazduha, sa 5% CO₂.

Optimizacija uslova gajenja ćelija podrazumevala je konstruisanje krive rasta ćelija u zavisnosti od vremena gajenja, za različite koncentracije ćelija zasađenih u nultom vremenu. Broj ćelija, koji je srazmeran apsorbanciji (490 nm, Labsystems Multiskan PLUS, Finska), je određivan nakon 2 h, 24 h, 48 h, 72 h i 96 h, pri sadenju 500, 1000, 2000, 4000 i 6000 ćelija. Na osnovu kriva rasta izračunato je vreme duplikacije ćelija, a na osnovu njega, optimalan broj ćelija korišćen u eksperimentima. Optimalan broj je iznosio 2000 ćelija po bazenu ploče sa 96 bazena, kod ispitivanja indirektno toksičnosti, odnosno 250000 po bazenu ploče sa 24 bazena, kod ispitivanja direktne toksičnosti.

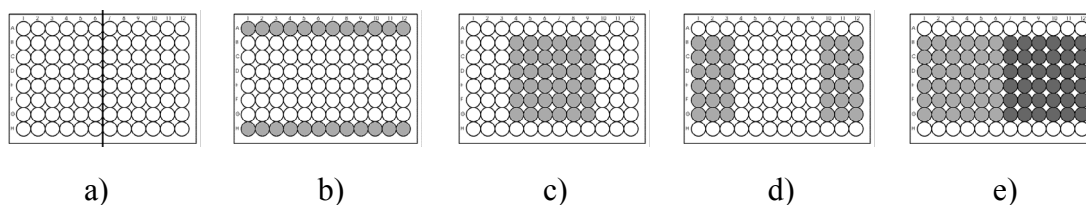
3.6.1. Ispitivanje indirektno citotoksičnosti – MTT test

Ispitivanje indirektno toksičnosti podrazumeva ispitivanje toksičnosti ekstrakata ispitivanih jedinjenja, odnosno njihovih degradacionih proizvoda na ćelije *in vitro*. Ispitivani ekstrakti dobijeni su suspendovanjem jedinjenja u podlozi za gajenje ćelija (DMEM/F12) u koncentraciji od 0,2 g/ml i inkubiranjem na 37°C u trajanju od 24 h ili 7

dana, uz konstantnu agitaciju. Nakon inkubacije, dobijene suspenzije su centrifugirane 7 min na 1700 obrtaja u minuti, dekantovane, izmerena je pH vrednost dobijenih rastvora i rastvori su filtrirani kroz filter veličine pora 0.22 μm da bi se sterilisali. Ovako dobijeni ekstrakti su dalje korišćeni za tretiranje ćelija u cilju ispitivanja indirektno citotoksičnosti.

Za ispitivanje delovanja ekstrakata biomaterijala, ćelije su nakon tripsinzacije resuspendovane u hranljivoj podlozi i u odgovarajućem broju zasejavane u mikroploču sa 96 bazena.

Protokol zasejavanja prikazan je na Slici 3.

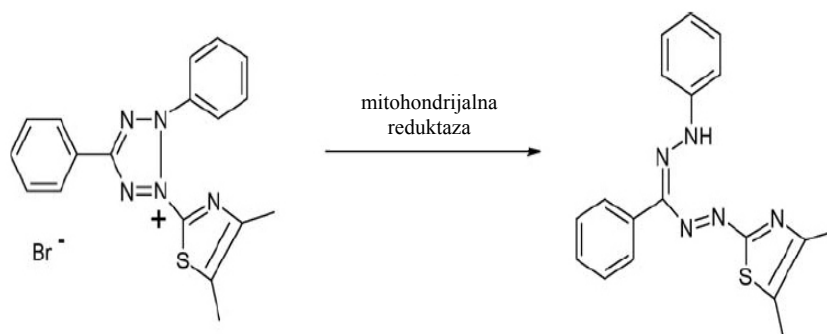


Slika 3. Faze u postavljanju eksperimenta za određivanje delovanja agenasa na ćelije u kulturi. Detalji zasejavanja su opisani u tekstu.

Na jednoj mikroploči sa 96 bazena moguće je ispitati delovanje 2 različita jedinjenja (a). U redove A i H mikrotitar ploče dodata je podloga, kako bi se zadržala dovoljna vlažnost u ploči prilikom inkubacije (b). U redove B-F, u kolonama 4-9 zasejan je optimalan broj ćelija (c) tj. 2000 ćelija po bazenu kako je prethodno određeno iz kriva eksponencijalnog rasta (Materijal i metode 4.6.) Ćelije su bile suspendovane u po 100 μl podloge. U kolone 1-3 i 10-12 u redovima B-F dodato je 100 μl podloge (bez ćelija) (d). Apsorbance u ovim bunarima korišćene su kao slepe probe. Nakon 24 h od zasejavanja, ćelije su adherirale za dno ploče i ušle u fazu eksponencijalnog rasta. Iz ploča je aspiriranjem uklonjena podloga i dodate su serije razblaženja ispitivanih rastvora, odozgo na dole, od najmanje do najveće koncentracije (e) u ukupnoj zapremini od 100 μl . Red B predstavlja kontrolu, tj. u bazene je dodato samo 100 μl hranljive podloge. Mikroploča je nakon toga inkubirana 72 h pri temperaturi od 37°C, u atmosferi vazduha, sa 5% CO_2 .

MTT test u mikrokulturi je test za *in vitro* određivanje osetljivosti (hemosenzitivnosti) ćelija na delovanje različitih supstanci. MTT (3[4,5-dimetiltiazol-2-

il]-2,5-difenil tetrazolijum bromid) je tetrazolijumska so žute boje koja se u metabolički aktivnim ćelijama, redukcijom reakcijom u mitohondrijama, u prisustvu enzima sukcinat dehidrogenaze kao katalizatora, prevodi u kristale formazana (Slika 4). Ljubičasti kristali formazana, inače nerastvorni u vodenom rastvoru, se rastvaraju dodavanjem natrijum dodecil sulfata (SDS) ili nekog drugog rastvarača. Tako dobijen rastvoren formazanski produkt se spektrofotometrijski kvantifikuje na ELISA čitaču (Labsystems Multiskan PLUS, Finska) na talasnoj dužini od 570 nm.



Slika 4. Redukcija tetrazolijumske soli do formazana

Metodu je prvi put opisao Mosman (122), a u dalje opisanim eksperimentima ustalila se primena modifikacije Mosmana-ove metode, koju su dali Ohno i Abe (123). Modifikacija se odnosi na korišćenje SDS-a umesto dimetil sulfoksida (DMSO) za rastvaranje nastalog formazanskog proizvoda, čime se povećava osetljivost testa i eliminiše korak odlivanja, usled koga može da dođe do gubitka ćelija koje su u mitozu.

Nakon inkubacije ćelija sa odgovarajućim agensom u bazene mikrotitar ploče dodaje se po 10 μ l MTT radnog rastvora, koncentracije 5 mg/ml u fosfatnom puferu. Mikrotitar ploče se inkubiraju 3 h u inkubatoru na 37°C u sredini obogaćenoj sa 5% CO₂, nakon čega se u bazene dodaje 100 μ l 10% SDS-a u 0,01 M HCl, a narednog dana optička gustina dobijenog obojenog proizvoda meri se na čitaču mikroploča na talasnoj dužini od 570 nm.

Preživljavanje (S, *engl.* survival) je kvantifikovano korišćenjem formule za dobijanje indeksa preživljavanja S:

$$S = \frac{A_{uzorka} - A_{sl.proba}}{A_{kontrola} - A_{sl.proba}}$$

A_{uzorka} - srednja vrednost izmerene apsorbance na 570 nm u otvoru sa tretiranim ćelijama

$A_{kontrola}$ - srednja vrednost izmerene apsorbance na 570 nm u otvoru sa netretiranim ćelijama

$A_{sl.proba}$ - srednja vrednost izmerene apsorbance na 570 nm u otvoru bez ćelija a sa rastvorom ispitivane supstance

Množenjem indeksa preživljavanja (S) sa 100, dobija se procenat preživljavanja. IC_{50} je koncentracija citotoksičnog agensa koja indukuje 50% inhibicije u preživljavanju ciljnih ćelija. Ova vrednost se koristi kao mera intenziteta antiproliferativnog dejstva nekog agensa.

3.6.2. Ispitivanje direktne citotoksičnosti

MTT test je kolorimetrijski test i njegovo osnovno ograničenje je zahtev da rastvor čija se apsorbancija meri bude bistar. Ovaj uslov onemogućava primenu MTT testa za određivanje direktne citotoksičnosti, tj. nakon gajenja ćelija direktno na ispitivanom materijalu. Za ovo određivanje koristi se LDH test citotoksičnosti u kome se preživljavanje, odnosno vijabilnost ćelija procenjuje na osnovu procenta LDH koji se nađe u ekstraćelijskoj sredini. LDH je citoplazmatski enzim koji se nakon lize ćelija oslobađa u ekstraćelijsku sredinu, što je osnov po kom LDH test predstavlja meru integriteta ćelijske membrane. Nakon delovanja ispitivanih agenasa nivo LDH u supernatantu se određuje oksidacijom laktata do piruvata koji zatim reaguju sa tetrazolijumskom soli proizvodeći formazan. U vodenom rastvoru formazan daje plavo obojenje čiji se intenzitet određuje spektrofotometrijski.

Za određivanje direktne citotoksičnosti, na mikroskopske okrugle ljuispice je nanošen tanak sloj ispitivanih materijala, ljuispice su zatim lepljene u ploče sa 24 bazena i ploče nakon toga sterilisane X-zracima. U ovako pripremljene ploče se direktno na mikroskopsku ljuopicu, odnosno ispitivani materijal, nanosio optimalan broj

mezenhimalnih matičnih ćelija zubne pulpe suspendovanih u hranljivom medijumu. Ploče sa ćelijama su dalje inkubirane 24 h, 48 h i 72 h, u inkubatoru na 37°C u sredini obogaćenoj sa 5% CO₂. Ćelije su mikroskopirane i evaluirane u pogledu morfologije i odnosa prema ispitivanom materijalu.

Nakon inkubacije, preživljavanje odnosno broj vijabilnih ćelija, procenjen je tako što su ćelije izlagane prvo hemijskoj, a potom fizičkoj lizi. U svrhu hemijske lize, iz bazena je odličen hranljivi medijum, ćelije su isprane PBS-om tri puta a zatim je u svaki bazen sipano po 225 µl pufera za lizu iz komercijalnog kompleta za LDH esej (Sigma Aldrich, St Louis, MO, SAD). Tako pripremljene ploče su stajale u inkubatoru narednih 45 min. Na taj način je urađena hemijska liza ćelija.

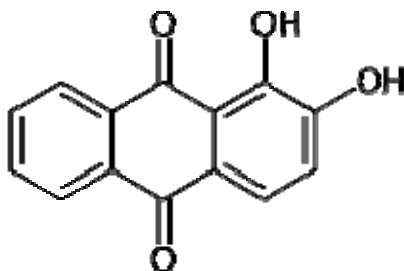
Usledila je fizička liza: ploče su u 3 ciklusa naizmenično zamrzavane na -20°C i odmrzavane na 37°C u trajanju od po 30 min, a zatim centrifugirane (7 min, 1700 obrtaja/min). Nivo LDH je određivan iz dobijenog supernatanta. Broj ćelija se određivao na osnovu nivoa LDH primenom prethodno konstruisane kalibracione krive, koja se formira nezavisno za svaki eksperiment, odnosno svaku korišćenu pasažu ćelija, uporedo sa izvođenjem eksperimenta.

Smeša za LDH test pravljena je neposredno pred eksperiment, mešanjem jednakih zapremina reagenasa iz komercijalnog kompleta: LDH rastvora supstrata, LDH rastvora boje i LDH kofaktora. U ploču sa 96 bazena je sipan supernatant i smeša za LDH test u odnosu 1:2 u triplikatu. Ploča je obavijena aluminijumskom folijom i inkubirana na sobnoj temperaturi 20 min. Za zaustavljanje reakcije, u svaki bazen je dodato 1/10 zapremine 1M HCl-a. Optička gustina dobijenog proizvoda merila se na ELISA čitaču mikroploča na talasnoj dužini od 490 nm.

3.7. Određivanje stepena osteoblastne diferencijacije bojenjem alizarin crvenim

Alizarin (1,2-dihidroksiantrahinon) je organsko jedinjenje sa formulom C₁₄H₈O₄ (Slika 5). To je kristalna crvena boja koja se ranije dobijala iz korena broća i katrana kamenog uglja a koristila se uglavnom za bojenje tkanine. Danas se isključivo dobija sintetičkim putem. Rastvorljiv je u heksanu i hloroformu. U zavisnosti od pH, alizarin menja boju i zbog toga se koristi i kao pH indikator. Jedinjenja alizarina upotrebljavaju

se kao indikator u biološkim istraživanjima jer boje slobodni kalcijum i neka jedinjenja kalcijuma u crvenu ili svetlojubičastu boju.



Slika 5. Hemijska struktura alizarina

Uloga alizarina kao biološke boje je prvi put uočena 1567. god kada je nakon davanja životinjama u vidu hrane obojila njihove zube u crveno. Danas se ova hemikalija najčešće koristi u medicinskim studijama koje uključuju kalcijum. Slobodni (jonski) kalcijum formira precipitate sa alizarinom, a tkiva koja u sebi sadrže kalcijum se boje crveno neposredno nakon uranjanja u alizarin. Iz tog razloga, čist kalcijum i kalcijum u kostima i drugim tkivima se može obojiti i na taj način detektovati. Alizarin crveno se koristi u biohemijskim esejima za kvantitativno kolorimetrijsko utvrđivanje prisustva kalcijumovih depozita u ćelijama osteogenog porekla. Kao takav, on predstavlja rani marker mineralizacije matriksa, ključni korak ka formiranju ekstracelularnog matriksa zrele kosti.

U svrhu utvrđivanja prisustva kalcijumovih depozita u ćelijama, napravljen je radni rastvor alizarin crvenog: 2 g alizarin crvenog (Alizarin red S Certified, Sigma Aldrich, St Louis, MO, SAD) je rastvoreno u 100 ml dejonizovane vode. pH napravljenog rastvora je bio 4.18.

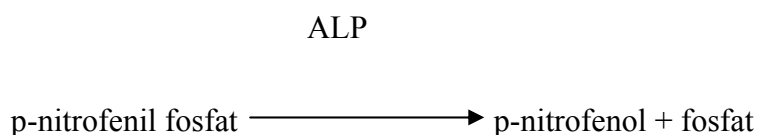
U ploči sa 24 bunara sa 3D biomaterijalima je zasejano 200000 ćelija po bunaru. Ćelije su gajene u 1 ml osteogenog medijuma (Stem PRO Osteogenesis Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD). Osteogeni medijum se koristio da bi se indukovala osteogena diferencijacija ispitivanih ćelija zasejanih na različitim 3D biomaterijalima kako bi se kvantitativnom metodom bojenja Alizarin crvenim utvrdila eventualna razlika u prisutnoj količini kalcijumovih depozita, koji nastaju u procesu diferencijacije. Kontrolnu grupu činile su ćelije gajene na 3D biomaterijalima u osnovnom medijumu za

kulturu ćelija. Medijum je menjan dva puta nedeljno. Dvadeset petog dana od dodavanja osteogenog medijuma, medijumi su odliveni iz bunara, ćelije su isprane dva puta u PBS-u. Zatim je dodato 300 µl 10% formalina po bunaru i inkubirano 30 minuta. Formalin je potom odliven a ćelije na skafoldima su isprane dva puta destilovanom vodom. Nakon aspiriranja destilovane vode, dodato je 500 µl radnog rastvora alizarin crvenog po bunaru i inkubirano 30 minuta na sobnoj temperaturi. Boja je potom odlivena a uzorci su pet puta isprani destilovanom vodom. Kalcijumovi depoziti slikani su invertnim mikroskopom (LEICA DMIL LED, Leica Microsystems, Wetzlar, Nemačka).

3.8. Određivanje stepena osteoblastne diferencijacije merenjem aktivnosti alkalne fosfataze

Alkalna fosfataza (ALP) je enzim koji katalizuje hidrolizu fosfatnih estara u alkalnom puferu i proizvodi organski radikal i neorganski fosfat. Kod sisara, ovaj enzim se javlja najčešće u jetri i kostima. Iz tog razloga se promene u nivou i aktivnosti ALP dovode u vezu sa različitim oboljenjima jetre i kostiju.

Kit za alkalnu fosfatazu je koncipiran tako da direktno meri aktivnost ALP u biološkim uzorcima bez prethodnih priprema. Ovaj metod koristi para-nitrofenil fosfat koji daje proizvod obojen u žuto nakon hidrolize alkalnom fosfatazom (pri apsorbanci od 405 nm). Stopa reakcije je direktno proporcionalna enzimskoj aktivnosti:



U cilju određivanja stepena osteoblastne diferencijacije, merena je aktivnost ALP mezenhimalnih ćelija gajenih u osteogenom medijumu na 3D skafoldima nakon 6 i 12 dana od zasejavanja. Naime, alkalna fosfataza se nalazi u osteoblastima i oslobađa se u medijum tokom sazrevanja ovih ćelija. Aktivnost alkalne fosfataze je neophodna za hidrolizu β-glicerofosfata čime započinje proces mineralizacije. Zasejano je 200000 ćelija po bazenu u ploči sa 24 bazena na različitim 3D skafoldima i gajeno 6 odnosno 12

dana u osteogenom medijumu. Medijum je menjan svaka 3 dana. Poslednjeg dana je odliven medijum i dodato je po 300 μ l 1% igepala, deterdženta za fiksiranje ćelija. Uzorci su zatim inkubirani na 4°C preko noći. Usled dejstva deterdženta, došlo je do rupture membrane i odlepljivanja ćelija, tako da se njihov sadržaj izlio u medijum. Narednog dana je sadržaj iz bunara prebačen u ependorfice radi centrifugiranja 20 minuta na 4°C, 10000 obrtaja/min. U ploču sa 96 bazena je dodato 10 μ l svakog uzorka supernatanta nakon centrifugiranja, 10 μ l pufera iz komercijalnog kita za ALP (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) i 80 μ l medijuma iz istog kita za ALP (supstrat ALP : pufer ALP = 1:4). Ploče su zatim inkubirane 15 min u inkubatoru na 37°C u sredini obogaćenoj sa 5% CO₂. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 100 μ l 1M NaOH po bazenu. Optička gustina dobijenog proizvoda merena je na čitaču mikroploča na talasnoj dužini od 405nm.

Međutim, aktivnost ALP se izražava u odnosu na ukupne ćelijske proteine, kako bi se pokazala rana osteoblastna diferencijacija. Za merenje ukupne koncentracije proteina u dobijenim uzorcima korišćena je Bradfordova metoda sa albuminom iz govedeg seruma (bovine serum albumin, BSA) kao standardom. Bradfordov reagens je napravljen rastvaranjem 100 mg Komazi plave boje G-250 u 50 ml 95% etanola i 100 ml 85% fosforne kiseline i dodavanjem destilovane vode do ukupne zapremine od 1 L. Dobijen reagens je profiltriran pre upotrebe.

Bradfordov test je brz, jednostavan i daje relativno stabilan kolorimetrijski odgovor. Bazira se na upotrebi Komazi plave boje (Coomassie Brilliant Blue G-250) za koju se vezuju proteini, menjajući svojstva svetlosne apsorbanca boje. Boja pripremljena u 85% rastvoru fosforne kiseline maksimalno apsorbuje svetlost pri talasnoj dužini od 465 nm. Dodavanje proteina rezultuje promenom apsorpcionog maksimuma boje na talasnoj dužini od 595 nm. Porastom koncentracije proteina, linearno raste i apsorbanca svetlosti pri talasnoj dužini od 595 nm. Iako je apsorbanca Komazi plave boje pri pomenutoj talasnoj dužini proporcionalna količini vezanih proteina, mora se uzeti u obzir da na rezultate testa mogu uticati i supstance neproteinskog porekla (naročito deterdženti), kao i da kolorimetrijski odgovor može da varira u zavisnosti od koncentracije i sastava proteina. Iz pomenutih razloga bilo je potrebno uraditi standarnu krivu koncentracije proteina. Za određivanje standardne

krive korišćena je serija rastvora proteina poznate koncentracije: 0, 5, 10, 15, 20, 25 i 30 $\mu\text{l/ml}$ BSA.

Za izradu standardne krive i pri određivanju koncentracije proteina u ispitivanim uzorcima, korišćeno je 10 μl standarda, odnosno uzorka, rastvorenog u 990 μl Bradfordovog reagensa. U bazene u ploči sa 96 bazena sipano je po 100 μl tako dobijenih smeša. Sva merenja rađena su u triplicatu. Optička gustina dobijenog proizvoda merila se na čitaču mikroploča na talasnoj dužini od 570 nm. Na osnovu apsorbance rastvora poznatih koncentracija proteina, napravljena je standardna kriva, iz koje je očitavana koncentracija proteina u uzorku, prema apsorbanci istog uzorka.

Aktivnost alkalne fosfataze je konačno dobijena odnosom pomoću sledeće formule:

$$\text{ALP} = \text{PNF} / \text{prot} \times 15$$

gde je ALP – aktivnost alkalne fosfataze u minutu

PNF – koncentracija proizvoda enzimske aktivnosti p-nitrofenola (nmol/ml),

Prot – koncentracija ukupnih proteina dobijena merenjem Bradfordovom metodom (mg/ml)

15 – ukupno vreme trajanja reakcije (15min).

3.9. Skening elektronska mikroskopija (SEM analiza)

Mikrostruktura i interakcija biomaterijal – ćelije su ispitivane skening elektronskim mikroskopom (SEM, JSM 5300, Jeol, Japan). SEM mikrografijom analizirane su čestice pHAP praha, struktura ispitivanih ćelijskih nosača kao i morfologija mezenhimalnih ćelija zubne pulpe i ćelijska adhezija za materijal. Međusobni odnos između materijala i ćelija posmatran je nakon gajenja ćelija u osteogenom medijumu 7, 14 i 21 dan kako bi se uočile razlike u morfologiji ćelija i prisustvu ekstracelularnog matriksa (ECM) sintetisanog od strane osteoblasta, pokazatelja stepena osteogene diferencijacije.

Za pripremu za SEM, ćelije su zasejane na različitim 3D skafoldima u ploči sa 24 bazena na uobičajen način i gajene 4 dana u potpunom medijumu za gajenje ćelija. Potom je odliven medijum, uzorci su isprani 3 puta u PBS-u a zatim fiksirani u 2.5% glutar-aldehidu rastvorenom u PBS-u i inkubirani preko noći na 4°C. Zatim je odliven glutar-aldehid a uzorci su isprani 3 puta u PBS-u. Usledilo je postfiksiranje uzorka dodavanjem 1 kapi 1% osmijum tetroksida (Sigma Aldrich, St Louis, MO, SAD) po bazenu, inkubacija u trajanju od 1 h i ponovno ispiranje 3 puta u PBS-u. Uzorci su nakon toga dehidrirani po 15 minuta u rastućim koncentracijama etanola: 30%, 50%, 70%, 90% i 100%. Za sušenje uzoraka korišćen je heksametildisilazan u razblaženjima 1:2, 1:1, 2:1 i čist heksametildisilazan u trajanju od po 15 minuta za svako razblaženje. Pre mikroskopiranja uzorci su spaterovani – vakumirani i presvučeni zlatom u jonskom nparivaču, kako bi bili vidljivi na elektronskom mikroskopu.

3.10. Statistička analiza

Za obradu dobijenih rezultata korišćen je statistički paket SPSS for Windows (Release 13.0 Chicago, IL, SAD). Pre testiranja numeričkih varijabli ispitivan je tip distribucije Shapiro-Wilk-ovim testom. Sve numeričke varijable pokazale su normalnu distribuciju, pa su za poređenje rezultata između grupa korišćene jednofaktorska i dvofaktorska ANOVA. U slučajevima kada je ANOVA pokazala statističku značajnost, razlike među grupama su praćene Tukey *post hoc* testom. Za najniži stepen značajnosti prihvatane su vrednosti verovatnoće $p < 0.05$.

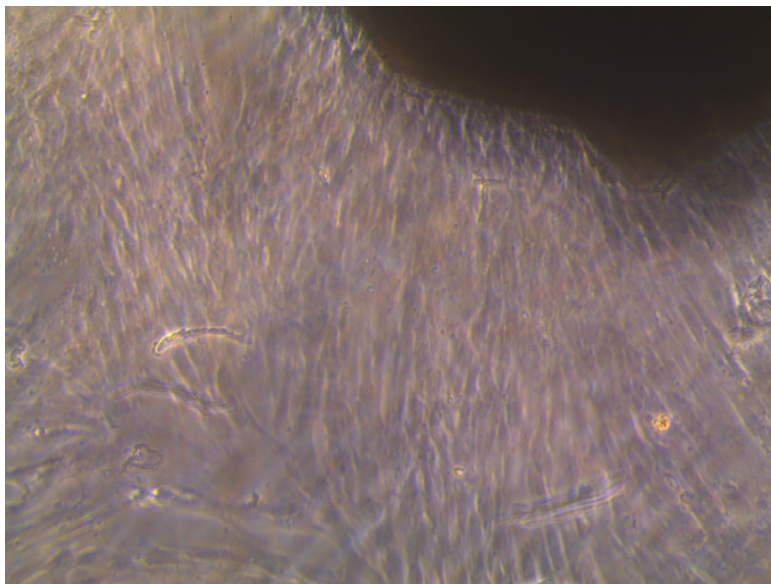
4. REZULTATI

Polazeći od definisanih ciljeva, eksperimentalni rad u okviru ove doktorske teze je bio podjeljen na tri dela. U prvom delu izolovane su i okarakterisane mezenhimalne ćelije zubne pulpe poreklom iz mlečnih zuba u fiziološkoj smeni. U drugom delu analizirana je sinteza čestica hidroksiapatita, keramičkih hidroksiapatitnih ćelijskih nosača i na kraju - nosača sa infiltriranim tankim polimernim filmovima koji su se koristili kao 3D biomaterijali u ovoj doktorskoj tezi. U trećem delu praćena je osteogena diferencijacija izolovanih mezenhimalnih ćelija u prisustvu različitih 3D biomaterijala.

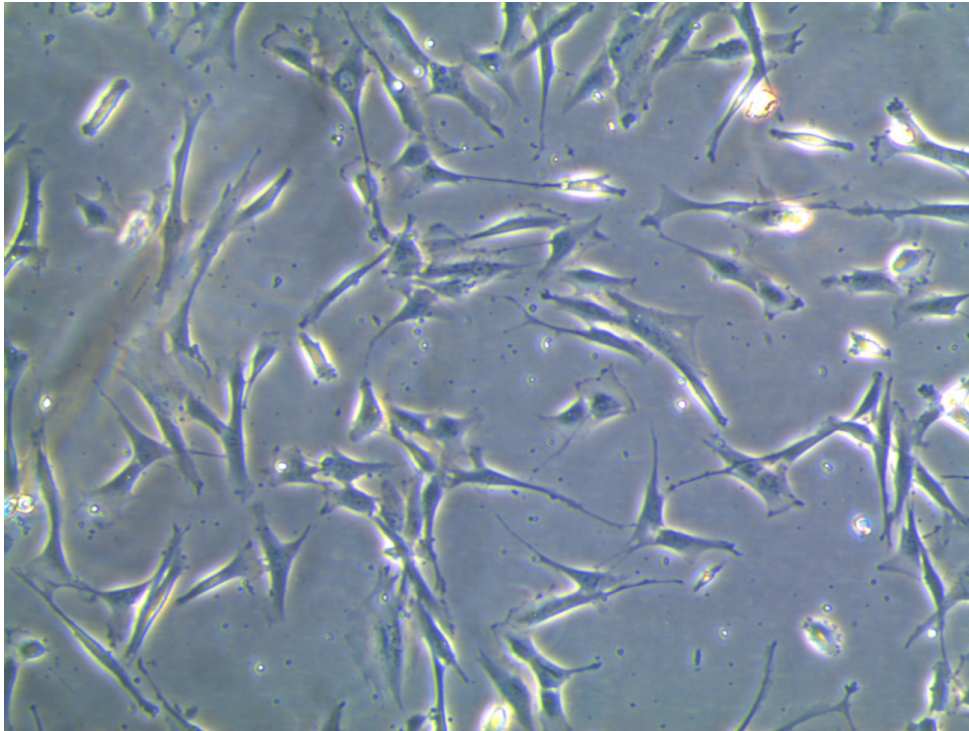
4.1. Izolacija i karakterizacija mezenhimalnih ćelija zubne pulpe

4.1.1. Izolacija – “Outgrowth” metod

Za potrebe eksperimenta, mezenhimalne ćelije zubne pulpe izolovane su tzv. metodom “outgrowth”, koja je opisana u poglavlju Materijal i metode. Prve mezenhimalne ćelije uočene su nakon 3 dana, dok je do prve tripsinizacije bio potreban period od dve nedelje inkubacije na 37°C, u prisustvu 5% CO₂. Izolovane mezenhimalne ćelije zubne pulpe prikazane su na Slikama 6 i 7.



Slika 6. Mezenhimalne ćelije zubne pulpe izolovane metodom “outgrowth”, 10 dana nakon uranjanja tkivnog eksplanta zubne pulpe u hranljivi medijum

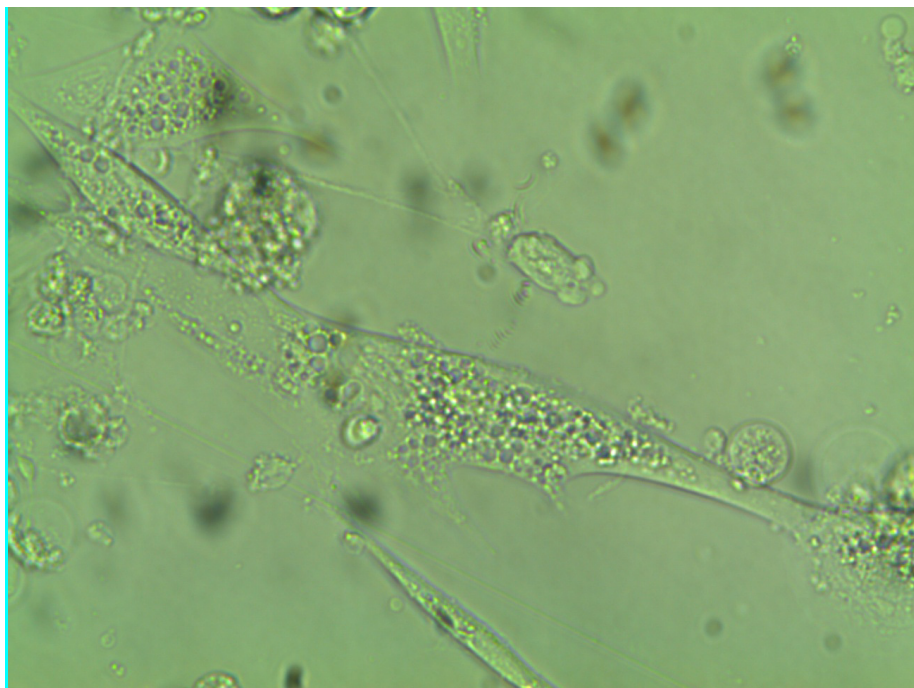


Slika 7. Mezenhimalne ćelije zubne pulpe, pasaža 4.

4.1.2. Multipotentnost mezenhimalnih ćelija zubne pulpe

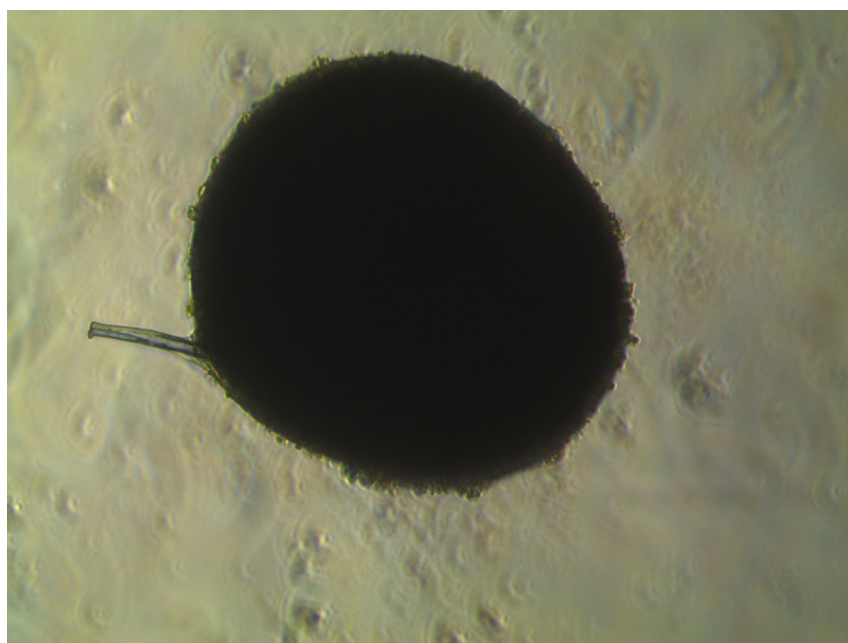
Adultne mezenhimalne matične ćelije su nediferencirane ćelije koje imaju sposobnost samoobnavljanja i diferencijacije u više različitih vrsta ćelija. Za iniciranje diferencijacije *in vitro* potrebno je prisustvo odgovarajućeg medijuma. U zavisnosti od vrste medijuma, matične ćelije zubne pulpe su diferencirane u adipocite, hondroците i osteoblaste.

Na Slici 8 prikazana je diferencijacija izolovanih ćelija u adipocite. U prisustvu adipogenog medijuma nakon 3 nedelje vidljive su ćelije koje sadrže masne kapi koje se uočavaju kao citoplazmatske vakuole karakteristične za ćelije masnog tkiva – adipocite.



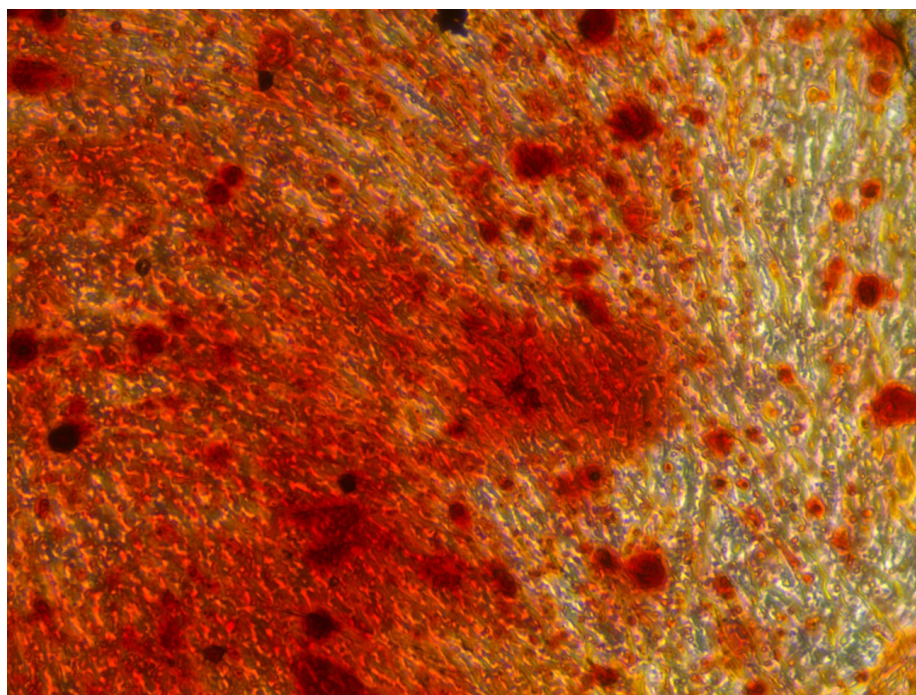
Slika 8. Diferencijacija mezenhimalnih ćelija zubne pulpe u adipocite

Diferencijacija izolovanih mezenhimalnih ćelija zubne pulpe u hondrocite pokazana je prisustvom hondrogenih loptica karakterističnih za ćelije hrskavičavog tkiva – hondrocite. Hondrogene loptice su vidljive nakon 3 nedelje gajenja ćelija u prisustvu hondrogenog medijuma (Slika 9).



Slika 9. Diferencijacija mezenhimalnih ćelija zubne pulpe u hondrocite

Diferencijacija izolovanih mezenhimalnih ćelija zubne pulpe u osteoblaste dokazana je prisustvom mineralizovanog matriksa koji je karakterističan produkt ćelija koštanog tkiva – osteoblasta. Mineralizovani matriks je vidljiv nakon 3 nedelje gajenja ćelija u prisustvu osteogenog medijuma, bojenjem alizarin crvenim (Slika 10).

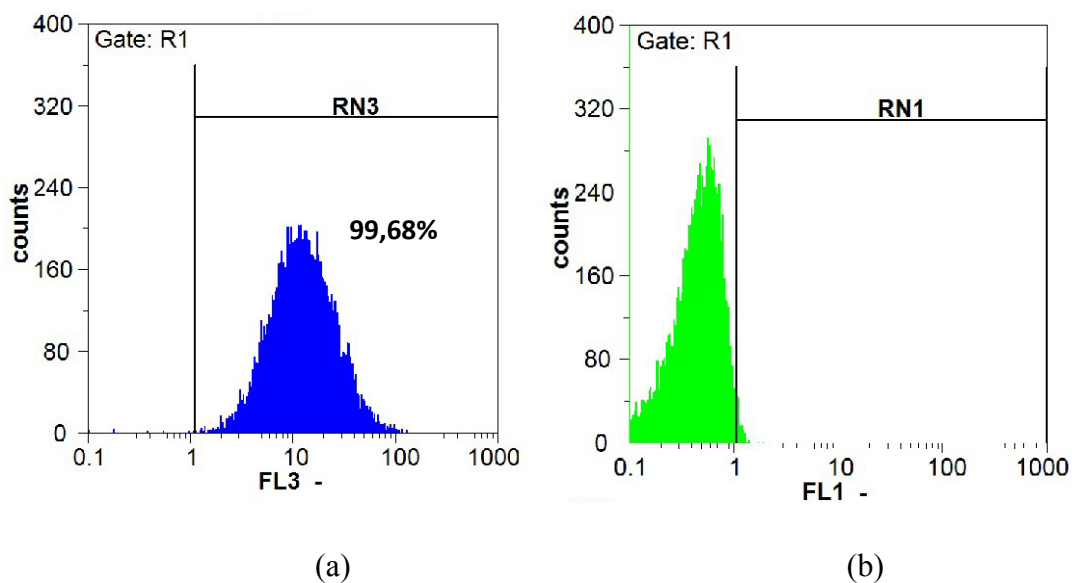


Slika 10. Diferencijacija mezenhimalnih ćelija zubne pulpe u osteoblaste

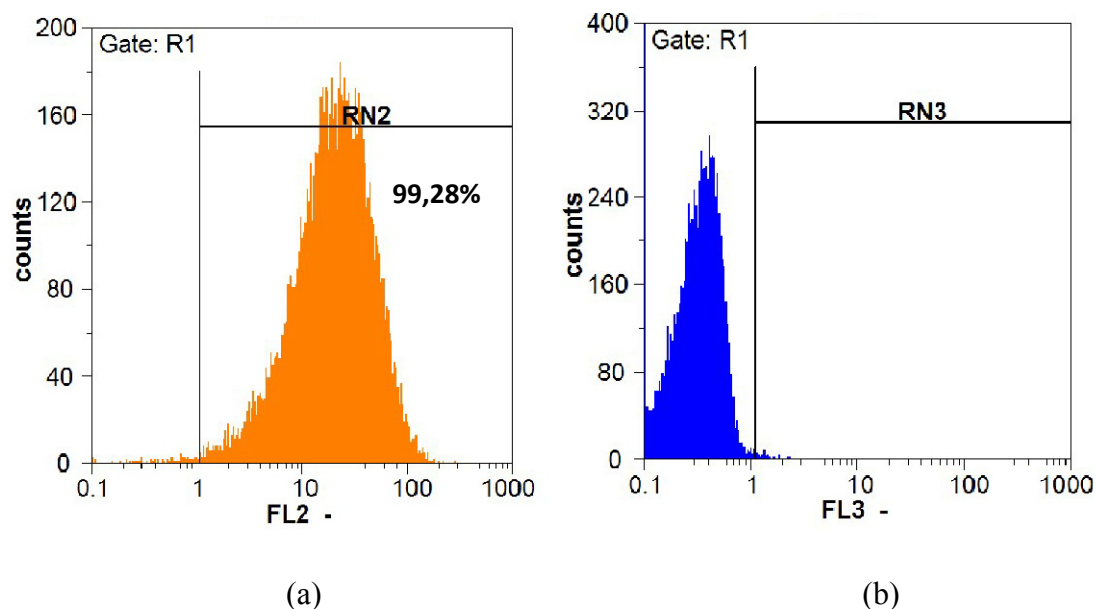
4.1.3. Karakterizacija mezenhimalnih ćelija zubne pulpe metodom protočne citometrije

Analiza ćelija protočnom citometrijom pokazuje pozitivnu ekspresiju sledećih markera: PE-Cy5 Mouse Anti-Human CD29, PE Conjugated Mouse Anti-Human CD73, PE Mouse Anti-human CD90 (Thy-1). Navedeni markeri su pokazatelji prisustva mezenhimalnih ćelija i metodom imunocitohemije pokazuju ekspresiju u više od 99% ispitivanih ćelija što je prikazano na hromatogramima na Slikama 11, 12 i 13. Na taj način je pokazano da sve ispitivane ćelije (tj. preko 99%) pripadaju grupi mezenhimalnih ćelija. Negativan površinski ćelijski marker PE Mouse Anti-Human CD34, koji je ujedno i pokazatelj prisustva primitivnih hematopoetskih progenitora, bio

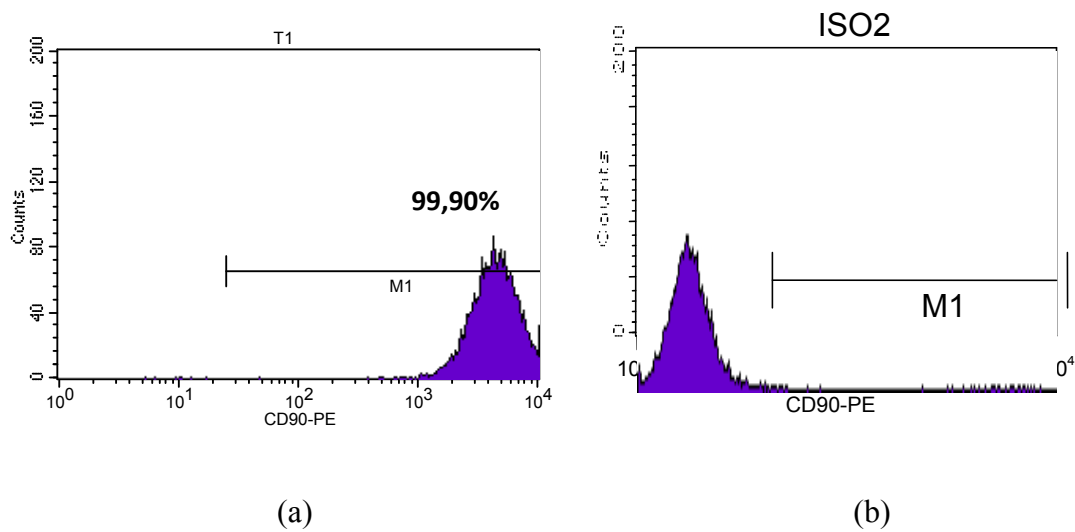
je prisutan u manje od 1% ispitivanih ćelija čime je potvrđeno odsustvo drugih tipova ćelija u izolovanoj kulturi (Slika 14). Kao izotipska kontrola, za određivanje nespecifičnog vezivanja, kod svih markera korišćen je mišji imunoglobulin-1 (IgG1).



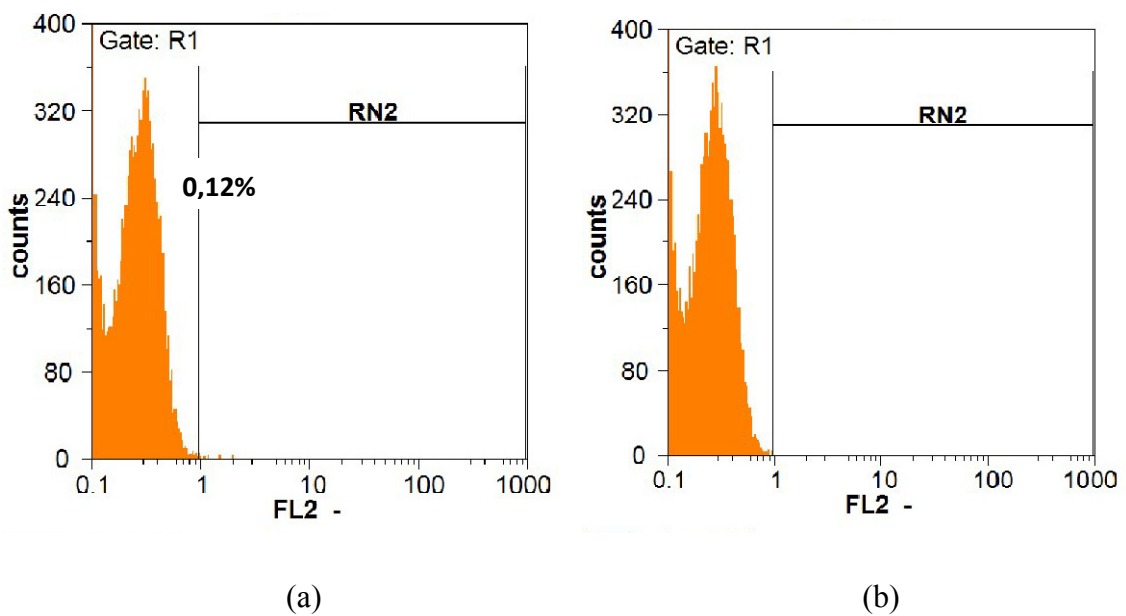
Slika 11. Analiza površinskog ćelijskog markera CD29 - hromatogram: (a) PE-Cy5 Mouse Anti-Human CD29, (b) izotipska kontrola - mišji imunoglobulin-1 (IgG1)



Slika 12. Analiza površinskog ćelijskog markera CD73 – hromatogram: (a) PE Conjugated Mouse Anti-Human CD73, (b) izotipska kontrola - mišji imunoglobulin-1 (IgG1)



Slika 13. Analiza površinskog ćelijskog markera CD90 – hromatogram: (a) PE Mouse Anti-human CD90 (Thy-1), (b) izotipska kontrola - mišji imunoglobulin-1 (IgG1)



Slika 14. Analiza površinskog ćelijskog markera CD34 – hromatogram: (a) PE Mouse Anti-Human CD34, (b) izotipska kontrola - mišji imunoglobulin-1 (IgG1)

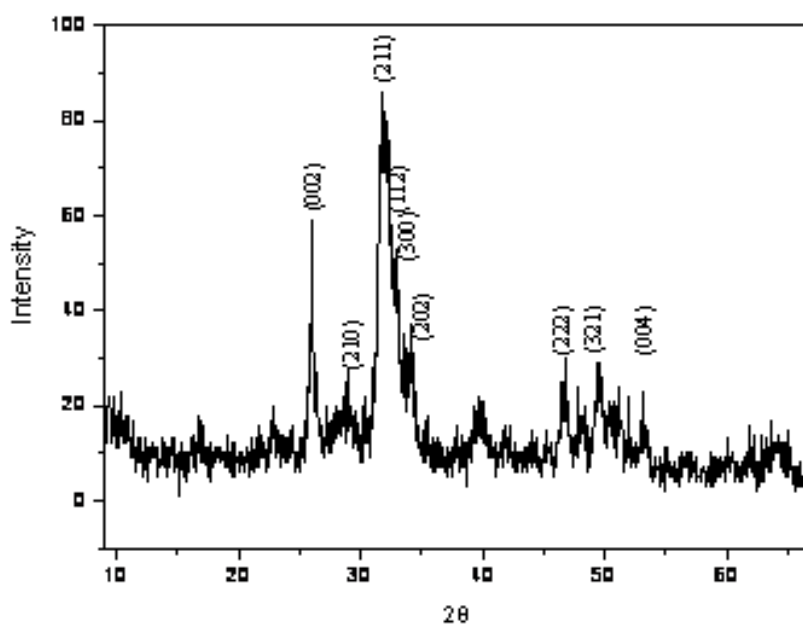
4.2. Sinteza 3d biomaterijala – sinteza čestica hidroksiapatita, keramičkih hidroksiapatitnih ćelijskih nosača i nosača sa infiltriranim tankim polimernim filmovima

Apatit koji je korišćen kao osnova za sintezu svih ispitivanih biomaterijala – skafolda u okviru istraživanja ove doktorske teze je magnezijum supstituisani karbonatni kalcijum hidroksiapatit tipa B, kod koga su PO_4^{3-} joni u rešetci apatita zamenjeni sa CO_3^{2-} jonima.

4.2.1. Karakterizacija hidroksiapatitnog praha

4.2.1.1. Metoda rentgenske difrakcije - XRD analiza

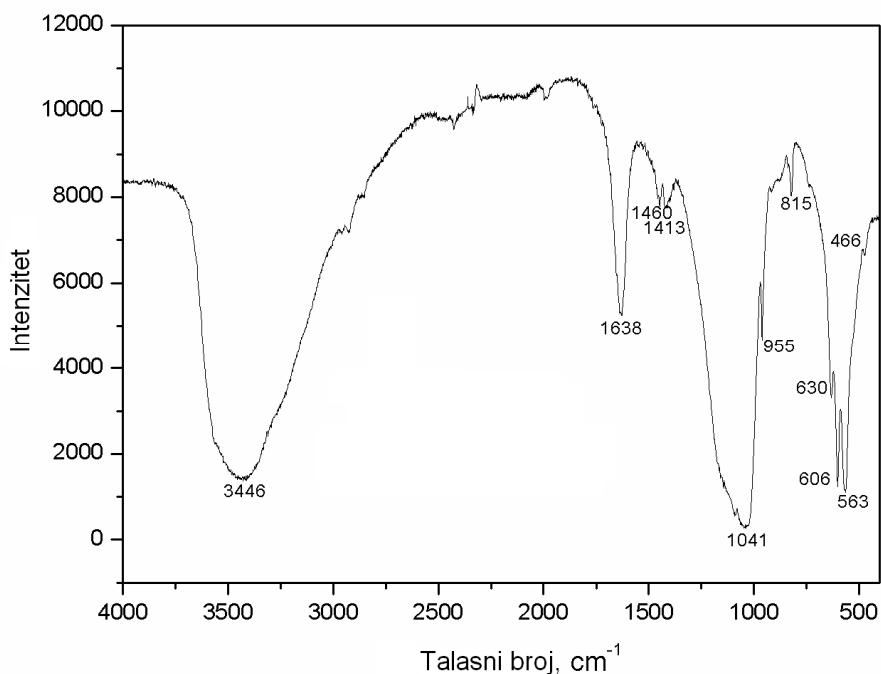
Struktura ovog tipa hidroksiapatita, najbolje se može ispitati metodom rentgenske difrakcije, odnosno XRD analizom. Rezultati XRD analize su pokazali (Slika 15) da je hidrotermalno sintetisani prah po svome sastavu kalcijum hidroksiapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (JCPDS 9-432). O tome svedoči prisustvo svih karakterističnih kristalografskih ravni HAP: (2 1 1) za $2\theta = 31.9$; (112) za $2\theta = 32.26$, (3 0 0) za $2\theta = 33.12$, (0 0 2) za $2\theta = 25.86$, (2 2 2) za $2\theta = 46.86$ i (2 1 3) za $2\theta = 49.58$.



Slika 15. XRD spektar hidrotermalno sintetisanog praha hidroksiapatita

4.2.1.2. Infracrveni spektar hidrotermalno dobijenog hidroksiapatita

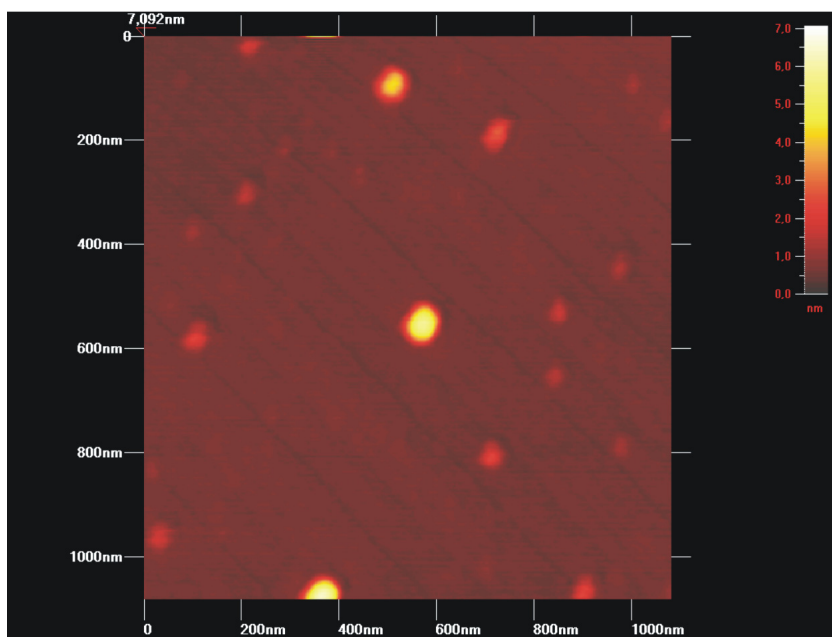
Infracrvena spektroskopija FTIR (*engl.* Furrier Transform Infrared Spectroscopy) je još jedna metoda izuzetno pogodna za ispitivanje strukture hidrotermalno dobijenog pHAP. Kao što se može uočiti na Slici 16, IC spektar sintetisanog praha pokazuje trake karakteristične za pHAP. Trake na oko 1092 i 1042 cm^{-1} odgovaraju asimetričnim istežućim (ν_3), dok trake na oko 603 i 569 cm^{-1} odgovaraju savijajućim (ν_4) vibracijama PO_4^{3-} grupa. Trake na 957 i 473 cm^{-1} potiču od simetričnih istežućih vibracija (ν_1 and ν_2) PO_4^{3-} grupa. Oslobođajuće i istežuće vibracije OH^- grupa detektovane su na oko 630 i 1626 cm^{-1} , redom. Istežuće vibracije CO_3^{2-} grupe na 1442, 1406 i 875 cm^{-1} su takođe prisutne, što ukazuje na inkorporaciju karbonatnih grupa u strukturu apatita. Traka na 630 cm^{-1} se pripisuje oslobođajućim vibracijama OH^- grupa. Evidentno je da je dobijen karbonatni apatit B tipa i da zamena na položajima OH^- jona, uočena na osnovu promene oblika i položaja trake na 3658 cm^{-1} , nije dominantno prouzrokovana zamenom OH^- jona CO_3^{2-} jonima.



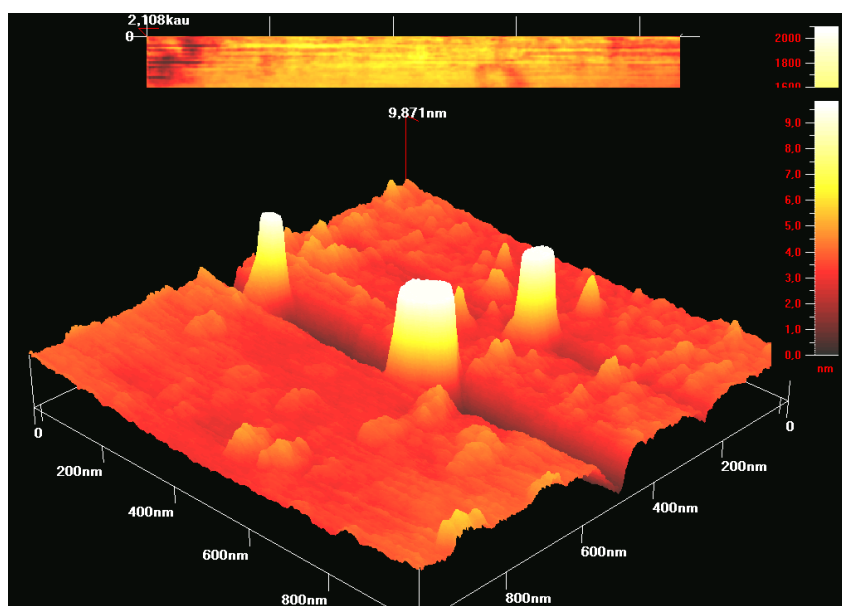
Slika 16. Infracrveni spektar hidrotermalno dobijenog hidroksiapatita

4.2.1.3. Analiza pomoću mikroskopije atomskih sila (AFM analiza)

Ispitivanje morfologije površine jezgro-omotač strukture hidroksiapatitnih čestica AFM analizom uz korišćenje softvera za izračunavanje raspodele čestica, pokazuje da su čestice pretežno veličine oko 60 nm (Slika 17) i imaju sferoidan ili poligonalan oblik (Slika 18), pri čemu neke od čestica dosežu vrednost i do 500 nm.



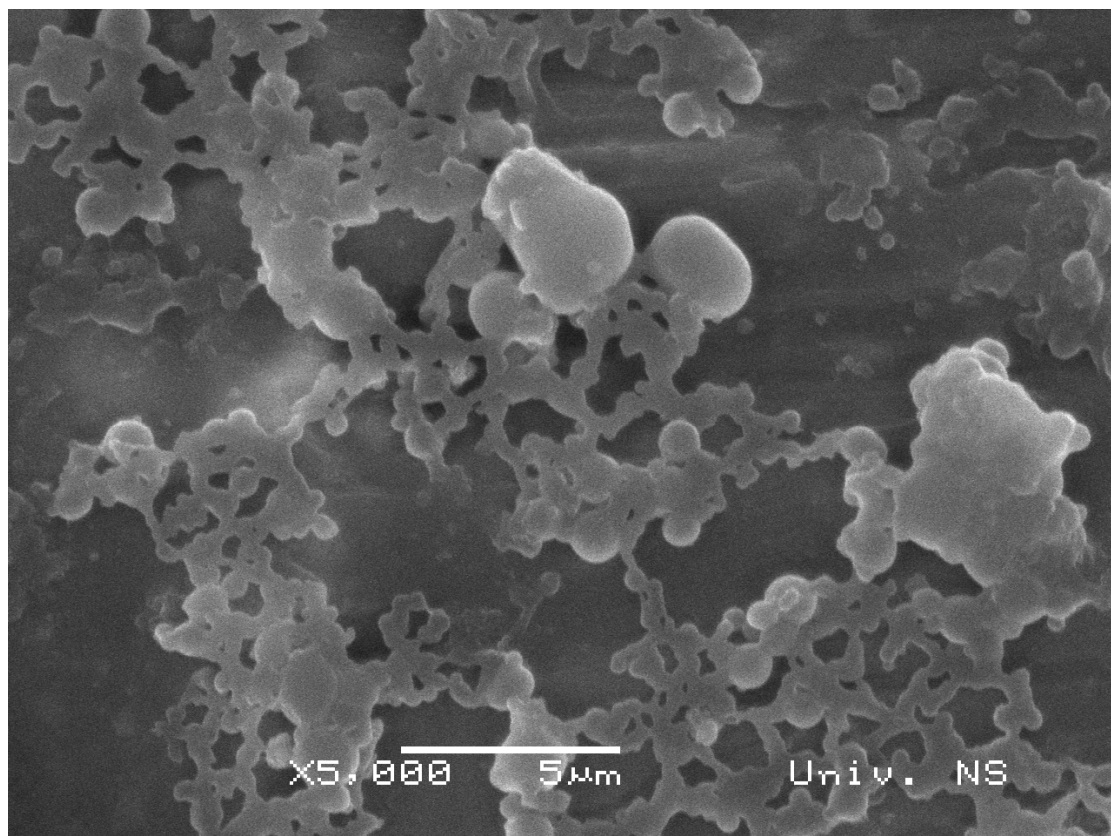
Slika 17. AFM: tipičan izgled hidrotermalno dobijenih čestica hidroksiapatita



Slika 18. AFM: snimak čestica hidroksiapatita

4.2.1.4. Analiza skening elektronskom mikroskopijom (SEM analiza)

Posmatrajući SEM mikrofotografije (Slika 19) očigledno je da se pHAP prah sastoji od aglomerata, koji se sastoje od malih sfernih čestica reda veličine do 200 nm. Ovi aglomerati imaju nepravilne forme i međusobno su vrlo slični po obliku i veličini (1 - 5 μ m).



Slika 19. SEM: Tipična morfologija aglomerata pHAP praha

4.2.1.5. Analiza specifične površine čestice praha hidroksiapatita (BET analiza)

BET analiza pokazuje podatke u vezi sa specifičnom površinom čestica praha, ukupnu poroznost unutar čestica praha i srednji prečnik pora koje se nalaze u tim česticama (Tabela 2).

Tabela 2. Parameteri specifične površine praha hidroksiapatita i njegove poroznosti određeni BET metodom

Uzorak	S_{BET} , m^2/g	Ukupna zapremina pora, cm^3/g	Srednji prečnik pora, nm	Udeo mezopora, %	Udeo makropora, %
pHAP prah	12	1.00	310	10	90

Srednji prečnik pora određen iz specifične površine koristeći BET metodu iznosio je 160 nm.

4.2.2. Karakterizacija keramičkog hidroksiapatitnog skafolda i keramičkog hidroksiapatitnog skafolda sa infiltriranim tankim polimernim filmovima

Nakon početne faze, sinteze praha hidroksiapatita, čestice hidroksiapatitnog praha tretirane su mehanohemijski nakon čega su dobijene čestice nanometarskog reda veličine (< 20 nm). Na taj način sintetisan je keramički hidroksiapatitni ćelijski nosač veoma porozne strukture – pHAP. Za dobijanje kompozitnih keramičkih nosača, na površinu dobijenog keramičkog poroznog hidroksiapatitnog nosača deponovani su tanki polimerni filmovi. Polimeri koji su korišćeni u procesima deponovanja bili su: PLGA (polilaktid-koglikolna kiselina), alginat i polimer etilen vinil acetat/versatata (EVA/EVV). Na taj način dobijena su 3 različita kompozitna skafolda, označena kao pHAP+PLGA, pHAP+alginat i pHAP+EVA/EVV, koji su, pored samog pHAP-a, korišćeni u ovom doktoratu za ispitivanje diferencijalnog kapaciteta mezenhimalnih ćelija zubne pulpe.

4.2.2.1. Makroskopska razmatranja keramičkog hidroksiapatitnog skafolda

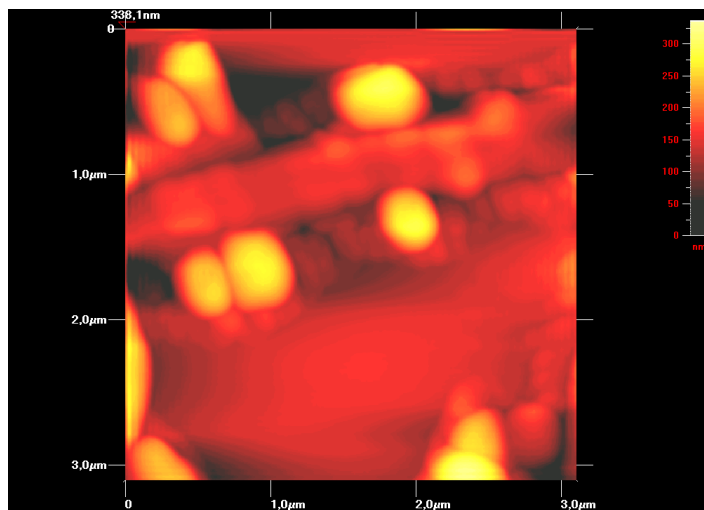
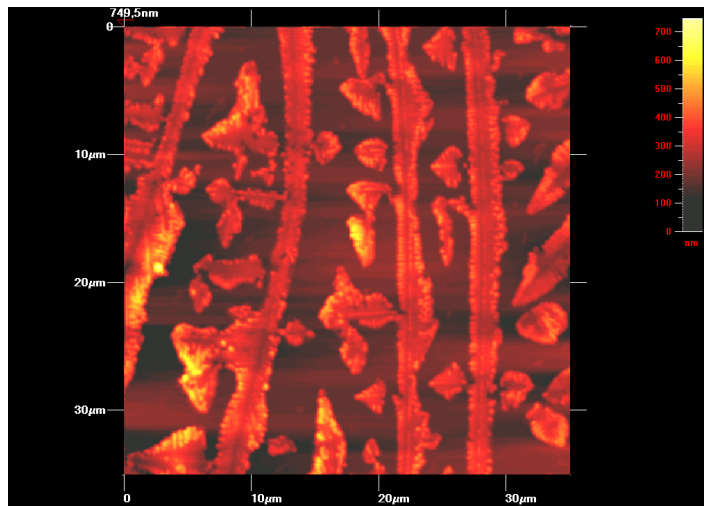
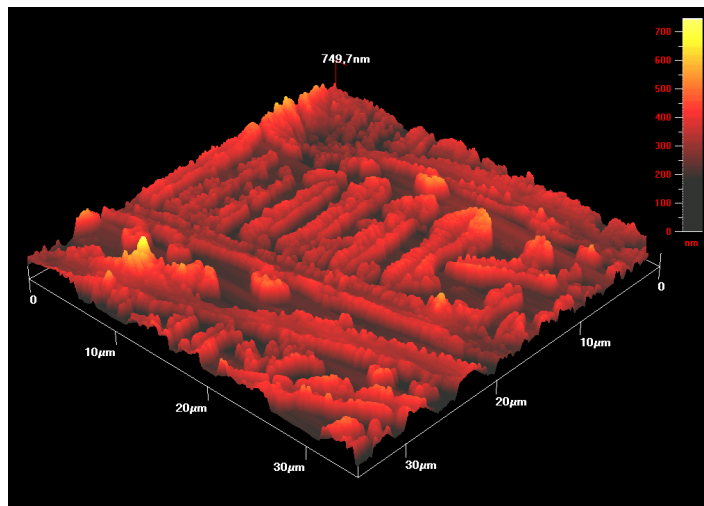
Kao što se vidi na Slici 20, pHAP skafold je izuzetno porozna 3D struktura. Pore su cilindrične, međusobno povezane i nalaze se u opsegu od 0.1 do 1 mm. Većina pora ima širinu (prečnik) od 0.2 do 0.3 mm.



Slika 20. Hidroksiapatitni skafold

4.2.2.2. AFM analiza keramičkog hidroksiapatitnog skafolda

3D struktura, tzv. češljolika struktura očigledna je sa Slike 21. Ona je izuzetno važna za adheziju ćelija i njihovo naseljavanje. Kanali date strukture imaju dužinu oko 30 μm i širinu oko 3 μm , dok su debljine njihovih zidova između 3 i 5 μm . Njihove različite geometrijske orijentacije uslovljene su oblikom čestica i polimernog modela (modela poliuretanske pene).



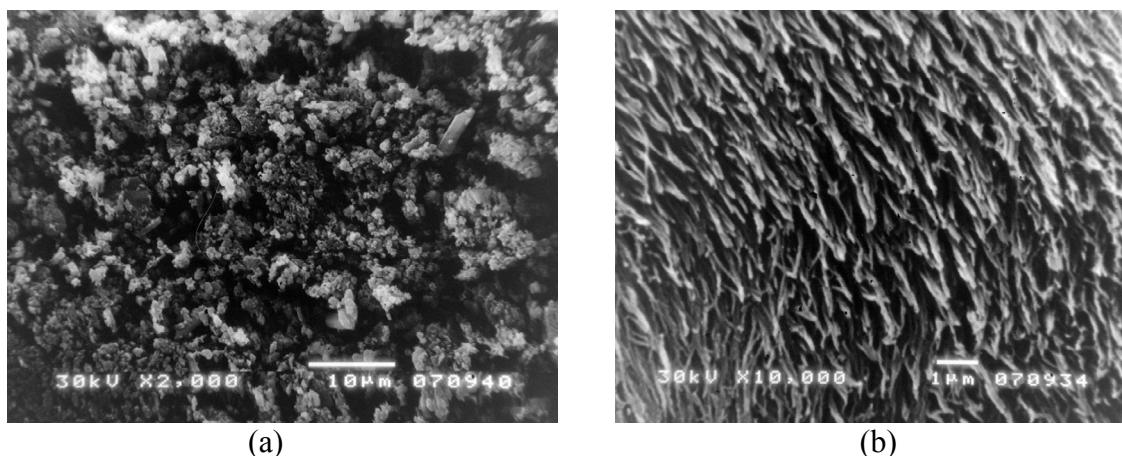
Slika 21. AFM: Tipičan izgled strukture pHAP skafolda dobijenog metodom kalupljenja polimerne pene

4.2.2.3. SEM analiza finalnih skafolda

4.2.2.3.1. SEM analiza poroznog hidroksiapatitnog skafolda

Hidroksiapatitni nosač sintetisan iz hidroksiapatitnog praha dobijenog po hidrotermalnom postupku ima dobro definisanu unutrašnju geometriju sa porama reda veličine od 200 nm do 1 μm .

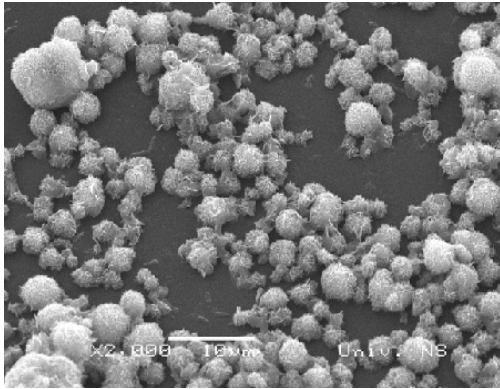
Nakon procesa izgaranja poliuretanske mreže i sinterovanja keramičke faze na 800°C, odnosno 1300°C dobijena je struktura skafolda prikazana na Slici 22. Uočava se jasno izražena igličasta struktura unutrašnjih zidova pHAP skafolda, pri čemu je dužina iglica najčešće oko 1 μm , a prečnik oko 50 nm.



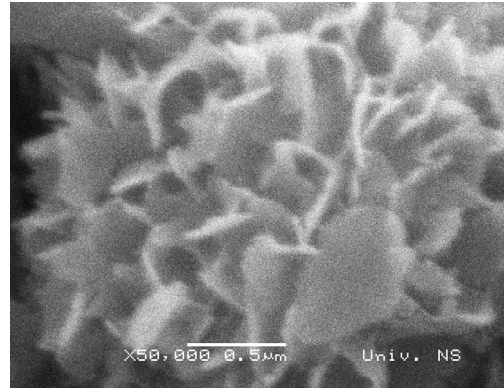
Slika 22. SEM: Keramički hidroksiapatitni ćelijski nosač pHAP: a) uvećanje 2000x i b) uvećanje 10000x.

4.2.2.3.2. SEM analiza poroznog hidroksiapatitnog skafolda sa infiltriranim tankim polilaktidkoglikolidnim filmom

Struktura keramičkog hidroksiapatitnog ćelijskog nosača sa infiltriranim tankim polimernim PLGA filmom (pHAP+PLGA) prikazana je na Slici 23. Posmatrane loptaste čestice pokazuju izuzetno razvijenu morfologiju sa strukturama nalik laticama na datoj površini. Veličina čestica se uglavnom kreće od 2.5 do 3.5 μm , međutim, prisutan je i mali broj manjih (0.7 – 1.5 μm) i većih čestica (4.3 - 8.5 μm). Širina laticastih struktura na datoj površini je 15-20 nm. Udaljenost između čestica je u rasponu od 900 nm do 1.8 μm .



(a)

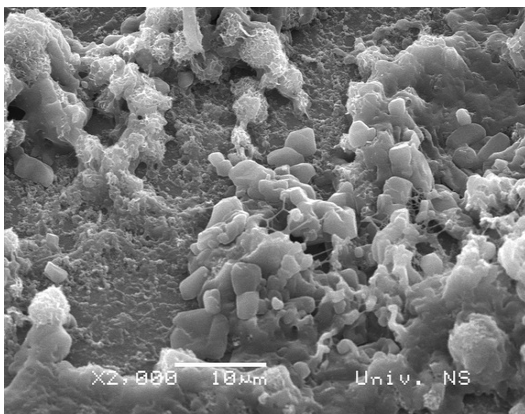


(b)

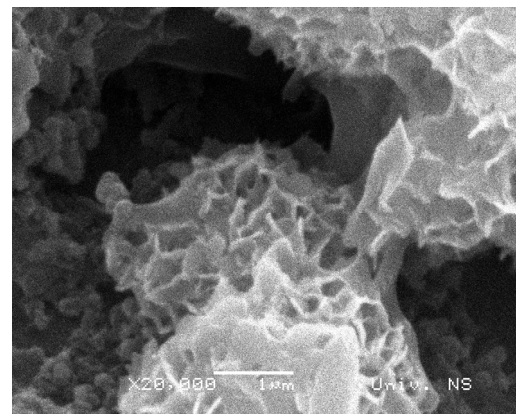
Slika 23. SEM: Keramički hidroksiapatitni ćelijski nosač sa infiltriranim tankim polimernim PLGA filmom (pHAP+PLGA): a) uvećanje 2000x i b) uvećanje 50000x

4.2.2.3.3 SEM analiza poroznog hidroksiapatitnog skafolda sa infiltriranim tankim alginatnim filmom

Hidroksiapatit sastavljen na alginatnom tankom filmu (pHAP+alginat) ima različitu morfologiju čestica – loptast i poligonalni oblik što se može videti na Slici 24. Čestice poligonalnog oblika su manje. Prečnik najmanje čestice je oko 1 μm , dok je prečnik najvećih oko 5 μm . Veličina loptasto oblikovanih čestica je od 3 do 5 μm . Širina igličastih formi na površini loptastih čestica je 18-25 nm, dok je udaljenost između njih u opsegu od 150-500 μm .



(a)

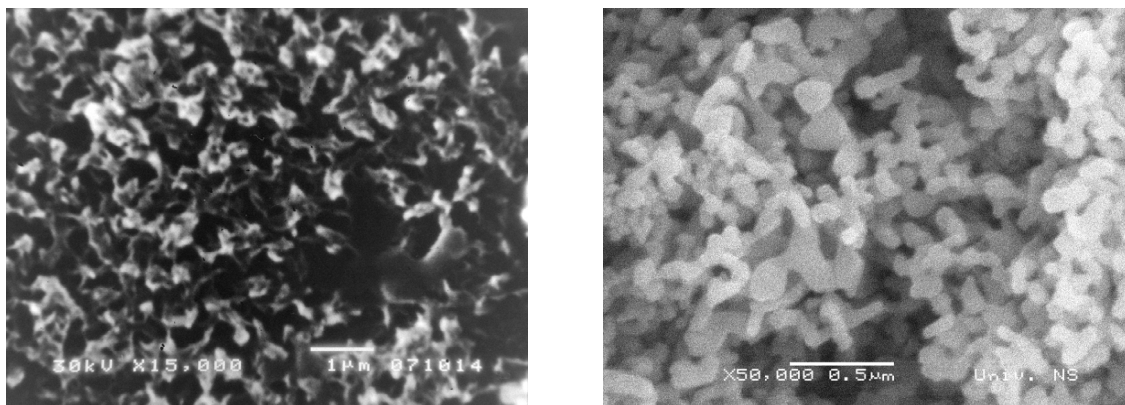


(b)

Slika 24. SEM: Keramički hidroksiapatitni ćelijski nosač sa infiltriranim tankim alginatnim filmom (pHAP+alginat): a) uvećanje 2000x i b) uvećanje 20000x

4.2.2.3.4. SEM analiza poroznog hidroksiapatitnog skafolda sa infiltriranim tankim polimernim etilen vinil acetat/etilen vinil versatnim filmom

SEM analiza hidroksiapatita sastavljenog na tankom filmu polimera etilen vinil acetat/versatata (pHAP+PEVA/PEVV) pokazuje da čestice imaju sferoidan ili poligonalan oblik, da im je veličina pretežno oko 60 nm i da neke od čestica dosežu veličinu i do 500 nm (Slika 25).



(a)

(b)

Slika 25. SEM: Keramički hidroksiapatitni ćelijski nosač sa infiltriranim tankim EVA/EVV filmom: a) uvećanje 15000x i b) uvećanje 50000x

4.3. Citotoksičnost analiziranih materijala i procena ćelijske adhezije i proliferacije

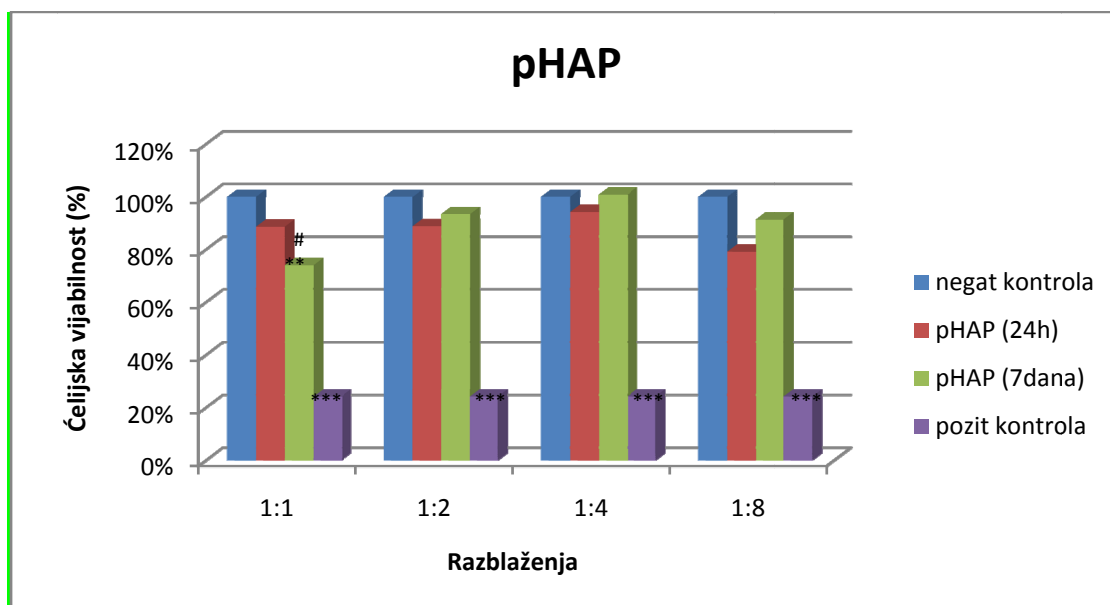
U ovom delu eksperimenta ćelije su inkubirane određenim vremenskim periodom u prisustvu sintetisanih 3D biomaterijala i Bio Oss-a da bi se ispitala njihova citotoksičnost kao i procena ćelijske proliferacije i adhezije za navedene materijale.

4.3.1. Ispitivanje indirektno citotoksičnosti biomaterijala — MTT test

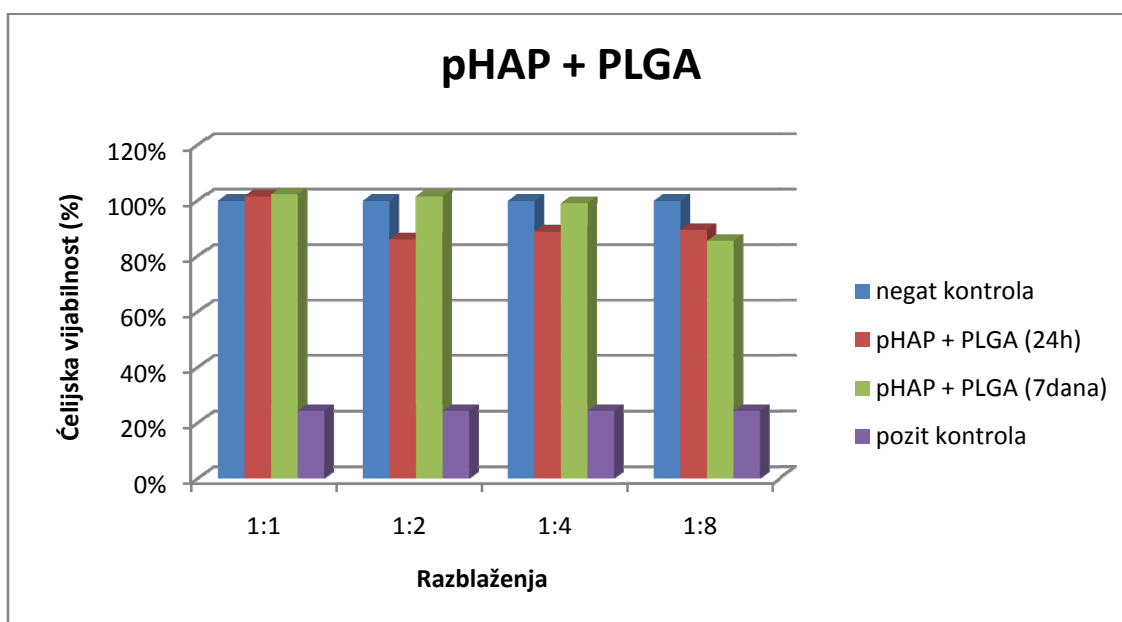
U cilju ispitivanja potencijalnog toksičnog efekta koji bi skafoldi mogli da imaju na ćelije, urađen je MTT test u kome se meri procenat vijabilnih ćelija koje su bile u indirektnom kontaktu sa skafoldom. Naime, ekstrakti skafolda su najpre inkubirani 24 h i 7 dana u hranljivoj podlozi, koja je zatim u određenoj razmeri dodata u hranljivu

podlogu u kojoj su gajene ćelije. Rezultati MTT testa su izraženi kao procenat vijabilnih ćelija u odnosu na kontrolu – mezenhimalne ćelije zubne pulpe bez ispitivanog materijala, pri čemu je preživljavanje ćelija u kontrolnoj grupi uzeto kao 100% (Grafikoni 1-4). Pozitivnu kontrolu predstavljalo je preživljavanje ćelija u prisustvu toksičnog agensa (4% fenol), koje je bilo nešto manje od 25%, što je statistički visoko značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu. Takođe, radi poređenja eventualne toksičnosti ispitivanih skafolda sa Bio Oss-om, na Grafikonu 5 su prikazani rezultati MTT testa u prisustvu materijala Bio Oss.

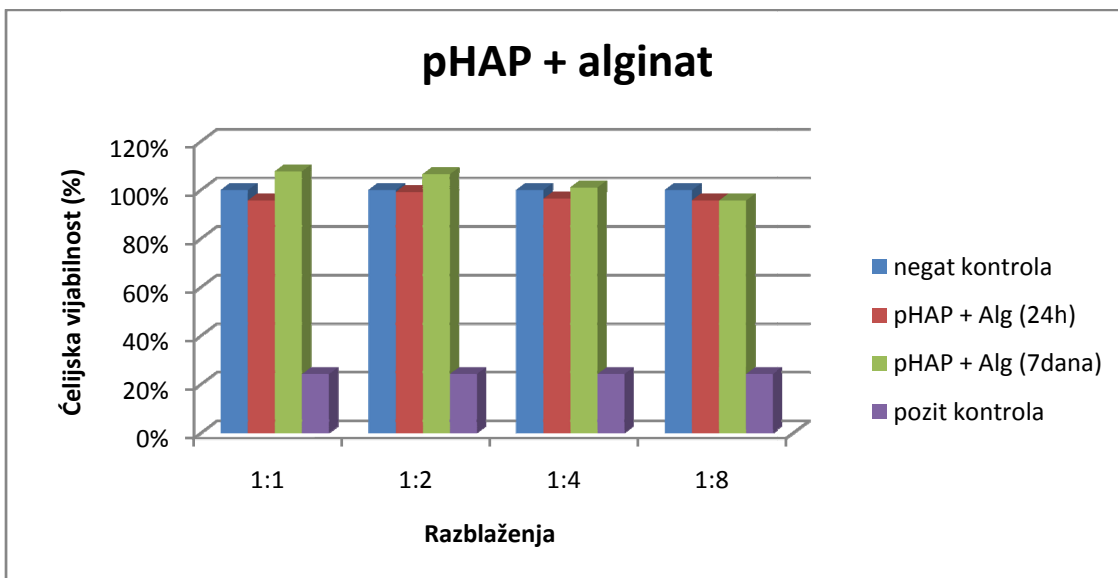
Broj vijabilnih mezenhimalnih ćelija zubne pulpe u prisustvu ekstrakata ispitivanih materijala, tj. kada su ćelije bile izlagane različitim koncentracijama produkata degradacije materijala u vremenskom periodu od 72 h, je bio sličan kao u kontrolnoj grupi. Dakle, nije zabeležena kompletna citotoksičnost ekstrakata nijednog ispitivanog materijala ni u jednoj od ispitivanih koncentracija. Poređenje broja vijabilnih ćelija u odnosu na pozitivnu i negativnu kontrolu rađeno je jednofaktorskom ANOVA-om, i *post hoc* Tukey testom. Statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu zabeležena je jedino u prisustvu ekstrakta pHAP-a inkubiranog u hranljivoj podlozi 7 dana u razblaženju 1:1. Sa druge strane, broj ćelija gajenih u prisustvu fenola (pozitivna kontrola) je statistički značajno niži u poređenju sa ostalim materijalima ($p < 0.001$), dakle ni u jednom slučaju nije zabeležena visoka toksičnost kakva postoji u prisustvu fenola. Rezultati MTT testa svakog materijala ponaosob, prikazani su na Grafikonima 1, 2, 3, 4 i 5.



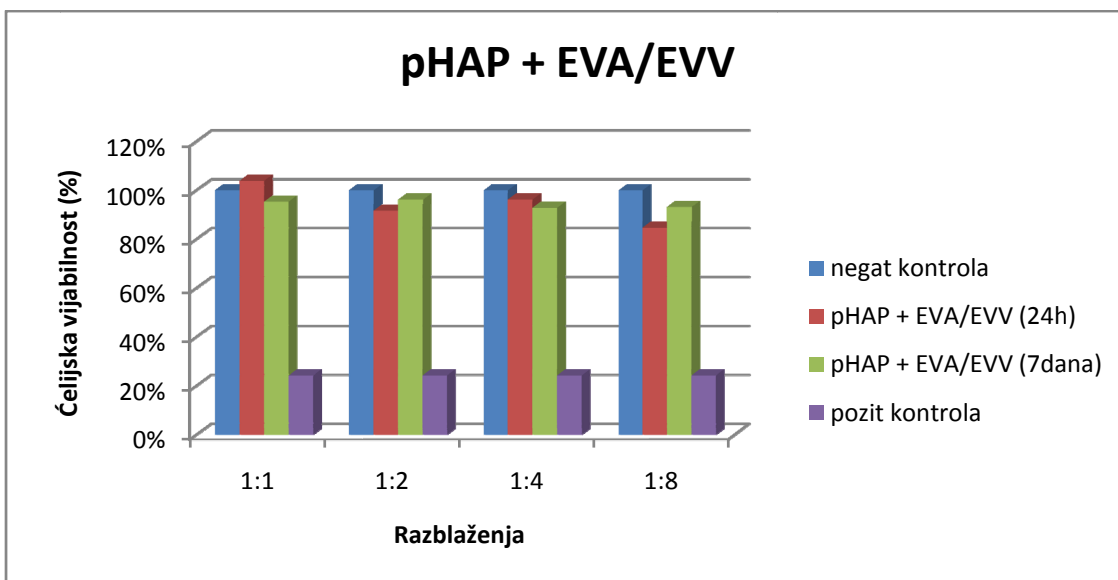
Grafikon 1. Preživljavanje mezenhimalnih ćelija zubne pulpe u prisustvu različitih koncentracija ekstrakta pHAP u hranljivoj podlozi, nakon 24 sata i 7 dana. *** $p < 0.001$ u odnosu na negativnu kontrolu i pHAP. ** $p < 0.01$ u odnosu na negativnu kontrolu. # $p < 0.05$ u odnosu na pHAP nakon 24 h u istom razblaženju 1:1.



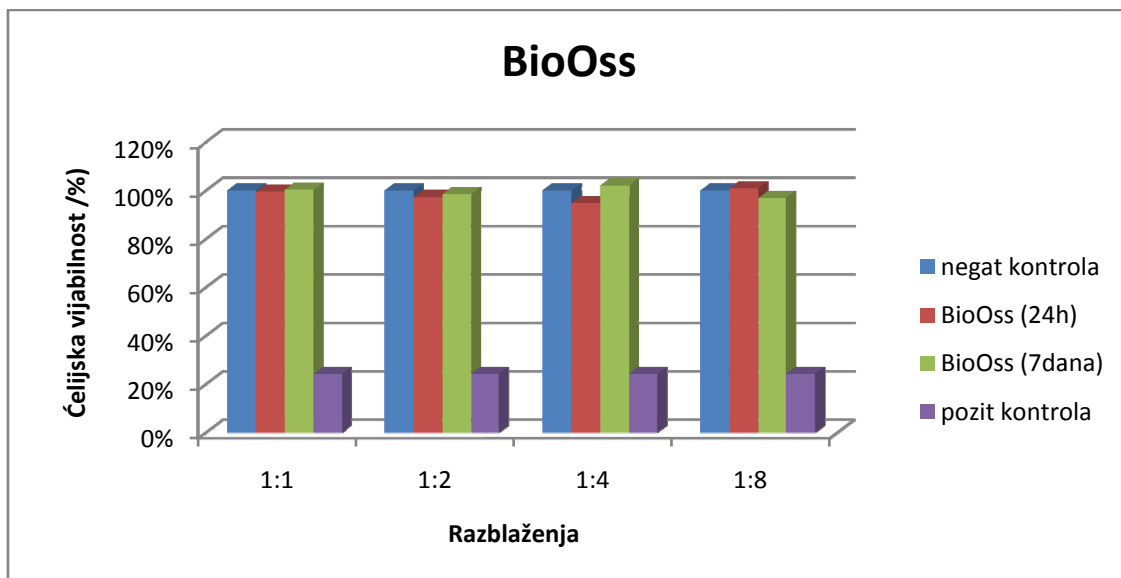
Grafikon 2. Preživljavanje mezenhimalnih ćelija zubne pulpe u prisustvu različitih koncentracija ekstrakta pHAP+PLGA u hranljivoj podlozi, nakon 24 sata i 7 dana.



Grafikon 3. Preživljavanje mezenhimalnih ćelija zubne pulpe u prisustvu različitih koncentracija ekstrakta pHAP+alginat u hranljivoj podlozi, nakon 24 sata i 7 dana.



Grafikon 4. Preživljavanje mezenhimalnih ćelija zubne pulpe u prisustvu različitih koncentracija ekstrakta pHAP+EVA/EVV u hranljivoj podlozi nakon 24 sata i 7 dana.



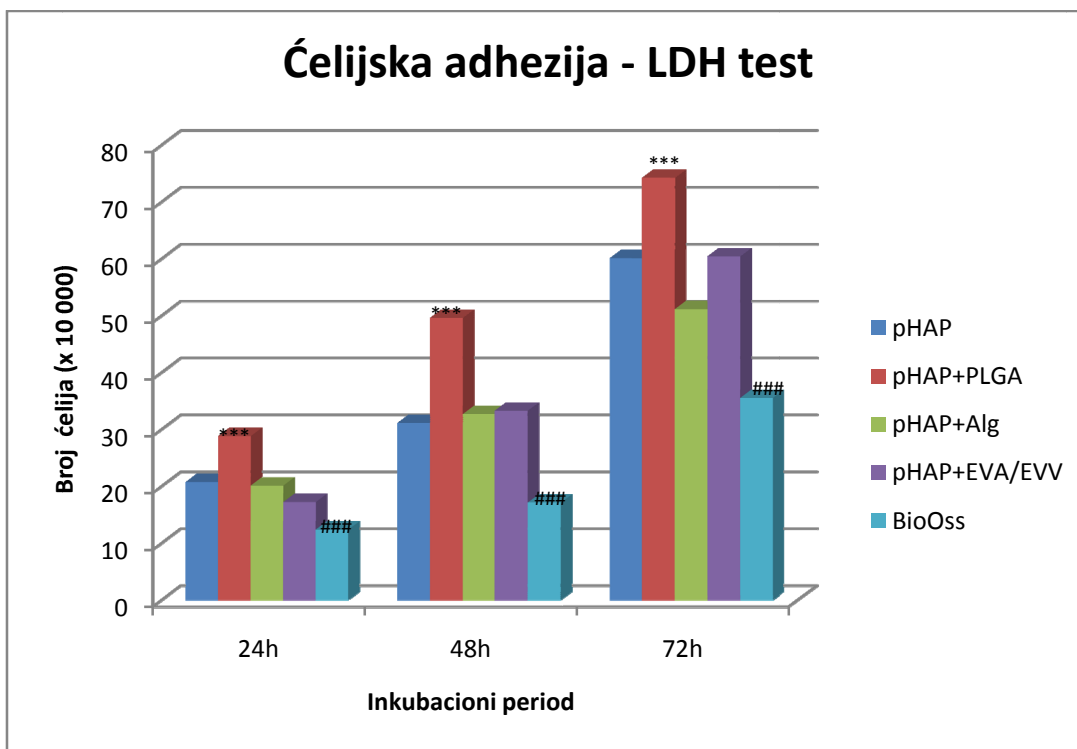
Grafikon 5. Preživljavanje mezenhimalnih ćelija zubne pulpe u prisustvu različitih koncentracija ekstrakta Bio Oss-a u hranljivoj podlozi, nakon 24 sata i 7 dana.

4.3.2. Ispitivanje direktne citotoksičnosti — LDH test

LDH test je primenjen za određivanje direktne citotoksičnosti materijala, odnosno za određivanje procenta vijabilnih ćelija koje su bile u direktnom kontaktu sa ispitivanim materijalom. Za potrebe ovog testa, ćelije su inkubirane u 3 različita vremenska perioda – 24 h, 48 h i 72 h na svakom skafoldu nakon čega su lizirane fizičkim i hemijskim putem. Nivo LDH je određivan spektrofotometrijski iz dobijenog supernatanta. Rezultati LDH testa su izraženi kao broj ćelija, dobijenog na osnovu nivoa LDH izmerenog spektrofotometrijski.

Na Grafikonu 6 uočava se značajna ćelijska proliferacija i adhezija kod svih ispitivanih materijala. Kao ni u prethodnom, ni u ovom eksperimentu ispitivani skafoldi i Bio Oss nisu pokazali citotoksičnost u direktnom kontaktu sa mezenhimalnim ćelijama zubne pulpe. Prvog dana eksperimenta, broj ćelija u prisustvu svakog od ispitivanih materijala nije se uvećao u odnosu na broj zasejanih ćelija. Od drugog dana eksperimenta ćelije su se umnožavale i njihov broj se eksponencijalno povećavao. Nakon 72 sata inkubacionog perioda, uočen je značajno veći broj ćelija u odnosu na broj zasejanih ćelija kod svih ispitivanih materijala. Posebno povoljan efekat na

proliferaciju je pokazao PLGA, što se jasno vidi na Grafikonu 6. Rezultati statističke analize (dvofaktorska ANOVA) su pokazali statistički značajne razlike u broju ćelija po vremenu kod svih materijala. Poređenje materijala je pokazalo statistički značajno veći broj ćelija gajenih na pHAP+PLGA i statistički značajno manji broj ćelija gajenih na Bio Oss-u u odnosu na sve ostale materijale. Broj ćelija gajenih na pHAP-u, pHAP+alg i pHAP+EVA/EVV nije se značajno razlikovao.

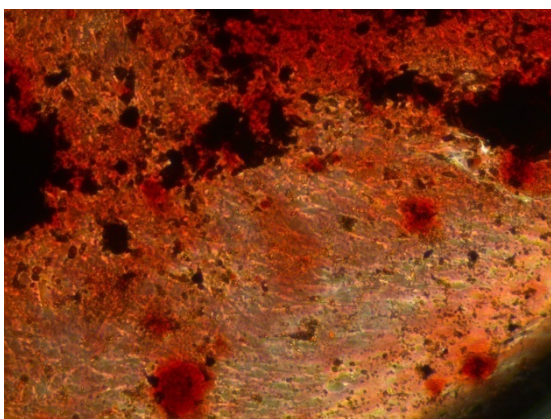


Grafikon 6. Broj ćelija adheriran na ispitivanim materijalima nakon inkubacionog perioda od 24h, 48h i 72h (***) $p < 0.001$ broj ćelija veći u odnosu na sve ostale materijale, ### $p < 0.001$ broj ćelija manji u odnosu na sve ostale materijale).

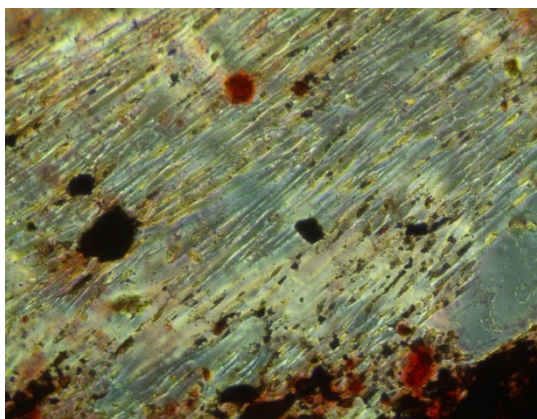
4.4. Određivanje stepena osteoblastne diferencijacije bojenjem alizarin crvenim

Alizarin crveno se smatra markerom za mineralizaciju jer formira crveno obojeni kompleks sa jonom Ca^{2+} . Slike 26 - 30 pokazuju da su ćelije jasno vidljive nakon bojenja a prisustvo obojenog kompleksa oko ćelija ukazuje na novo deponovani mineralizovani matriks koji one proizvode. To potvrđuje da su se mezenhimalne ćelije zubne pulpe diferencirale u osteoblaste u prisustvu osteogenog medijuma u kontaktu sa

svim ispitivanim skafoldima i Bio Oss-om. Međutim, gajenje ćelija na polistirenu u prisustvu osteogenog medijuma (Slika 31a), na osnovu mnogo manjeg broja prisutnog obojenog kompleksa oko ćelija ukazuje na vidljivo niži stepen diferencijacije, što potvrđuje značaj skafolda u procesu diferencijacije. Za razliku od kontrole - polistirena u prisustvu kontrolnog medijuma (31b) gde očekivano nije bilo prisutnih obojenih kompleksa, određeni broj obojenih kompleksa uočen je kod svih ispitivanih materijala u prisustvu kontrolnog medijuma.

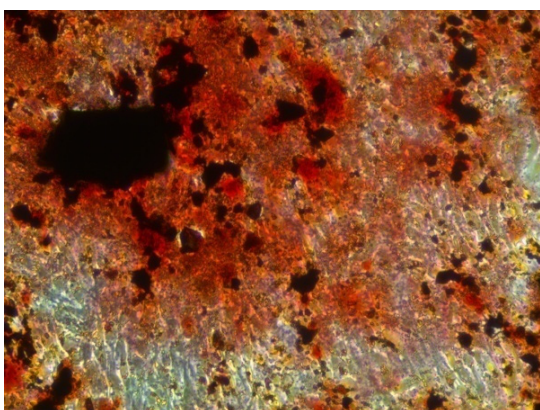


(a)

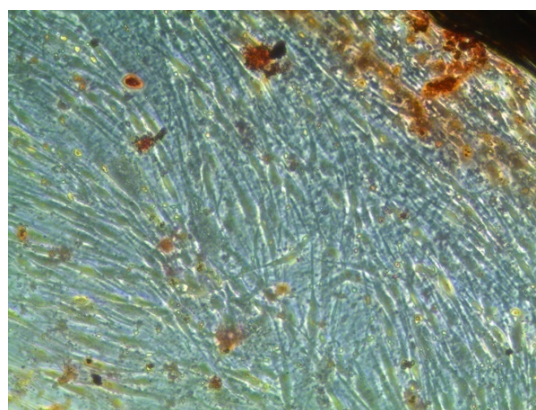


(b)

Slika 26. Porozni hidroksiapatit – prisustvo mineralizovanog matriksa nakon 3 nedelje gajenja ćelija u: (a) osteogenom medijumu, (b) kontrolnom medijumu.

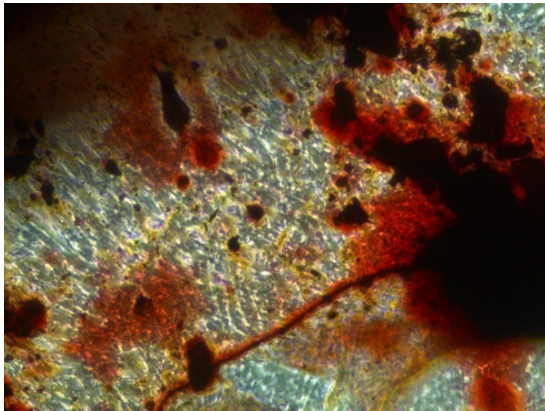


(a)

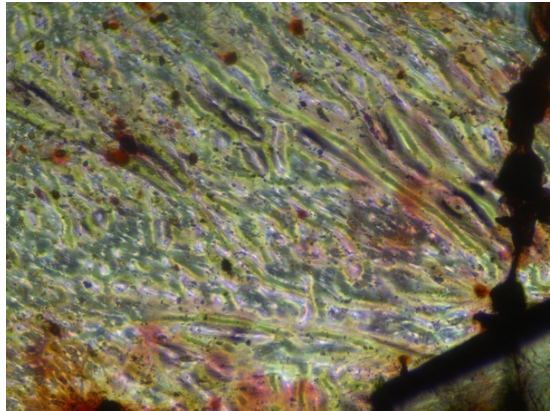


(b)

Slika 27. Porozni hidroksiapatit sa PLGA - prisustvo mineralizovanog matriksa nakon 3 nedelje gajenja ćelija u: (a) osteogenom medijumu, (b) kontrolnom medijumu.

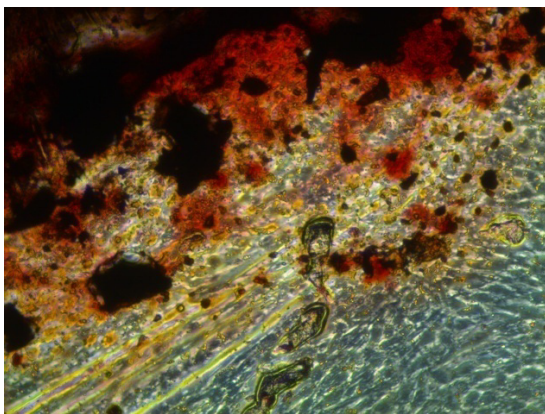


(a)

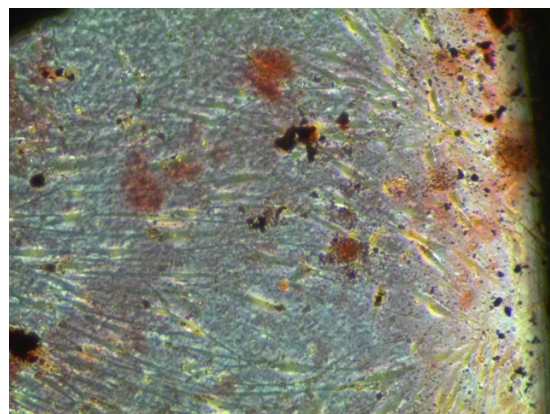


(b)

Slika 28. Porozni hidroksiapatit sa alginatnim polimerom - prisustvo mineralizovanog matriksa nakon 3 nedelje gajenja ćelija u: (a) osteogenom medijumu, (b) kontrolnom medijumu.

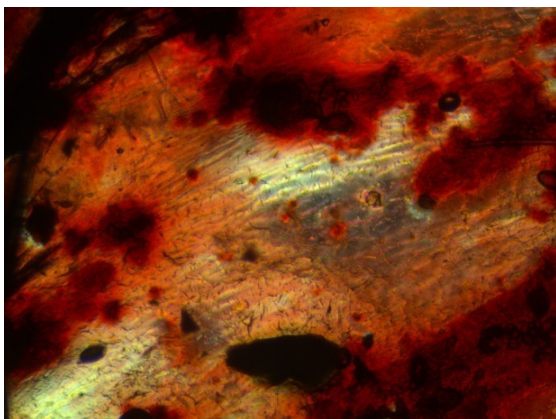


(a)

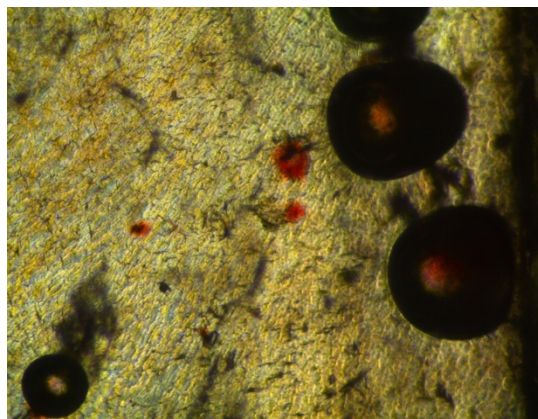


(b)

Slika 29. Porozni hidroksiapatit sa EVA/EVV - prisustvo mineralizovanog matriksa nakon 3 nedelje gajenja ćelija u: (a) osteogenom medijumu, (b) kontrolnom medijumu.

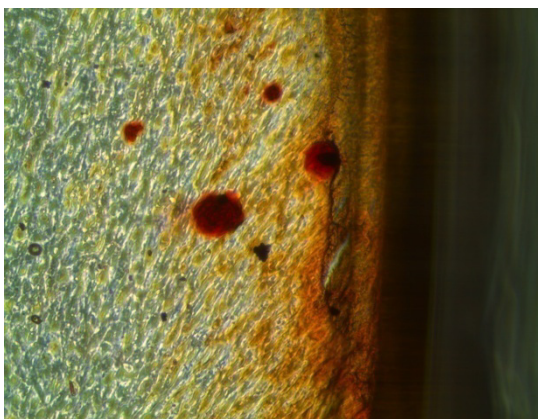


(a)

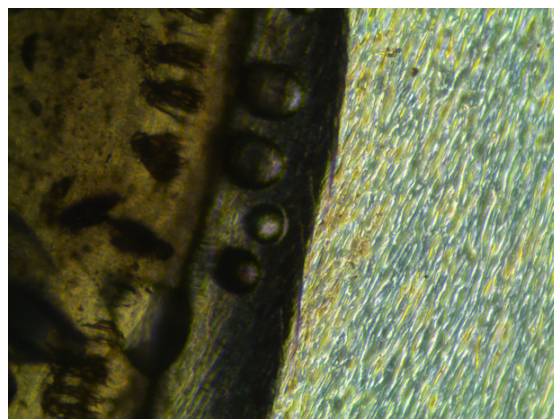


(b)

Slika 30. Bio Oss - prisustvo mineralizovanog matriksa nakon 3 nedelje gajenja ćelija u: (a) osteogenom medijumu, (b) kontrolnom medijumu.



(a)



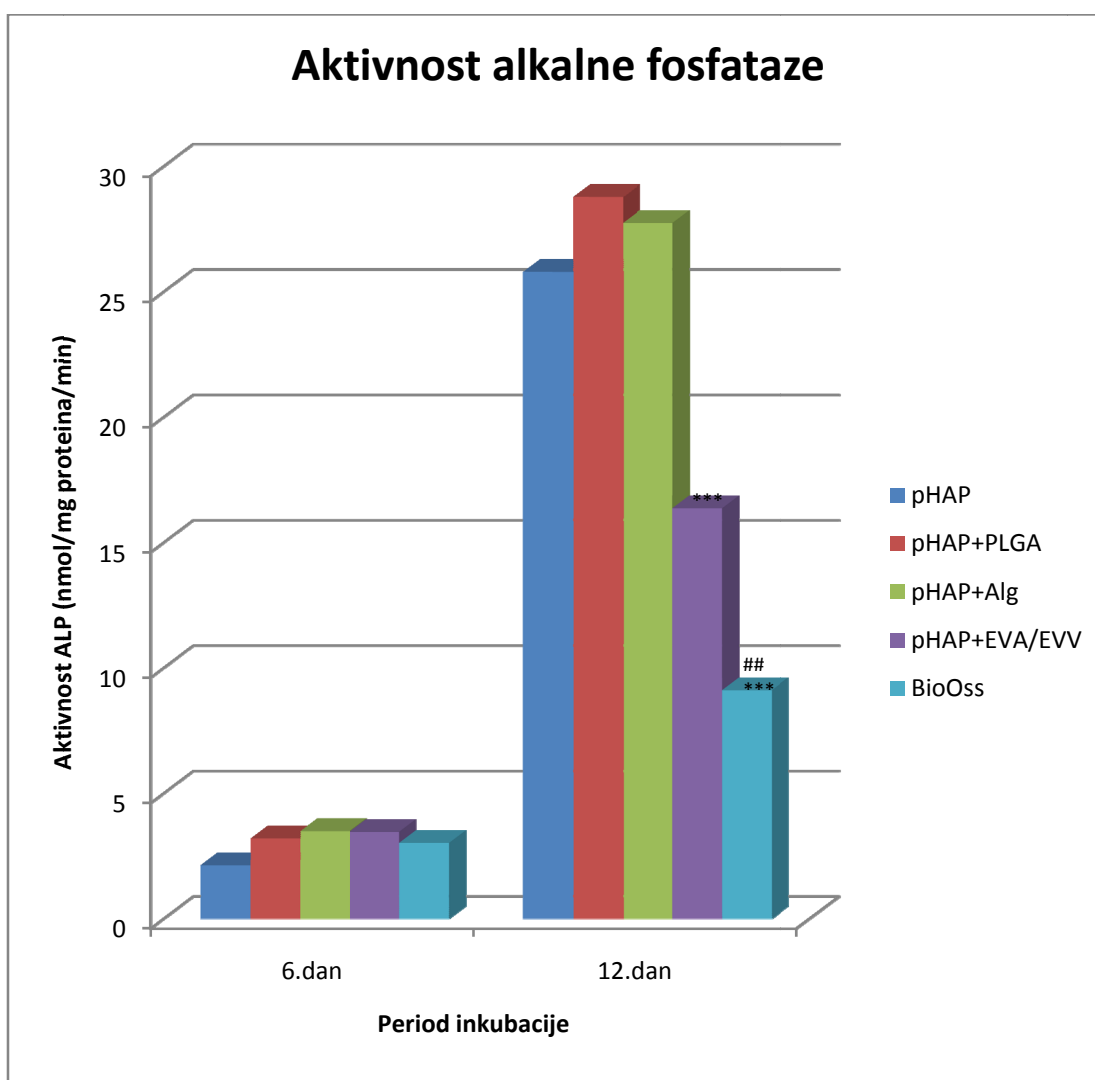
(b)

Slika 31. Polistiren - prisustvo mineralizovanog matriksa nakon 3 nedelje gajenja ćelija u: (a) osteogenom medijumu, (b) kontrolnom medijumu.

4.5. Određivanje stepena osteoblastne diferencijacije merenjem aktivnosti alkalne fosfataze

Aktivnost alkalne fosfataze je biohemijski marker za fenotip osteoblasta, mineralizaciju kosti i koštanu diferencijaciju. Da bi se ispitao uticaj različitih materijala na osteogenu diferencijaciju, aktivnost alkalne fosfataze je merena u dve vremenske tačke, nakon perioda inkubacije od 6 i 12 dana. Rezultati pokazuju da nakon 6 dana ne postoji razlika u aktivnosti alkalne fosfataze gajenih ćelija u prisustvu ispitivanih

materijala u odnosu na Bio Oss, što je pokazano jednofaktorskom ANOVA-om. Međutim, nakon perioda inkubacije od 12 dana u osteogenom medijumu, kod ćelija inkubiranih na svim ispitivanim materijalima je uočena povećana aktivnost alkalne fosfataze u odnosu na aktivnost alkalne fosfataze ćelija u prisustvu Bio Oss-a (Grafikon 7). Jednofaktorska ANOVA je pokazala značajne razlike između ispitivanih materijala ($F=53.069$, $p<0.001$). Kao što se vidi na Grafikonu 7, aktivnost ALP je bila značajno niža kod ćelija gajenih na pHAP+EVA/EVV i Bio Oss-u u odnosu na aktivnost ćelija gajenih na pHAP, pHAP+PLGA i pHAP+Alg.



Grafikon 7. Aktivnost alkalne fosfataze ispitivanih materijala nakon perioda inkubacije od 6 i 12 dana. *** $p<0.001$ u odnosu na pHAP, pHAP+PLGA i pHAP+Alg, ## $p<0.01$ u odnosu na pHAP+EVA/EVV.

4.6. Skening elektronska mikroskopija ćelija na skafoldima

Skening elektronska mikroskopija je korišćena u eksperimentalnom delu ove studije u cilju vizuelizacije morfoloških promena izolovanih ćelija i njihove adhezije za ispitivane materijale kao i prisustva ekstracelularnog matriksa (ECM). ECM je pokazatelj stepena osteogene diferencijacije mezenhimalnih ćelija zubne pulpe a samim tim i biokompatibilnosti materijala. Dobra biokompatibilnost između ćelija i materijala neophodna je za njihovu primenu u tkivnom inženjerstvu.

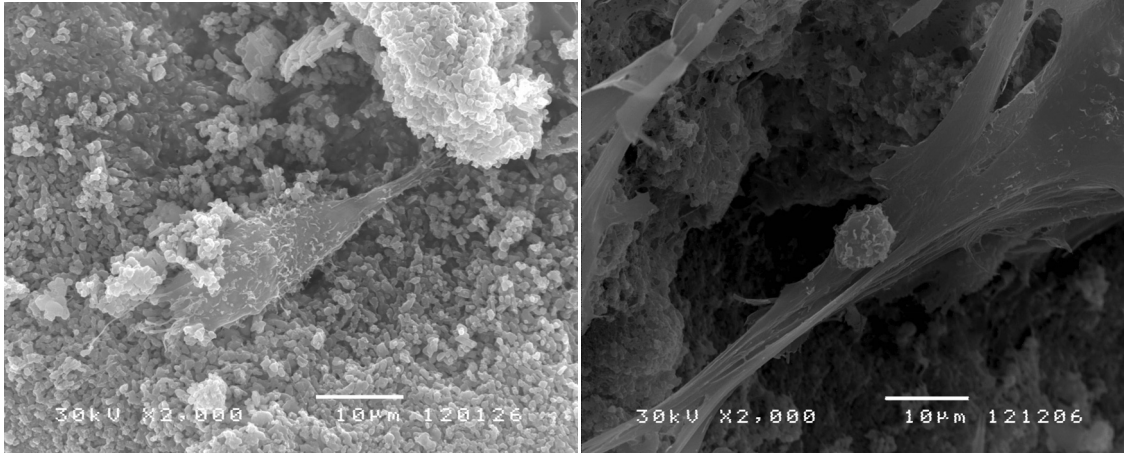
Ćelije i njihov odnos prema biomaterijalima zabeležen je putem SEM-a nakon perioda inkubacije od 7, 14 i 21 dan u osteogenom medijumu i 7 dana u kontrolnom medijumu.

Ćelije inkubirane 7 dana u kontrolnom medijumu na svim materijalima, pHAP-u, pHAP+PLGA, pHAP+alg, pHAP+EVA/EVV i Bio Oss-u, su sferičnog oblika sa brojnim, veoma izduženim citoplazmatskim produžecima koji su pokazatelj dobre ćelijske adhezije (Slike 32-36a).

Nakon inkubacionog perioda od 7 dana u osteogenom medijumu, ćelije u prisustvu svih materijala su poligonalnog oblika sa izrazito izduženim citoplazmatskim produžecima. Mogle su se uočiti i strukture organskog porekla, nalik fibroznim. Ovakve morfološke promene ukazuju na diferencijaciju izolovanih ćelija u osteoblaste i početak formiranja ECM (Slike 32-36b).

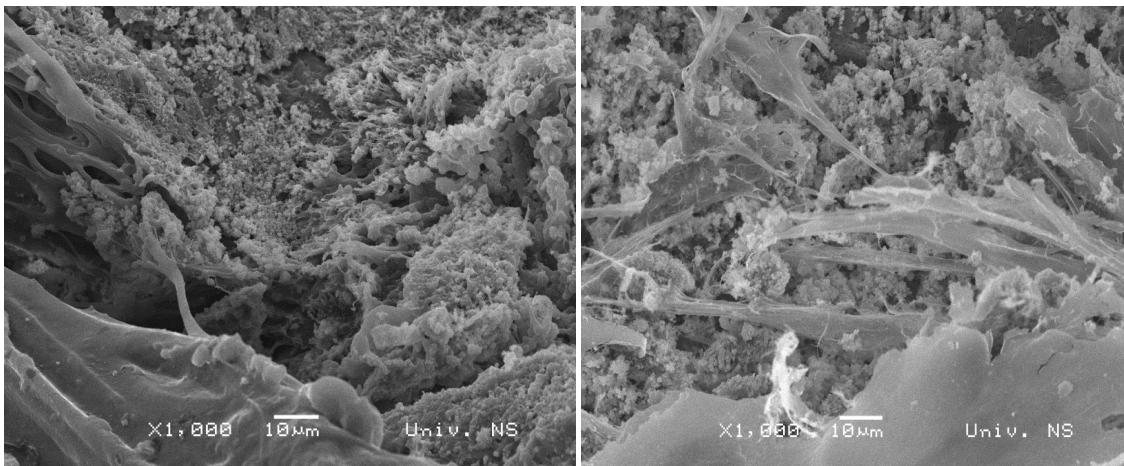
U prisustvu svih ispitivanih materijala gde su ćelije inkubirane 14 dana u osteogenom medijumu, ECM je izražen i jasno uočljiv. Ovakav nalaz označava veći stepen osteogene diferencijacije odnosno prisustvo većeg broja osteoblasta i sledstveno tome - veću proizvodnju ECM (Slike 32-36c).

Nakon 21 dan gajenja ćelija u osteogenom medijumu, u prisustvu svih materijala, ECM je dominantan na SEM mikrografijama, prekriva i pore skafolda. Ovakva razvijena mreža ECM dokaz je izražene diferencijacije i veoma dobre biokompatibilnosti između ćelija i materijala (Slike 32-36d).



(a)

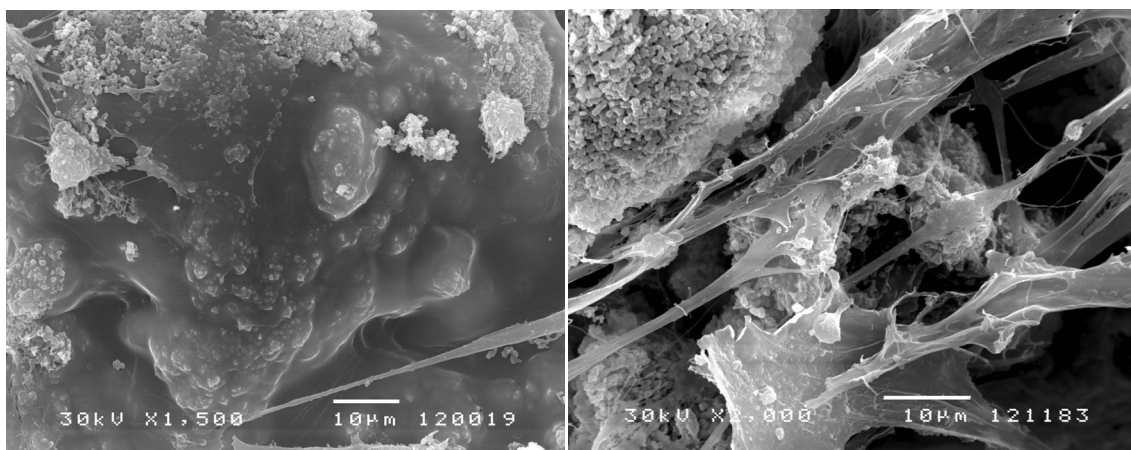
(b)



(c)

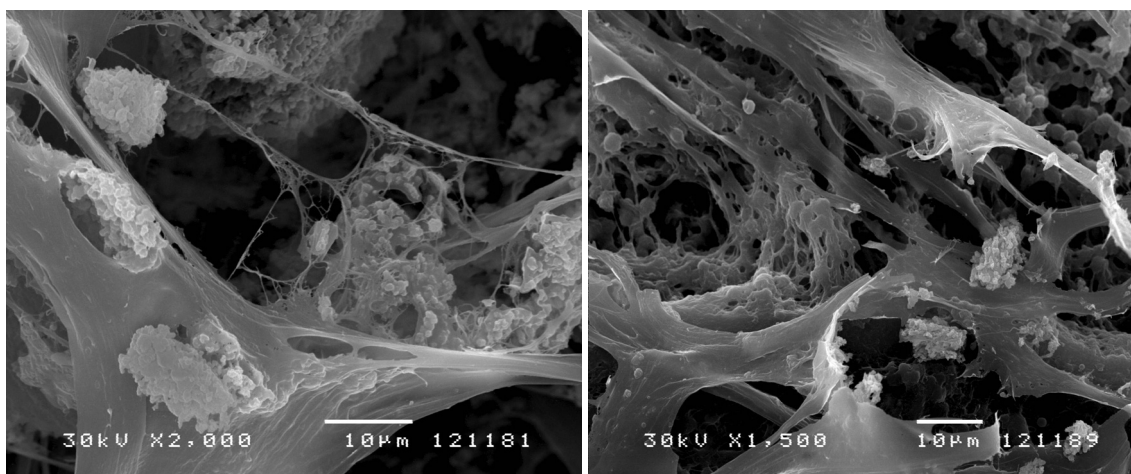
(d)

Slika 32. SEM mikrografija mezenhimalnih ćelija zubne pulpe gajenih na pHAP-u: a) 7 dana u kontrolnom medijumu; b) 7 dana u osteogenom medijumu; c) 14 dana u osteogenom medijumu; d) 21 dan u osteogenom medijumu.



(a)

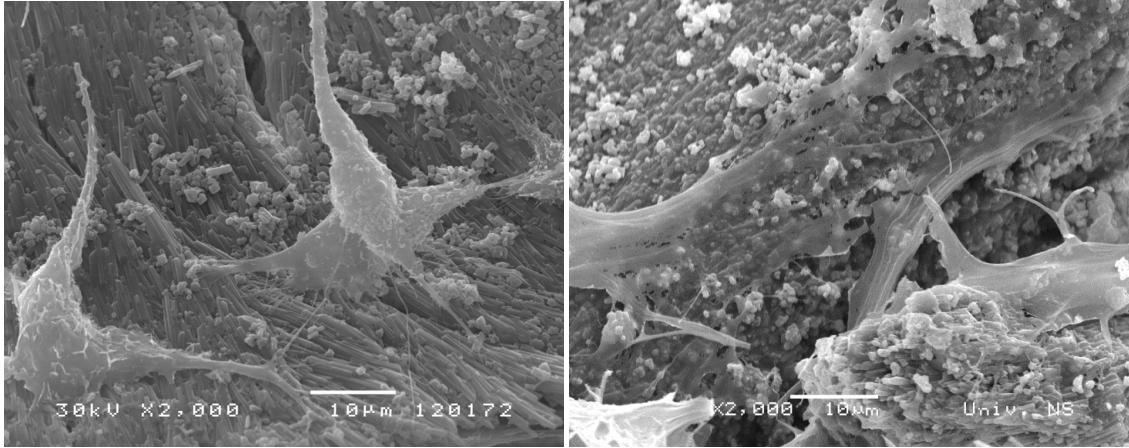
(b)



(c)

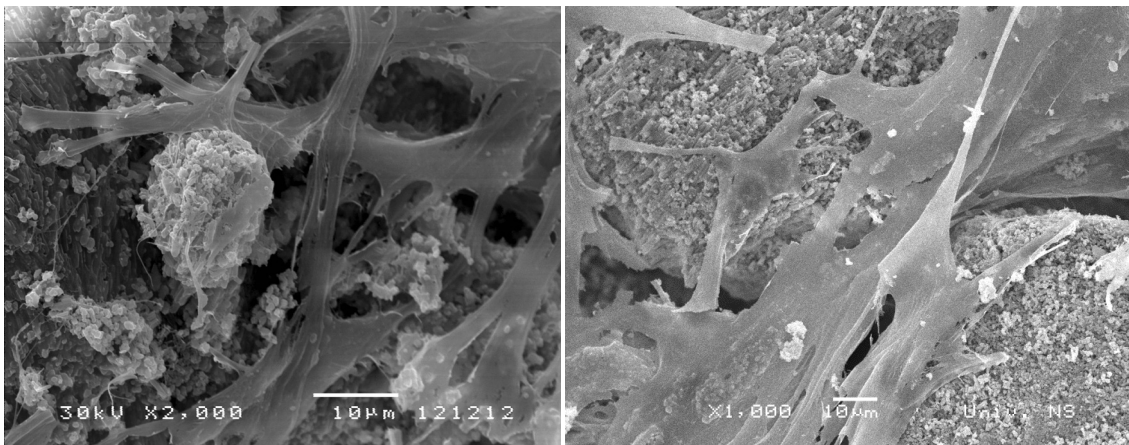
(d)

Slika 33. SEM mikrografija mezenhimalnih ćelija zubne pulpe gajenih na pHAP+PLGA: a) 7 dana u kontrolnom medijumu; b) 7 dana u osteogenom medijumu; c) 14 dana u osteogenom medijumu; d) 21 dan u osteogenom medijumu.



(a)

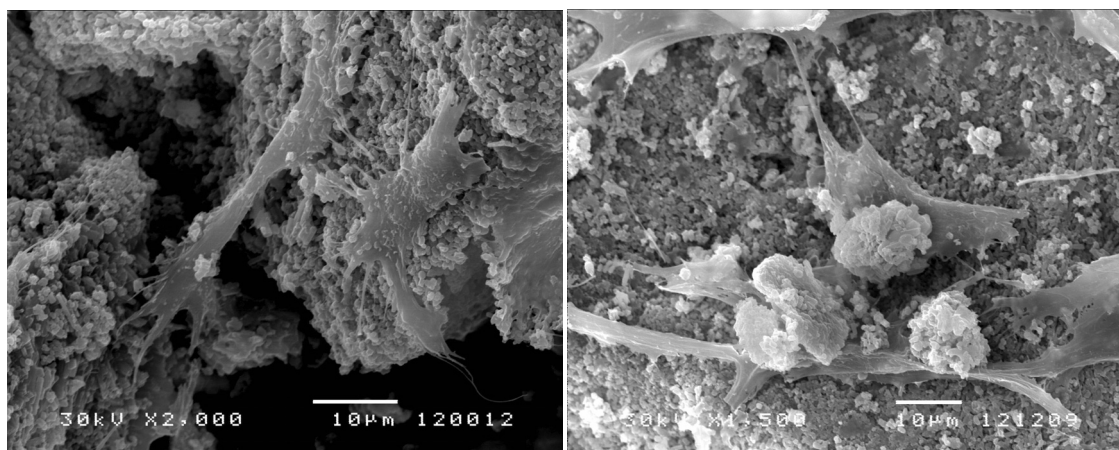
(b)



(c)

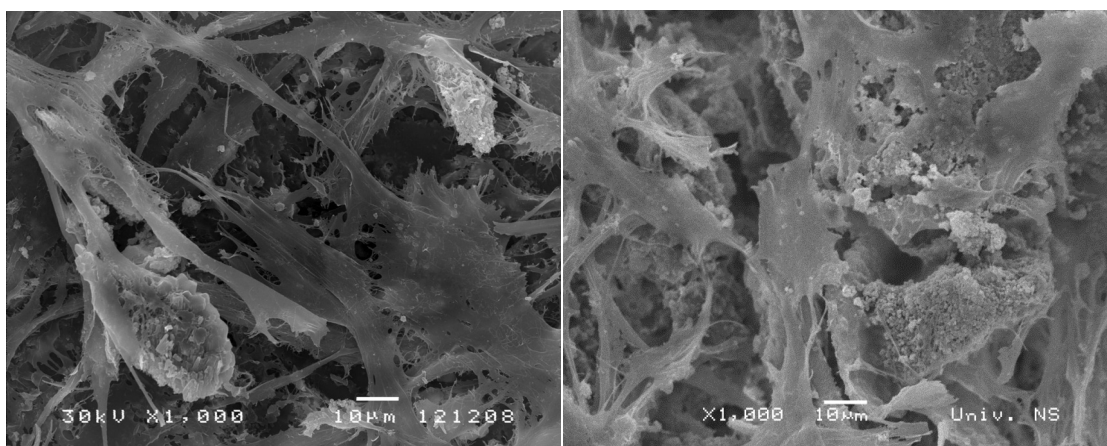
(d)

Slika 34. SEM mikrografija mezenhimalnih ćelija zubne pulpe gajenih na pHAP+alginatu: a) 7 dana u kontrolnom medijumu; b) 7 dana u osteogenom medijumu; c) 14 dana u osteogenom medijumu; d) 21 dan u osteogenom medijumu.



(a)

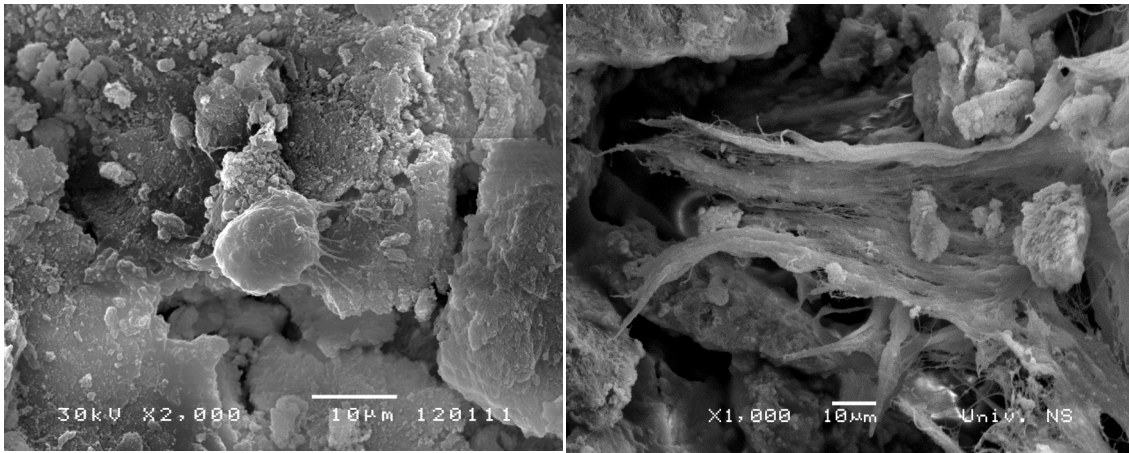
(b)



(c)

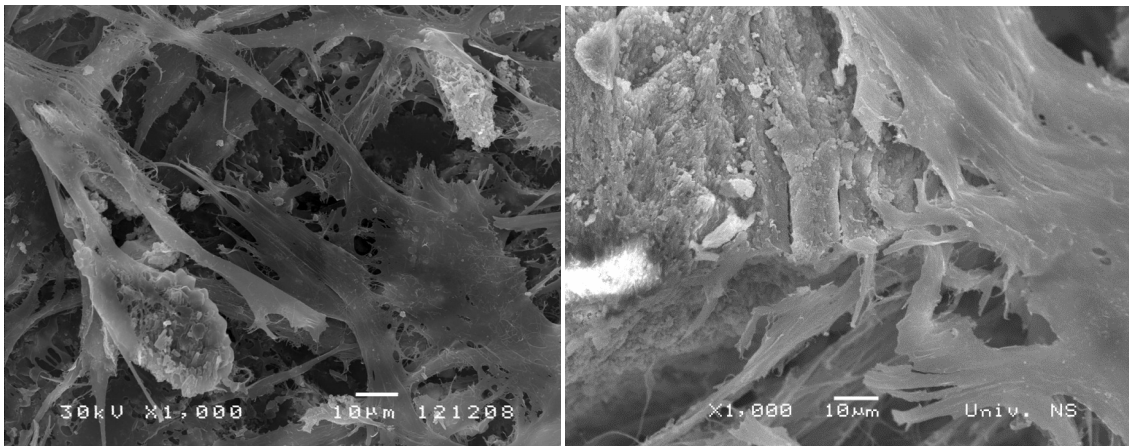
(d)

Slika 35. SEM mikrografija mezenhimalnih ćelija zubne pulpe gajenih na pHAP+EVA/EVV: a) 7 dana u kontrolnom medijumu; b) 7 dana u osteogenom medijumu; c) 14 dana u osteogenom medijumu; d) 21 dan u osteogenom medijumu.



(a)

(b)



(c)

(d)

Slika 36. SEM mikrografija mezenhimalnih ćelija zubne pulpe gajenih na Bio Oss-u: a) 7 dana u kontrolnom medijumu; b) 7 dana u osteogenom medijumu; c) 14 dana u osteogenom medijumu; d) 21 dan u osteogenom medijumu.

5. DISKUSIJA

Matične ćelije i skafoldi imaju ključnu ulogu u stvaranju novog tkiva putem tkivnog inženjstva. Ćelijska komponenta je neophodna zbog stvaranja i uspostavljanja ekstracelularnog matriksa u novom tkivu, dok su skafoldi zaduženi za obezbeđivanje mehaničke stabilnosti i temelja trodimenzionalne organizacije novog tkiva. Oblast istraživanja ove doktorske disertacije obuhvatila je ispitivanje uticaja osteokonduktivnih biomaterijala na diferencijaciju mezenhimalnih ćelija izolovanih iz zubne pulpe mlečnih zuba sa resorbovanim korenom. Istraživanje je od izuzetnog značaja sa aspekta koštano tkivnog inženjstva i primene ispitivanih poroznih biokompatibilnih osteokonduktivnih materijala u regenerativnoj medicini.

Rezultati ove doktorske disertacije dali su doprinos u oblasti proučavanja osteogenog diferencionog potencijala mezenhimalnih ćelija zubne pulpe kao jednog od značajnih mehanizama koštano-tkivnog inženjstva. Ispitivanje diferencijalnog kapaciteta ćelija zubne pulpe na ćelijskim nosačima otvara nove mogućnosti u tretmanu trauma, tumora, karijesa i parodontalnih oboljenja. Pored upotrebe u stomatološke svrhe, zbog svoje pluripotentnosti matične ćelije poreklom iz eksfoliranih humanih mlečnih zuba, SHED, mogu da se diferenciraju i u pravcu osteoblasta, hondrocita, adipocita, neurona/glije, glatkih i skeletnih mišićnih ćelija, melanocita i endotelnih ćelija. Navedene činjenice govore o velikom potencijalu ćelija zubne pulpe u polju regenerativne medicine. Ne treba zanemariti činjenicu da zbog lake dostupnosti i neinvazivne metode izolovanja, zubna pulpa u perspektivi može postati najvažniji izvor adultnih multipotentnih mezenhimalnih matičnih ćelija koje bi mogle da se krioprezerviraju u bankama matičnih ćelija.

Takođe, pozitivan uticaj osteokonduktivnih materijala na proliferaciju i diferencijaciju ovih ćelija stimuliše dalja interesovanja za njihovu potencijalnu praktičnu primenu sa post-natalnim mezenhimalnim ćelijama zubne pulpe u regenerativnoj medicini.

5.1. Mezenhimalne ćelije zubne pulpe

Izolovanje i proliferacija matičnih ćelija su prvi korak u tkivnom inženjstvu. Za potrebe ove studije matične ćelije su izolovane iz zubne pulpe mlečnih zuba u

fiziološkoj smeni. Prednost ovog postupka je u tome što ne zahteva upotrebu svrdla niti klešta. Dok se svrdlima tkivo zagreva i time dolazi do oštećenja pulpe, upotreba klešta otežava izdvajanje pulpe i povećava verovatnoću kontaminacije. Upotrebom ekskavatora ili nerv igle navedeni rizici smanjeni su na minimum. Istovremeno, koren mlečnih zuba u fiziološkoj smeni je resorbovan na manje od jedne polovine svoje dužine čime je smanjena i količina očuvanog pulpnog tkiva.

Postoje dva načina izolovanja mezenhimalnih ćelija iz zubne pulpe: enzimska digestija (22, 124, 125) i „outgrowth“ metoda (29, 126, 127). Obe metode koriste sposobnost mezenhimalnih ćelija da adheriraju za plastiku i do sada su se pokazale dovoljno efikasnim. Glavna prednost „outgrowth“ metode je u jednostavnosti izvođenja i niskoj ceni. Njen nedostatak je duži vremenski period (oko dve nedelje) potreban da bi dovoljan broj ćelija migrirao iz tkiva. Sa druge strane enzimskom digestijom moguće je u potpunosti odvojiti ćelije od tkiva, međutim radi se o tehnički veoma komplikovanom procesu praćenom visokim stepenom oštećenja i gubitka ćelija.

Poređenjem navedenih metoda, neki autori su došli do zaključka da ćelije izolovane različitim metodama različito proliferišu, te da ćelije dobijene digestijom poseduju veći proliferativni potencijal u poređenju sa ćelijama dobijenim „outgrowth“ metodom (128). Mnogi autori su ispitivali razlike u fenotipu ćelija zubne pulpe izolovanih ovim dvema metodama, kao i fiziologiju ćelija i ćelijskih subpopulacija potencijalno sposobnih za diferencijaciju u različita tkiva. Couble i sar. su izolovali ćelije „outgrowth“ metodom i indukovali ih da se diferenciraju u ćelije nalik odontoblastima, koje su u *in vitro* uslovima bile sposobne da stvore mineralnu strukturu nalik dentinu (126). Sa druge strane, Gronthos i sar. (22) i Batouli i sar. (40) su, nakon izolovanja ćelija zubne pulpe metodom enzimске digestije, pokazali njihovu diferencijaciju u ćelije nalik odontoblastima i sposobnost produkcije dentina u *in vivo* uslovima. Kerkis i sar. (29) su pretpostavili da gajenje pulpe u fragmentima pre prvog pasažiranja sprečava prevremenu diferencijaciju matičnih ćelija i da „outgrowth“ metoda promoviše selektivnu proliferaciju nezrelih matičnih ćelija zubne pulpe (IDPC). Ovi autori su pokazali da IDPC izolovane iz mlečnih zuba eksprimiraju nekoliko markera za mezenhimalne matične ćelije i da bi mogle igrati ulogu multipotentnih prekursora kako matičnih ćelija zubne pulpe (DPSC), tako i i matičnih ćelija poreklom iz eksfoliranih humanih mlečnih zuba (SHED).

U nameri da se izbegne dodatni gubitak i oštećenje ćelija usled enzimske digestije, a imajući u vidu poodmaklu resorpciju korena zuba i samim tim inicijalno male količine pulpnog tkiva dobijenog iz mlečnih zuba u fiziološkoj smeni, u ovoj studiji je korišćen „outgrowth“ metod izolovanja mezenhimalnih ćelija zubne pulpe.

U prvih sedam dana od početka izolovanja ćelije su u morfološkom pogledu bile heterogene, sferičnog i izduženog oblika. Ćelije sferičnog oblika se smatraju prekursorima epitelijalnih ili endotelijalnih ćelija (128). One su uglavnom iščezavale nakon nekoliko uzastopnih pasaža (3-4) što je i u ovoj studiji bio slučaj. Nakon perioda od dve do tri nedelje, ćelije su bile uglavnom fibroblastoidnog oblika, sa uvećanjem citoplazme i polarizacijom jedra. Ovakva morfologija je u skladu sa dosadašnjim studijama (124, 126) i ukazuje na prisustvo mezenhimalnih ćelija. Praćenje i posmatranje fibroblastoidnih ćelija, potvrdilo je njihov izdužen vretenast oblik bez vidljivih promena u morfologiji i modelu rasta u daljim pasažama. U saglasnosti sa prethodnim studijama na matičnim ćelijama zubne pulpe meziodensa i mlečnih zuba (129), ćelije izolovane u ovim istraživanjima su pokazale visok stepen klonogenosti. Pored toga, karakteriše ih izrazita sposobnost proliferacije i nakon višestrukog pasažiranja što je od velikog značaja u pogledu njihove potencijalne primene u regenerativnoj medicini.

Za identifikaciju izolovanih ćelija kao matičnih ćelija, odnosno za njihovu dodatnu karakterizaciju, korišćene su i imunofenotipske analize ispitivanjem ekspresije pozitivnih i negativnih površinskih antigena ćelija. Analiza protočnom citometrijom je pokazala da su ispitivane ćelije visoko pozitivne (više od 99%) na ćelijske markere karakteristične za mezenhimalne ćelije (CD29, CD73, CD90), čime je potvrđeno da su praktično sve prisutne ćelije u ispitivanom uzorku bile mezenhimalne ćelije. Odsustvo drugih tipova ćelija, potvrđeno je analizom markera primitivnih hematopoetskih progenitora, CD34. Ispitivani marker CD34 je detektovan u uzorku u procentu manjem od 1% i na taj način je isključeno prisustvo hematopoetskih ćelija. Dobijeni rezultati u skladu su sa dosadašnjim studijama (29, 130-133).

Međutim, pozitivnost ili negativnost određenih markera u analizi protočnom citometrijom se ne može koristiti kao konačna potvrda prisustva matičnih ćelija (134). Iz tog razloga, ispitivana je njihova sposobnost multipotentne diferencijacije. Mezenhimalne ćelije mogu da se diferenciraju u različite tipove ćelija koje pripadaju

njihovoj lozi. Pokazano je da mezenhimalne ćelije poreklom iz koštane srži mogu da se diferenciraju u osteogene, hondrogene, adipogene, miogene i neurogene tipove ćelija, pri čemu se prve tri navedene vrste smatraju suštinskim za definisanje multipotentnosti mezenhimalnih ćelija (135). Da bi se konačno identifikovale mezenhimalne matične ćelije, u ovoj studiji su u prisustvu adekvatnih medijuma za diferencijaciju indukovane adipogena, hondrogena i osteogena diferencijacija. Ovakva identifikacija je značajna da bi se ispitivane ćelije razlikovale od prekursorskih ćelija: preosteoblasta, preadipocita ili prehondrocita koje imaju sposobnost diferencijacije u samo jedan tip ćelija (12).

Matične ćelije poreklom iz eksfoliranih humanih mlečnih zuba prvi put su izolovane i identifikovane 2003. godine kao heterogena populacija ćelija (28) sa mnogim razlikama u odnosu na mezenhimalne ćelije poreklom iz pulpe stalnih zuba, ali u skladu sa razlikama koje postoje u razvojnim stadijumima, strukturi tkiva i funkciji između mlečnih i stalnih zuba (136). Osobine mezenhimalnih ćelija okarakterisanih u ovoj studiji su uporedive sa osobinama matičnih ćelija poreklom iz mlečnih zuba opisanih u drugim studijama (28, 137). Prednost SHED ćelija u odnosu na adultne postnatalne matične ćelije je u njihovoj visokoj proliferativnoj i klonogenoj sposobnosti (133). S obzirom da se umnožavaju i rastu mnogo brže od adultnih matičnih ćelija poreklom iz drugih tkiva, neki autori pretpostavljaju da su ove ćelije manje zrele i da postoji mogućnost njihove diferencijacije u različite tipove tkiva (28). Sve navedene karakteristike, pored činjenice da predstavljaju lako dostupan izvor ćelija, proširuju mogućnosti upotrebe SHED u terapijske svrhe koje su neophodne za kliničku i primenu u tkivnom inženjeringu. Višestruke prednosti SHED su naročito došle do izražaja sa osnivanjem banki matičnih ćelija. Za razliku od embrionalnih ćelija, one nisu predmet etičkih dilema, njihovo prikupljanje i izolovanje je jednostavno i bezbolno sa minimalno invazivnom metodom, mogu se izolovati i čuvati pre nastanka oštećenja, ne postoji mogućnost odbacivanja od strane organizma jer pripadaju grupi autolognih transplanata a iznad svega – komplementarne su sa mezenhimalnim ćelijama izolovanim iz drugih adultnih i postnatalnih tkiva. Kod ljudi, kompletna zamena mlečne denticije stalnom, u proseku traje između šest i sedam godina što mlečne zube svrstava u dostupan izvor mezenhimalnih ćelija za duži period. Dok se ne pronade rešenje za prevazilaženje problema imunog odbacivanja, ove ćelije predstavljaju važan izvor u medicini za biološki kompatibilne terapije i tretmane (137).

Mezenhimalne ćelije zubne pulpe mlečnih zuba u ovoj studiji su eksprimirale markere za mezenhimalne ćelije i pokazale sposobnost diferencijacije u adipogene, hondrogene i osteogene ćelije *in vitro*. Iako su potrebna dalja istraživanja da bi se potvrdile njihove funkcionalne karakteristike u *in vivo* uslovima, jasno je da ispitivane ćelije predstavljaju veoma važan potencijalni izvor za tkivno inženjerstvo ne samo u kraniofacijalnoj regiji nego i uopšte.

5.2. Karakteristike materijala

Osnovna komponenta u regeneraciji tkiva je upotreba odgovarajućih ćelijskih nosača - skafolda. Funkcija skafolda je da obezbedi prostor za ćelijsku adheziju, da podstakne ćelijsku proliferaciju i diferencijaciju i na taj način da pospeši regeneraciju tkiva. Skafoldi namenjeni za tkivni inženjering treba da su 3D strukture i dizajnirani tako da imitiraju sve karakteristike prirodnog ekstracelularnog matriksa (ECM). Njihova sinteza je izuzetno kompleksna i uključuje sastav materijala, arhitekturu, strukturnu mehaniku, površinske osobine, brzinu degradacije, raspadne produkte kao i kompoziciju dodatih komponenti i naravno, promene svih ovih faktora tokom vremena (138).

Skafoldi u tkivnom inženjerstvu kosti treba da su biokompatibilni, osteokonduktivni ili osteoinduktivni i sposobni da izdrže mehaničko opterećenje (139). Takođe, moraju da ispune nekoliko osnovnih zahteva – da su visoko porozni sa odgovarajućom veličinom pora, da poseduju neophodna površinska svojstva koja omogućavaju ćelijsku adheziju, proliferaciju i diferencijaciju, i mehanička svojstva koja omogućavaju da se održi unapred dizajnirana struktura tkiva i biokompatibilnost (odnosno netoksičnost) (140, 141). Poroznost nosača pored toga što treba da olakša migraciju ćelija i obezbedi adekvatnu mikrosredinu za proliferaciju i diferencijaciju, potrebno je da omogući dobru vaskularizaciju i nesmetan protok nutritivnih materija i kiseonika, kao i eliminaciju razgradnih produkata. Takođe, brzina degradacije mora biti usklađena sa stvaranjem novog tkiva pri čemu se mora voditi računa o biokompatibilnosti raspadnih produkata (142). Veća poroznost rezultuje boljim urastanjem kosti u *in vivo* uslovima, ali u slabijoj mehaničkoj čvrstoći. Poroznost mora biti u optimalnom opsegu – dovoljno mala da obezbedi mehanički integritet i dovoljno

velika da obezbedi optimalnu bioaktivnost. Iz tog razloga, veličina pora bi trebala da bude oko 300 nm (138).

Biokeramički materijali su ranije imali široku primenu u koštanom tkivnom inženjerstvu. Oni se smatraju biokompatibilnim, krtnim, tvrdim, sa relativno lošim osobinama pri istezanju, ali odličnom kompresivnom snagom i visokom otpornošću na trošenje. Hidroksiapatit je biokeramički materijal koji se više od dve decenije koristi kao zamena za kosti zbog svojih sličnosti sa neorganskom komponentom prirodne kosti. On je osteokonduktivan, biokompatibilan, sporo resorbilan, ali pri visokoj poroznosti ima loše mehaničke osobine (143).

Polimeri koji se danas koriste u koštanom tkivnom inženjerstvu se mogu podeliti na prirodne i sintetičke. Prirodni materijali imaju prednostu smislu biološkog prepoznavanja u pogledu ćelijske adhezije i funkcije. Međutim, ne može se uticati u velikoj meri na njihove mehaničke osobine i biorazgradljivost. Takođe, mogu dovesti do imune reakcije domaćina i posedovati patogene nečistoće a neki od prirodnih polimera nisu široko rasprostranjeni u prirodi što ih čini i dosta skupim. Sintetski polimeri, s druge strane, imaju mogućnost široke proizvodnje, uz kontrolu mehaničkih osobina, mikrostrukture i stepena degradacije. Međutim, zbog slabih mehaničkih osobina koje potiču od visoke poroznosti i brze resorptivne kinetike, ni jedan od ispitivanih polimera ne ispunjava sve zahteve za ćelijskog nosača u tkivnom inženjerstvu kosti (144).

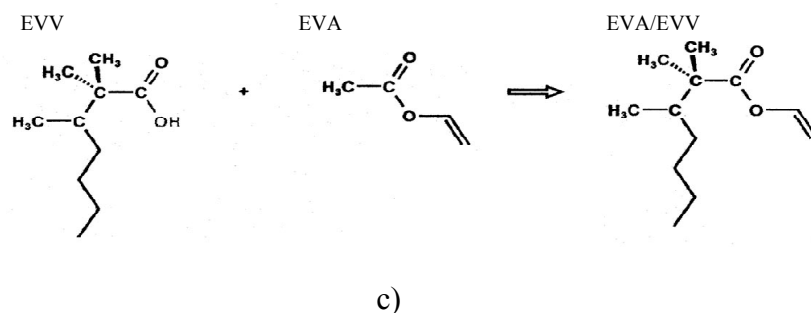
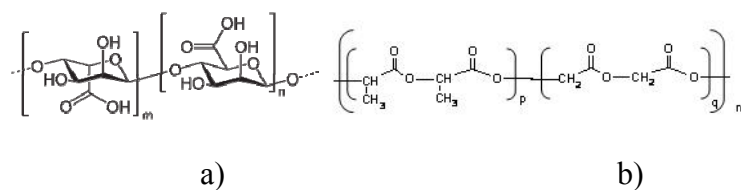
Kao „zlatni standard“ za nadoknadu izgubljenog koštanog tkiva danas se u praksi koristi Bio Oss. Bio Oss spada u prirodne ksenogene zamenike kosti bovinog porekla, pospešuje rast kosti u koštanim defektima, stepen poroznosti iznosi 75-80%. Zbog velikog antigenog potencijala, da bi mogao da se upotrebi neophodan je postupak deproteinizacije termičkom obradom svežih materijala. U zavisnosti od indikacija može se koristiti u vidu spongioznih ili kortikalnih granula dimenzija 0.25 - 1 mm ili 1 – 2 mm, kao spongiozni blok promera 1x1x2cm i kolageni blok sastavljen od 100 mg spongioznih granula i 10% kolagena.

Kombinacija polimera i bioaktivne keramike pripada grupi kompozitnih ćelijskih nosača, koji predstavljaju najnoviji tip ćelijskih nosača. Iz navedenih razloga, u ovoj studiji ispitivan je porozni hidroksiapatit i kompozitni materijali – porozni

hidroksiapatit u kombinaciji sa prirodnim alginatnim, PLGA i EVA/EVV polimerima. Njihova kombinacija dovodi do poboljšanja mehaničkih osobina skafolda, a osnovni izazov pri njihovoj sintezi je postizanje dobrog hemijskog i/ili mehaničkog vezivanja hidroksiapatita i polimera. Mešavina ovih materijala pokazuje i bolje osteokonduktivne osobine od pojedinačnih sastojaka. Na ovaj način se u mnogome rešavaju i problemi u vezi sa biokompatibilnošću polimera koji nastaju zbog njihove brze degradacije i produkata razgradnje. Proizvodi razgradnje hidroksiapatita dovode do neutralizacije kiselih proizvoda razgradnje polimera, što pak dovodi do poboljšanog okruženja za ćelije na koje pad pH može da ima fatalan učinak (145).

Na području tkivnog inženjerstva, veliki izazov u nauci o materijalima i tehnologiji predstavlja kontrola tačnosti i reproduktivnosti izrade skafolda zbog standardizacije procesa izrade. Različite tehnike izrade skafolda za stvaranje različitih polimernih i kompozitnih materijala radi obezbeđivanja različitih mikrostruktura je danas veoma aktuelna tema istraživanja. Ipak, i pored brojnih tehnika koje se primenjuju svaka poseduje neke nedostatke u pogledu kontrole poroznosti skafolda, veličine pora i distribucije, kao i prisustva ostataka toksičnih rastvarača u skafoldu.

Razumevanje mehanizma nukleacije biomimetičkog pHAP u simuliranoj telesnoj tečnosti (SBF) je bitno za dublja istraživanja na ovom polju. Dalja unapređenja se mogu postići odabiranjem odgovarajućih polimera za funkcionalizaciju skafolda. Kao što je poznato, karboksilne/hidroksilne grupe u alginatnim, PLGA i EVA/EVV lancima se ponašaju kao aktivni činioci u pokretanju nukleacije (alginat poseduje i karboksilne i hidroksilne grupe, dok PLGA i EVA/EVV imaju samo karboksilne grupe, Slika 37). Ove negativno naelektrisane grupe, u početnoj fazi nukleacije, privlače Ca^{2+} jone iz SBF koji se potom vezuju za površinu polimera.



Slika 37. Strukturna formula a) alginat, b) polilaktid-koglikolna kiselina, c) polimer etilen vinil acetat / versat

U sledećem koraku, PO_4^{3-} joni su privučeni pozitivno naelektrisanim Ca^{2+} jonima. Zbog toga proces nukleacije kalcijum fosfata započinje početnim vezivanjem Ca^{2+} jona za aktivnu grupu odgovarajućih polimera i naknadnim vezivanjem PO_4^{3-} jona za Ca^{2+} jone. Kao što je već ranije pokazano (146-148), koncentracija karboksilnih/hidroksilnih grupa na polimernoj površini skafolda (data preko gustine centara nukleacije) verovatno igra veoma bitnu ulogu u učestalosti i mehanizmu nukleacije kalcijum fosfata (149). Gustina mesta nukleacije može takođe uticati i na veličinu aglomerata i njihovu morfologiju. Rezultati prikazani u ovom radu jasno potvrđuju ovu pretpostavku. Veća gustina nukleusa hidroksiapatita uočena je u slučaju alginatnog tankog filma na hidroksiapatnom supstratu (skafoldu). Ovo je verovatno prouzrokovano veoma velikom gustinom karboksilnih i/ili hidroksilnih aktivnih grupa koje su prisutne u alginatnim lancima. Međutim, u slučaju PLGA, uočen je relativno mali udeo spojenih čestica u procesu samoorganizovanja, što je verovatno uzrokovano značajno manjim udelom karboksilnih aktivnih grupa u PLGA nego u alginatima. Što se tiče prostornog rasporeda aktivnih hidroksilnih grupa u alginatnim lancima, izgleda kao da su oni relativno blizu jedan drugom. Zbog toga su se aglomerati iz susednih nukleacionih oblasti verovatno spojili jedni s drugim stvarajući formaciju izduženih struktura. Shodno tome, u uzorcima gde se alginat koristio kao tanki film na površini supstrata, dobijene su manje čestice (1-5 μm). Ovo može biti rezultat povećanog broja

nukleacionih prostora. Veći aglomerati (neki i preko 8 μm) su posmatrani kada je korišćen PLGA, koji verovatno ima manji broj nukleacionih prostora koji dalje stvaraju odgovarajući rast kalcijum-fosfatnih nukleusa i zrnaca.

Kao što je prikazano u rezultatima, pHAP sastavljen na alginatnom tankom filmu ima različitu morfologiju čestica – loptast i poligonalni oblik. Čestice poligonalnog oblika su manje; prečnik najmanje čestice je oko 1 μm , dok je prečnik najvećih oko 5 μm . Veličina loptasto oblikovanih čestica je od 3 do 5 μm . Širina igličastih formi na površini loptastih čestica je 18-25 nm, dok je udaljenost između njih u opsegu od 150-500 μm . Lee i sar. (150) su u sličnoj studiji posmatrali tanjirastu morfologiju nukleotidnih apatita sa česticama veličine od 10–60 μm i prosečnog obima od 27 μm . U rezultatima ovog rada prikazan je i samostalno sastavljen pHAP na površini PLGA tankog filma. Loptaste čestice pokazuju izuzetno razvijenu morfologiju sa strukturama nalik laticama na datoj površini. Veličine čestice su se uglavnom kretale od 2.5 do 3.5 μm , međutim, bile su prisutne i neke manje (0.7 – 1.5 μm) kao i mali broj nešto većih čestica (4.3 - 8.5 μm). Širina laticastih struktura na datoj površini je samo 15-20 nm. Udaljenost između čestica je u rasponu od 900 nm do 1.8 μm . Slične vrednosti veličine čestica (prosečnog prečnika od 2.44 μm) su pokazane u nekim radovima u vezi sa apatitnim biomimetskim strukturama koje su razvijene na PLGA skafoldu (151). Morfologija čestica izgleda veoma slično morfologiji dobijenoj u ovoj studiji, mada same slike su nedovoljno jasne i gustina naseljavanja je znatno manja nego u našim istraživanjima. Čak i kad je korišćen 1.5 x SBF ta gustina naseljavanja je bila neuporedivo manja nego u eksperimentima u ovoj tezi. Qu i sar. su takođe pokazali da je pri korišćenju 1.5 x SBF za apatitnu nukleaciju na PLGA, gustina naseljavanja bila manja i proces nukleacije izgleda da je bio u svojoj početnoj fazi (veličina čestica je bila manja od pola mikrona za vreme nukleacije od 24 h) (152). Sve ovo ukazuje, da mada se u principu procesi u svim slučajevima odvijaju sličnim mehanizmima, brzina odvijanja procesa samoorganizovanja biomimetskog karbonatnog hidriksiapatita u našim eksperimentima odvijala se neuporedivo većom brzinom, što ukazuje da su naši uzorci bili veoma precizno dizajnirani i da su naši keramički nosači imali idealnu morfologiju površine koja je uticala značajno i na sam način deponovanja hidroksiapatita, i na aktivnost površine tako deponovanih tankih filmova, koji su saglasno svojoj maloj debljini zadržali morfologiju keramičkog nosača (skafolda).

Dobijeni rezultat upućuje da se mogu očekivati i vrlo brz proces naseljavanja progenitorskih ćelija na površinama takvog skafolda, njihova veoma brza diferencijacija u osteoblastne ćelije i brza osteointegracija koja sledi potom.

Hidroksiapatit sastavljen na polimer etilen vinil acetat/versat (EVA/EVV) tankom filmu takođe poseduje negativno naelektrisanje acetatnih i versatnih jona (karboksilnih polarnih grupa) koje igra ulogu aktivnih mesta za suprotno naelektrisane jone Ca^{2+} . Dobro međusobno razdvojene čestice sa veoma izraženim pravilnim rasporedom u redove, koji su skoro podjednako udaljeni jedan od drugog, čine ove sisteme izuzetno zanimljivim za modeliranje interakcija između skafolda i ćelija kosti, što je suštinski važno za istraživanje aktivnosti koštanih ćelija i njihovog prilagođavanja na morfološke osobine površine skafolda. Može se očekivati da ovakvi sistemi odigraju ulogu precizno dizajniranih oslonaca “mostnih” konstrukcija, koje se potom lako međusobno mogu spojiti koristeći biomimetsku metodu daljeg rasta pHAP u potpunosti stimulisanu dejstvom SBF u čijem sastavu su različiti joni, naelektrisani proteini i aminokiseline (153).

Samoorganizovane nanostrukture dobijene biomimetički u ovoj studiji poboljšavaju rast ćelija na površini skafolda. Nekoliko studija koje su proučavale ponašanje ćelija na apatitu formiranom na površini polimera potvrđuju njegovu sposobnost da favorizuje osteoblastni rast ćelija (154-156).

Ova studija je pokazala novi način sinteze strukture slične biološkom apatitu pomoću dodatnog nanodizajniranja pHAP skafolda biometričkim tretmanom. Postignut je poboljšani nanostrukturni dizajn prethodno stvorenih pHAP skafolda uz pomoć biomimetičkog tretmana u SBF. Da bi se unapredila nukleacija biometričke apatitne faze, PLGA, alginatni i EVA/EVV tanki filmovi su naneti na površinu skafolda pre uranjanja u SBF. Dobijene strukture imitiraju strukturu prirodne kosti i pogodne su za rast ćelija, omogućavajući bržu regeneraciju kosti. Ovaj mehanizam apatitne formacije *in vitro* je sličan mehanizmu nastajanja prirodnog koštang tkiva *in vivo*. Na taj način nanodizajniran skafold bi mogao omogućiti uslove koji su slični fiziološkim, za rast i proliferaciju ćelija (116).

5.3. Citotoksičnost analiziranih materijala i procene ćelijske adhezije i proliferacije

Ispitivanje citotoksičnosti biomaterijala u *in vitro* uslovima je početni korak u proceni biokompatibilnosti. U ovoj studiji, u svrhu analize vijabilnosti ćelija ispitivani materijali analizirani su kvalitativnom i kvantitativnom metodom, pri indirektnom (MTT test) i direktnom (LDH test) kontaktu sa ćelijskom kulturom. Treba imati u vidu da ovi testovi daju samo ocenu citotoksičnosti, a ne biološku ocenu materijala.

5.3.1. Indirektni kontakt ispitivanih materijala sa mezenhimalnim ćelijama zubne pulpe – MTT test

U svrhu kvantitativne evaluacije citotoksičnosti skafolda, ispitivan je indirektni kontakt materijala sa mezenhimalnim ćelijama zubne pulpe MTT testom. Ovaj test se standardno upotrebljava u ispitivanju citotoksičnosti hidroksiapatita i njegovih kompozita (157). Naime, ekstrakti materijala su 24 h i 7 dana inkubirani u hranljivoj podlozi, koja je zatim u određenoj proporciji (1:1 do 1:8) dodata u hranljivu podlogu koja se inače koristi za gajenje ćelija. U mitohondrijama živih ćelija, enzim sukcinat dehidrogenaza dovodi do oksidacije MTT rastvora (žuto obojeni vodeni rastvor tetrazolijumske soli) i dajući karakteristične plavo-ljubičaste produkte, nerastvorljive u vodi - formazan precipitate. Optička gustina kristala formazana je direktno proporcionalna broju ćelija (158), dakle njenim merenjem je omogućena je indirektna ocena ćelijskog rasta i proliferacije. U našim eksperimentima MTT testom je određivan broj vijabilnih ćelija u odnosu na negativnu kontrolnu grupu (ćelije gajene u medijumu bez ekstrakta ispitivanog materijala) u kojoj je procenat preživljavanja ćelija uzet kao 100%. Ukoliko medijum koji je inkubiran sa skafoldom pokazuje citotoksičnost, broj vijabilnih ćelija u datom uzorku će se smanjiti u odnosu na kontrolnu grupu. Pozitivna kontrolna grupa bile su ćelije gajene u medijumu sa toksičnim agensom - 4% fenolom, gde je procenat preživljavanja ćelija bio nešto manji od 25%. Kao što je i očekivano, razlika u preživljavanju ćelija između ove dve grupe bila je visoko statistički značajna ($p < 0.001$).

Analizom rezultata je utvrđeno da se broj vijabilnih mezenhimalnih ćelija zubne pulpe inkubiranih 24 h i 7 dana u prisustvu ekstrakata ispitivanih materijala u

razblaženjima 1:1, 1:2, 1:4 i 1:8 nije statistički značajno razlikovao u odnosu na broj ćelija u negativnoj kontrolnoj grupi. Jedini izuzetak je ekstrakt materijala pHAP-a inkubiranog 7 dana u razblaženju 1:1 gde je uočena blaga citotoksičnost. Nijedan od ispitivanih materijala nije doveo do značajnog citotoksičnog efekta na kulturu mezenhimalnih ćelija zubne pulpe što je u saglasnosti sa istraživanjem Dararutane i saradnika (159). Ipak, neki autori su poređenjem citotoksičnih efekata trikalcijumfosfata, Bio Oss-a i hidroksiapatita došli do zaključka da veću biokompatibilnost na humane osteoblaste ima Bio Oss u odnosu na trikalcijumfosfat, koji je manje biokompatibilan u poređenju sa HAP-om (160). Poredeći skafolde različitih veličina pora – nano i mikrostrukture, razlikom u dobijenim optičkim gustinama MTT testa pokazano je da veća površina nanostrukturnih skafolda, kakvi su i skafoldi dizajnirani u našoj studiji, omogućava bolje vezivanje mezenhimalnih ćelija unutar skafolda (161). Takođe, pored veličine pora, na vijabilnost ćelija značajno utiče i njihova morfologija (161). Razlike u citotoksičnosti testiranih materijala koje su uočene u nekim studijama, istraživači su objasnili termalnim degradacijama polimera koje nastaju tokom sinteze kompozitnih jedinjenja. Degradacijom nastaju kiseli degradacioni produkti koji mogu dovesti do “odlepljivanja” ćelija i ćelijske smrti (162). Tokom proizvodnje kompozitnih materijala u odnosu na proizvodnju čistog polimera, u samom materijalu dolazi do stvaranja fragmenata niske molekularne mase. U procesu pripreme ekstrakata, ovi fragmenti lako prelaze u rastvor povećavajući koncentraciju produkata razgradnje kompozitnih materijala (156). Nikolić i sar. dobili su statistički značajan citotoksičan efekat pHAP+PLGA što su objasnili prethodno navedenom činjenicom (163). Međutim, drugi autori analizirajući dejstvo pHAP i PLGA na vijabilnost humanih osteoblasta nisu dobili statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu (143). Oni su ekstrahovali ispitivani materijal u različitim vremenskim tačkama od 10 minuta do 24 h i zaključili da su citotoksične supstance, ako su uopšte i postojale, oslobođene u prvih 10 minuta ekstrakovanja jer se nimalo ili vrlo mala količina toksičnih materija oslobodila u periodu između 10 minuta i 24 h. Rezultati naših istraživanja govore u prilog veoma dobrom načinu sinteze, morfologiji pora i visokoj biokompatibilnosti svih ispitivanih materijala.

5.3.2. Direktni kontakt ispitivanih materijala sa mezenhimalnim ćelijama zubne pulpe – LDH test

Da bi se ispitala citotoksičnost pri direktnom kontaktu ispitivanih materijala sa mezenhimalnim ćelijama zubne pulpe mlečnih zuba korišćen je LDH test. Ovim testom se vijabilnost, odnosno preživljavanje ćelija, procenjuje na osnovu količine laktat dehidrogenaze (LDH) koja se oslobodi u ekstraćelijsku sredinu. Dugi niz godina je ovaj citolitički enzim korišćen za merenje gubitka integriteta ćelijske membrane (164, 165). Indirektno merenje aktivnosti LDH prisutne u citoplazmi intaktnih ćelija moguće je izvršiti samo nakon liziranja ćelija. Kada je dokazano da je LDH aktivnost direktno proporcionalna broju ćelija (166), uvedena je nova eksperimentalna metoda na osnovu koje se merenjem aktivnosti enzima kvantifikuju ćelije adherirane za ispitivani materijal (156).

U ovom istraživanju, nakon 24 h broj zasejanih ćelija se nije uvećao ni na jednom materijalu. Međutim, nakon 48 h, ćelije su se umnožile i njihov broj je eksponencijalno rastao da bi nakon 72 h bio uočljiv značajno veći broj ćelija u odnosu na broj zasejanih ćelija kod svih ispitivanih materijala. Analizom dobijenih rezultata LDH testa, može se zaključiti da nijedan od materijala – pHAP, pHAP+PLGA, pHAP+alginat, pHAP+EVA/EVV i Bio Oss, nije pokazao citotoksičnost u direktnom kontaktu sa mezenhimalnim ćelijama zubne pulpe mlečnih zuba. Uočena je značajna proliferacija i adhezija ćelija kod svih ispitivanih materijala sa naznakom da je najveći broj ćelija zabeležen u prisustvu pHAP+PLGA, a najmanji u prisustvu Bio Oss-a.

Na ćelijsku adheziju i proliferaciju veliki uticaj imaju karakteristike površine polimera u kompozitnim skafoldima kao što su stepen hidratacije (167, 168), površinski napon (169), površinsko naelektrisanje i topografija (170). Ćelijska adhezija je bolja ukoliko je površina hidrofilnija jer je na taj način omogućena adsorpcija površinskih proteina nestabilnim i reverzibilnim vezama (167). Ispitivanjem morfologije površine materijala pokazano je postojanje afiniteta različitih tipova ćelija za hrapave površine (171). Hemijske karakteristike materijala su takođe jedan od faktora koji mogu uticati na ćelijsku adheziju. Naime, prisustvo karboksilnih i hidroksilnih grupa u zavisnosti od tipa ćelija može imati važnu ulogu u njihovoj adheziji i proliferaciji (172, 173). Neki autori su došli do zaključka da blokada hidroksilnih grupa dovodi do gubitka ćelijske

adhezije (172) dok su drugi pronašli da prisustvo velikog broja hidroksilnih grupa ima suprotan efekat (174). Ove studije ukazuju na potrebu optimalne gustine hidroksilnih grupa za postizanje adekvatne ćelijske adhezije. Takvi rezultati mogu biti objašnjenje za lošiju ćelijsku adheziju na kompozitnom materijalu pHAP+alginat u odnosu na pHAP+PLGA, pHAP+EVA/EVV, posebno kada se ima u vidu da alginat, za razliku od ostalih polimera, pored karboksilnih sadrži i hidroksilne grupe. Rezultati eksperimenta i karakterizacija ispitivanih materijala u ovom istraživanju su pokazali da se njihove površine odlikuju karakteristikama koje omogućavaju rast ćelija u direktnom kontaktu sa navedenim biomaterijalima i da su pogodne za adheziju i proliferaciju ćelija.

5.4. Step en osteoblastne diferencijacije procenjen bojenjem alizarin crvenim

Alizarin crveno se standardno upotrebljava kao indikator u biološkim istraživanjima jer boji slobodni kalcijum i neka jedinjenja kalcijuma u crvenu ili svetloljubičastu boju. Na taj način je moguće obojiti i detektovati i kalcijum u kostima i drugim tkivima. U skladu sa tim, ovo bojenje služi kao standardna kolorimetrijska metoda za kvantitativno određivanje kalcijumovih depozita prisutnih u ćelijama osteogenog porekla, na osnovu čega se određuje stepen mineralizacije koja prethodi formiranju ekstracelularnog matriksa zrele kosti.

Kao što je prikazano u rezultatima, nakon gajenja ćelija u osteogenom medijumu 3 nedelje, moglo se uočiti prisustvo obojenih kompleksa oko ćelija na svim ispitivanim biomaterijalima. Novodeponovani mineralizovani matriks je bio pokazatelj diferencijacije izolovanih mezenhimalnih ćelija u osteoblaste. S obzirom da i sam hidroksiapatit u sebi sadrži kalcijum, ćelije su gajene i u kontrolnom medijumu isti vremenski period kako bi bila uočljiva razlika između kalcijumovih depozita samog materijala i onih koji pripadaju ekstracelularnom matriksu osteoblasta. Bilo je jasno vidljivo da je količina kalcijumovih precipitata kod svih biomaterijala bila mnogo veća u osteogenom nego u kontrolnom medijumu, što ukazuje na diferencijaciju mezenhimalnih ćelija i stvaranje mineralizovanog matriksa. Poneki vidljivi obojeni precipitati u kontrolnom medijumu su bili pokazatelj prisustva kalcijuma u strukturi hidroksiapatita. Međutim, u kontrolnom medijumu u prisustvu svih biomaterijala

precipitati su bili u izvesnom stepenu uočljivi na mestima u bunarima gde su se nalazile samo ćelije. Ovo prisustvo mineralizacije u okolini ispitivanih biomaterijala u kontrolnom medijumu moglo bi ukazivati na izvestan osteoinduktivni efekat navedenih materijala. Takođe, kao kontrolni uzorak služile su ćelije gajene i u osteogenom i kontrolnom medijumu na polistirenu, bez prisustva biomaterijala. U uzorcima na polistirenu u kontrolnom medijumu rezultati su pokazali da nije bilo obojenih precipitata, a samim tim ni mineralizacije, dok je broj kalcijumovih depozita obojen na polistirenu u osteogenom medijumu bio značajno manji u odnosu na isti na ispitivanim materijalima. Ova jasno uočljiva razlika je pokazatelj osteokonduktivnog efekta korišćenih biomaterijala.

Mnogi autori su u svojim studijama koristili alizarin crveno kao indikator mineralizacije u svrhu analiza i poređenja osteogenih potencijala različitih tipova ćelija i materijala u različitim vremenskim periodima (161, 162, 175). U poređenju sa skafoldom na bazi kolagena tipa I gde su se minerali obojili nakon 8 nedelja inkubacije uzoraka, u prisustvu PLGA skafolda crveno obojeni minerali su bili vidljivi nakon 12 nedelja (176). Takođe, bojenjem ovom metodom pokazana je i odontoblastna i osteogena diferencijacija humanih mezenhimalnih ćelija zubne pulpe mlečnih inciziva i umnjaka (177). Očekivano, zbog veće sposobnosti diferencijacije, obojenih kalcijumovih depozita je bilo značajno više u prisustvu osteoblasta poreklom iz pluripotentnih matičnih ćelija zubne pulpe nego u osteoblastima poreklom iz mezenhimalnih ćelija zubne pulpe istog donora i kultivisanih na istim skafoldima (178). U studiji u kojoj su poređene karakteristike PLGA skafolda i PLGA skafolda obloženog apatitom, bojenjem alizarin crvenim kalcijumovi depoziti su jasno bili vidljivi na površini granula i u novoformiranoj kosti u prisustvu PLGA skafolda obloženog apatitom, dok su u prisustvu PLGA skafolda bili retki i jedva primetni (179). Takođe, Vakhrushev i sar. su koristeći alizarin crveno poredili sposobnost osteoblastne diferencijacije mezenhimalnih ćelija zubne pulpe mlečnih zuba i mezenhimalnih ćelija poreklom iz koštane srži. Nakon 8 dana kultivisanja u osteogenom medijumu, kod obe vrste ćelija bila su uočljiva područja sa visokom koncentracijom ćelija koje su za sebe vezale boju. Kasnije, gustina ćelija se povećala, a na osnovu intenzivnijeg bojenja nakon 15 dana kultivisanja moglo se zaključiti da su ćelije u tom području aktivno akumulirale kalcijumove soli. Nakon 22 dana kultivisanja, kod obe vrste ćelija bio je

vidljiv značajan broj područja sa osifikacijama koja su se odlikovala prisustvom ćelija sa tipičnom morfologijom osteoblasta i visokim sadržajem kalcijumovih soli u vakuolama. Pomenute ćelije su aktivno učestvovala u osteogenoj diferencijaciji. Na taj način autori su pokazali da SHED imaju osteogeni potencijal sličan osteogenom potencijalu mezenhimalnih ćelija poreklom iz koštane srži (180). U studiji gde su se poredile karakteristike kolagenog skafolda i kolagen-HAP kompozitnog skafolda u prisustvu humanih mezenhimalnih ćelija, uočeno je više kalcijumovih depozita u kompozitnom skafoldu bojenjem uzoraka gajenih 3 nedelje u osteogenom medijumu. Obojeni depoziti u kontrolnom medijumu nisu bili vidljivi ni kod jednog materijala. Ovakvi rezultati ukazali su na osteokonduktivan potencijal ispitivanih materijala i na odsustvo osteoinduktivnog potencijala (181). Odavno je dokazano da hidroksiapatit poseduje osteokonduktivni potencijal tj. da ima sposobnost da potpomogne adheziju i proliferaciju koštanih ćelija ali ne i sposobnost da pokrene matične ćelije da se diferenciraju u osteoblaste. Međutim, postoje neke *in vitro* i *in vivo* studije koje tvrde da je hidroksiapatit i osteoinduktivan. Lin i sar. demonstrirali su sposobnost pHAP da indukuje ekspresiju gena za alkalnu fosfatazu, osteokalcin i kolagen tipa I kod pluripotentnih matičnih ćelija miša (182). Takođe je pokazano da su diskovi hidroksiapatita osteoinduktivni nakon intramuskularnog implantiranja kod babuna (183). Brojne karakteristike, uključujući topografiju, površinu i površinsku energiju, strukturu kristala hidroksiapatita i drugih materijala su ključni u određivanju njihovih osteokonduktivnih i osteoinduktivnih potencijala (184). Prema rezultatima dobijenim u ovoj studiji, ispitivani skafoldi najverovatnije poseduju odgovarajuću kombinaciju pomenutih hemijskih svojstava i mikroarhitektonskog dizajna za postizanje određenog stepena osteoinduktivnosti. Dakle, verujemo da su obojeni kalcijumovi depoziti u prisustvu materijala bez osteogenog medijuma pokazatelj da su ispitivani biomaterijali veoma pogodni za regeneraciju kosti.

5.5. Određivanje stepena osteoblastne diferencijacije merenjem aktivnosti alkalne fosfataze

Alkalna fosfataza (ALP) je enzim odgovoran za defosforilaciju tj. uklanjanje fosfatnih grupa iz mnogih vrsta molekula uključujući nukleotide, proteine i alkaloide.

Kod ljudi, ALP je prisutna u svim tkivima ali je posebno koncentrisana u jetri i kostima. U koštanom tkivu, ALP je proizvod aktivnosti osteoblasta i oslobađa se u medijum tokom njihovog sazrevanja. Dakle povećan nivo ovog enzima ukazuje na postojanje aktivnog stvaranja kosti. Dodatno, aktivnost ALP je neophodna za hidrolizu β -glicerofosfata čime započinje proces mineralizacije. Iz navedenih razloga, aktivnost ALP predstavlja biohemijski marker za fenotipsku karakterizaciju osteoblasta, koštanu mineralizaciju i diferencijaciju.

Diferencijacija osteoblasta u *in vitro* i *in vivo* uslovima se može podeliti u 3 stadijuma: a) ćelijska proliferacija, b) sazrevanje matriksa, i c) mineralizacija matriksa (185). Sazrevanje i mineralizacija matriksa *in vitro* su najčešće pojačani dodavanjem određenih osteogenih faktora (186). Tokom proliferacije, u medijumu se može detektovati nekoliko proteina ECM: prokolagen I, TGF- β , fibronektin. Faza sazrevanja ECM se karakteriše maksimalnom ekspresijom ALP. Analiza markera specifičnih za ćelije kosti, poput ALP, osteokalcina i kolagena tipa I, se veoma često koristi za karakterizaciju osteoblasta *in vitro*. Proliferišući osteoblasti imaju izraženu aktivnost ALP koja je u velikoj meri povećana tokom stvaranja kosti, tako da je aktivnost ALP iz tog razloga pogodan marker za humane osteoblaste (186).

Da bi se odredio stepen osteoblastne diferencijacije, aktivnost ALP mezenhimalnih ćelija gajenih u osteogenom medijumu na ispitivanim 3D biomaterijalima je merena u dve vremenske tačke, nakon perioda inkubacije od 6 i 12 dana. Rezultati su pokazali da je nakon 6 dana inkubacije mezenhimalnih ćelija zubne pulpe na skafoldima, aktivnost ALP bila niska i da nije postojala razlika u aktivnosti alkalne fosfataze na ispitivanim materijalima u odnosu na Bio Oss. Ovi nalazi su bili očekivani jer je potrebno oko nedelju dana da bi započela faza sazrevanja ECM u kojoj se povećava aktivnost ALP. Zato je kao prva vremenska tačka odabrano 6 dana od zasejavanja, da bismo procenili aktivnost ALP pre nego što počne diferencijacija. Nakon perioda inkubacije od 12 dana u osteogenom medijumu, kod svih materijala je uočena značajno povećana aktivnost alkalne fosfataze, što ukazuje da je došlo do osteoblastne diferencijacije i sinteze matriksa. Kod svih ispitivanih 3D biomaterijala aktivnost ALP je bila veća u odnosu na aktivnost osteoblasta gajenih na Bio Oss-u. Ovakvi rezultati su bili pokazatelj da je više osteoblasta bilo prisutno na ispitivanim

materijalima u odnosu na broj osteoblasta na Bio Oss-u, što ukazuje da je stepen osteoblastne diferencijacije kod navedenih materijala bio veći nego na kontrolnom materijalu. Poredeći nivo aktivnosti ALP između materijala uočeno je da je najveći stepen aktivnosti, a samim tim i najbolja diferencijacija, bio kod pHAP+PLGA, zatim pHAP+alginat, pHAP, i na kraju pHAP+EVA/EVV. Ovo ispitivanje je pokazalo da svi ispitivani materijali obezbeđuju bolju sredinu za normalno funkcionisanje osteoblasta od Bio Oss-a, sa napomenom da se pHAP+PLGA i pHAP+alginat posebno u tome ističu.

Mnogi autori su takođe poredili aktivnost ALP na raznim materijalima i u različitim vremenskim tačkama (161, 187). Posmatrajući diferencijaciju mezenhimalnih ćelija u osteoblaste na kolagenom skafoldu morfologije saća, aktivnost ALP je bila u stalnom porastu od 14. do 28. dana. Razlika je u svim merenim vremenskim tačkama bila statistički značajna u odnosu na kontrolnu kulturu. Tri puta veća aktivnost ALP je izmerena 28. dana u odnosu na aktivnost 14. dana na osnovu čega se moglo zaključiti da se stopa diferencijacije mezenhimalnih ćelija povećavala sa povećanjem inkubacionog perioda, tako da možemo pretpostaviti da bi dalje produžavanje vremena inkubacije u našem eksperimentu takođe dovelo do daljeg rasta broja osteoblastnih ćelija. Povećana aktivnost ALP označavala je da ispitivani kolageni skafoldi obezbeđuju adekvatnu sredinu za optimalno funkcionisanje koštanih ćelija i da su pogodni za primenu u koštano-tkivnom inženjeringu (187). Eslaminejad i sar. su ispitivanjem aktivnosti ALP u prisustvu PLLA (polilaktična kiselina) skafolda i kompozitnog nano- i mikro-HAP/PLLA skafolda uvideli da je značajno veća aktivnost izmerena u prisustvu HAP/PLLA skafolda nano strukture. Na osnovu dobijenih rezultata, zaključeno je da nanostrukturni skafoldi obezbeđuju bolju mikrosredinu za osteogenu diferencijaciju mezenhimalnih ćelija (161). Objašnjenje za ovakav rezultat bi moglo biti u većoj površini u nanoskafoldima kojom se obezbeđuje veći prostor za diferencijaciju u poređenju sa mikroskafoldima, odnosno u sličnijoj strukturi sa prirodnom kosti u poređenju sa PLLA skafoldima.

Praćenjem osteogene diferencijacije ćelija periodontalnog ligamenta i mineralizacije matriksa u *in vitro* uslovima zabeležena je 4 puta veća aktivnost ALP nakon 3, odnosno 4 nedelje eksperimenta. Rezultat je takođe pokazao da je maksimalna aktivnost ALP u skladu sa stvaranjem mineralizovanih koštanih nodula nakon 3 nedelje

kultivisanja (188). Slične promene u aktivnosti ALP izmerili su i Aronow i sar. (189) i Bellows i sar. (190). Oni su pokazali da je ekspresija ALP osteoblasta poreklom iz lobanje fetusa pacova nakon 5 nedelja inkubacionog perioda bila u skladu sa akumulacijom kolagena i mineralizacijom (189). Ujedno, nađeno je da se aktivnost ALP naglo povećala neposredno pre mineralizacije a zatim postepeno smanjivala, iako se mineralizacija ćelija poreklom iz lobanje fetusa pacova nastavila. Ovim je pokazano da ALP igra ključnu ulogu tokom rane diferencijacije i mineralizacije ćelija sa fenotipom osteoblasta (190). Takođe, da bi se potvrdila proizvodnja funkcionalnih proteina, aktivnost ALP je merena nakon 4 i 7 dana inkubacionog perioda humanih mezenhimalnih ćelija na 3D kolagenom i PLGA skafoldu. Sami skafoldi, bez ćelija služili su kao negativne kontrole. U skladu sa povećanom genskom ekspresijom za ALP, u prisustvu PLGA skafolda izmerena je značajno veća aktivnost ALP nakon 7 dana inkubacije (176).

5.6. Analiza skening elektronske mikroskopije

Skening elektronska mikroskopija se već standardno koristi za monitoring i vizuelizaciju različitih morfoloških promena ispitivanih ćelija i materijala u biološkim eksperimentima (191-194). U ovoj studiji analizirane su ćelije i njihova interakcija sa ispitivanim materijalima nakon perioda inkubacije od 7, 14 i 21 dan u osteogenom medijumu, odnosno nakon 7 dana u kontrolnom medijumu. Na ovaj način mogle su se uočiti eventualne razlike u morfologiji ćelija i utvrditi prisustvo ECM, vanćelijskog matriksa koji je produkt osteoblasta, a samim tim i pokazatelj stepena osteogene diferencijacije izolovanih mezenhimalnih ćelija. Ćelije gajene u kontrolnom medijumu na svim materijalima bile su sferičnog oblika sa jasno vidljivim pseudopodijama, odnosno citoplazmatskim produžecima koji su ukazivali na dobru ćelijsku adheziju. Strukture organskog porekla nalik fibroznim mogle su se uočiti analizom SEM mikrografije nakon 7 dana gajenja ćelija u osteogenom medijumu na svim materijalima. Ove strukture su pokazatelj diferencijacije mezenhimalnih ćelija u osteoblaste i ukazuju na početak formiranja ECM. Analizom morfologije ćelija uočene su ćelije poligonalnog oblika sa veoma izduženim citoplazmatskim produžecima, karakterističnim za ćelije u procesu osteogene diferencijacije (192). Izražen i jasno vidljiv ECM nakon 14 dana inkubacionog perioda na svim materijalima u osteogenom medijumu bio je pokazatelj

prisustva većeg broja osteoblasta. Nakon 21 dan kultivisanja ćelija u osteogenom medijumu, ECM je bio dominantan na SEM mikrografijama kod svih ispitivanih biomaterijala prekrivajući i pore skafolda. Ovakva razvijena mreža ECM bila je dokaz izražene diferencijacije i veoma dobre biokompatibilnosti između ćelija i materijala, koja je neophodna za primenu u tkivnom inženjeringu (191).

Mnogi autori su takođe u svojim istraživanjima analizirali morfologiju i međusobni odnos materijala i ćelija SEM mikrografijom. U studiji Beckera i sar. ćelije poreklom iz humanog periosta formirale su sloj koji je prekrivao površine svih ispitivanih skafolda nakon 7 dana inkubacionog perioda. Prisutne ćelije bile su izduženog oblika sa brojnim pseudopodijama koje su ukazivale na dobru adheziju za materijal (193). SEM mikroskopijom analizirana je i ćelijska morfologija i adhezija mezenhimalnih ćelija gajenih 7 dana na PLLA i nano- i mikrostrukturnim kompozitima HAP/PLLA skafoldima. Ćelije su imale sferičan oblik a njihov broj je bio mnogo veći u prisustvu nano HAP/PLLA kompozitnog skafolda, što je ukazivalo na bolju biokompatibilnost tog materijala (195). Adhezija humanih mezenhimalnih ćelija i mineralne formacije na ispitivanim skafoldima nakon 4 i 8 dana inkubacije bile su prisutne na SEM mikrografijama u studiji Weira i Xu (192). Ćelije su, kao i u ovoj studiji, bile poligonalnog oblika, tipičnog za proces osteogene diferencijacije. Takođe, jasno je bio uočljiv proizvod ćelija u obliku loptastih mineralnih formacija i kolagenih snopova što je u skladu sa osteogenom diferencijacijom i mineralizacijom (194).

SEM analizom osteoblasta gajenih na Bio Oss-u, trikalcijum fosfatnom (TCP) i HAP skafoldu pokazana je dobra adhezija osteoblasta na TCP i HAP skafoldu, sa napomenom da je veći broj ćelija adheriran na HAP skafoldu (160). Za razliku od našeg istraživanja gde nije mogla da se uoči razlika u broju ćelija u prisustvu različitih materijala, u pomenutoj studiji zabeležen je znatno manji broj ćelija u prisustvu Bio Oss-a, što ponovo ukazuje da ispitivani 3D materijali imaju bolju biokompatibilnost i pogodniji su za zamenu kosti nego Bio Oss koji se inače koristi u te svrhe. Takođe, u saglasnosti sa prethodnim istraživanjem, poredeći adheziju i broj humanih osteoblasta gajenih 7 dana na Bio Oss-u i sintetskom zameniku kosti – Nano Bone-u, više ćelija sa razvijenijim citoplazmatskim produžecima je uočeno skening elektronskom mikroskopijom u prisustvu Nano Bone materijala (196). Rezultati SEM mikrografije humanih mezenhimalnih ćelija na trikalcijum fosfatnim skafoldima, pokazali su da se

nakon 7 dana inkubacionog perioda uočavaju ćelije izduženog oblika sa razvijenim pseudopodijama i adherirane za ispitivane skafolde. Nakon 21 dan gajenja ćelija, jasno je bio vidljiv novosintetisan ECM koji je prekrivao i pore skafolda čime je takođe pokazana dobra biokompatibilnost između ćelija i materijala (191). Ovi rezultati su slični rezultatima dobijenim u našoj studiji, i može se zaključiti da postoji veći broj skafolda koji pokazuju dobru biokompatibilnost i mogu da zamene materijale koji se trenutno koriste u tkivnom inženjeringu.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata karakterizacije izolovanih ćelija iz zubne pulpe, sinteze i ispitivanja citotoksičnosti sintetisanih biomaterijala i uporednog ispitivanja poroznog hidroksiapatita, poroznog hidroksiapatita u kombinaciji sa poli laktidkoglolikolnom kiselinom, alginatom i polimerom etilenvinilacetat / etilenvinilversat at može se zaključiti sledeće:

1. Karakterizacijom izolovanih ćelija iz zubne pulpe mlečnih zuba u fiziološkoj smeni metodom protočne citometrije i diferencijacijom ovih ćelija u tri različita tipa ćelija – adipocite, hondrocite i osteoblaste, pokazano je da su izolovane multipotentne mezenhimalne ćelije zubne pulpe.

2. Od svih sintetisanih biomaterijala jedino je u prisustvu pHAP-a inkubiranog u hranljivoj podlozi 7 dana u razblaženju 1:1 zabeležena slaba citotoksičnost, ali ni jedan od ispitivanih materijala nije doveo do kompletnog citotoksičnog efekta na izolovane mezenhimalne ćelije zubne pulpe.

3. Rezultati karakterizacije ispitivanih materijala pokazuju da su skafoldi bili adekvatno dizajnirani i da su imali odgovarajuću morfologiju površine koja je neophodna za ćelijske nosače. Površine pHAP, pHAP sa PLGA, pHAP sa alginatom i pHAP sa EVA/EVV pogodne su za adheziju ćelija i njihovu proliferaciju i odlikuju se karakteristikama koje omogućavaju rast ćelija.

4. Obojeni kompleksi u prisustvu osteogenog medijuma kod svih materijala nakon bojenja alizarin crvenim ukazuju na novodeponovani mineralizovani matriks i pokazatelj su diferencijacije izolovanih ćelija u osteoblaste na 3D biomaterijalima. Pojava matriksa i u kontrolnom medijumu ukazuje da su skafoldi sami po sebi osteoinduktivni.

5. Nakon perioda inkubacije od 12 dana u osteogenom medijumu, kod ćelija inkubiranih na svim ispitivanim materijalima uočena je povećana aktivnost alkalne fosfataze u odnosu na aktivnost alkalne fosfataze ćelija u prisustvu Bio Oss-a, posebno kod pHAP sa PLGA. Ovakvi rezultati ukazuju da je broj osteoblasta u prisustvu svih

ispitivanih materijala veći u poređenju sa Bio Oss-om, odnosno na bolju osteogenu diferencijaciju u prisustvu skafolda.

6. Nakon inkubacionog perioda od 3 nedelje u osteogenom medijumu, u prisustvu svih materijala, ekstracelularni matriks je bio dominantan na SEM mikrografijama, prekrivajući i pore skafolda. Ovakva razvijena mreža ECM dokaz je izražene diferencijacije mezenhimalnih ćelija u osteoblaste u prisustvu skafolda i veoma dobre biokompatibilnosti između ćelija i materijala.

7. Svi materijali, na osnovu ovog istraživanja, su se pokazali jednakim, a po mnogim parametrima i boljim od primenjivanog zlatnog standarda Bio Oss-a. Oni u daljim eksperimentima mogu da posluže kao osnova za dobijanje ćelijskog nosača u koštanom tkivnom inženjerstvu i da omoguće vezivanje osteoblasta ili prekursora osteoblasta, njihov rast i diferencijaciju. Sudeći po dobijenim rezultatima, najveći potencijal od ispitivanih materijala ima skafold pHAP sa PLGA.

7. LITERATURA

1. Karadzov O, Kezele D, Kuburovic D, Markovic D. Preparacija kaviteta. Beograd: Akademska misao; 2001.
2. Bernick S, Nedelman C. Effect of aging on the human pulp. *Journal of endodontics*. 1975 Mar;1(3):88-94.
3. Marković D. Stomatološki leksikon. Beograd: Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu; 2009.
4. Todorović V, Nikolić I, Glibetić M, Balint B. Humane embrionalne matične ćelije – dosadašnja saznanja. *Anestezija reanimacija transfuzija*. 2006;34:109-28.
5. Todorović V, Nikolić I. Stem ćelije, kloniranje sisara. U: Nikolić I, urednik. *Embriologija čoveka, tekst i atlas (treća izdanje)*. Beograd: Data Status; 2007. p. 45-70.
6. Todorović V, Nikolić I, Glibetić M, Balint B. Humane embrionalne stem ćelije–izdvajanje, karakterizacija i diferencijacija. U: Todorović V, Drndarević N, urednici. *Naučni skup Izabrane aktuelne teme iz medicine i stomatologije 1 međunarodna specijalizovana izložba medicinskih i stomatoloških sredstava, InterMedica&Dental 10-12.maj 2007; Beograd2007*. p. 5-8.
7. Singec I, Jandial R, Crain A, Nikkhah G, Snyder EY. The leading edge of stem cell therapeutics. *Annual review of medicine*. 2007;58:313-28.
8. Malanchi I, Peinado H, Kassen D, Hussenet T, Metzger D, Chambon P, et al. Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature*. 2008 Apr 3;452(7187):650-3.
9. Brasanac D, Boricic I, Todorovic V, Tomanovic N, Radojevic S. Cyclin A and beta-catenin expression in actinic keratosis, Bowen's disease and invasive squamous cell carcinoma of the skin. *Br J Dermatol*. 2005 Dec;153(6):1166-75.
10. Vats A, Bielby RC, Tolley NS, Nerem R, Polak JM. Stem cells. *Lancet*. 2005 Aug 13-19;366(9485):592-602.
11. Friedenstein A, Kuralesova AI. Osteogenic precursor cells of bone marrow in radiation chimeras. *Transplantation*. 1971 Aug;12(2):99-108.
12. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
13. Tomita M, Mori T, Maruyama K, Zahir T, Ward M, Umezawa A, et al. A comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells. *Stem Cells*. 2006 Oct;24(10):2270-8.
14. Mezey E, Key S, Vogelsang G, Szalayova I, Lange GD, Crain B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003 Feb 4;100(3):1364-9.
15. Huttmann A, Li CL, Duhrsen U. Bone marrow-derived stem cells and "plasticity". *Annals of hematology*. 2003 Oct;82(10):599-604.
16. Sloan AJ, Smith AJ. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral diseases*. 2007 Mar;13(2):151-7.
17. Maria OM, Khosravi R, Mezey E, Tran SD. Cells from bone marrow that evolve into oral tissues and their clinical applications. *Oral diseases*. 2007 Jan;13(1):11-6.
18. Song AM, Shu R, Xie YF, Song ZC, Li HY, Liu XF, et al. A study of enamel matrix proteins on differentiation of porcine bone marrow stromal cells into cementoblasts. *Cell proliferation*. 2007 Jun;40(3):381-96.

19. Yamada Y, Ueda M, Hibi H, Baba S. A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology: A clinical case report. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 2006 Aug;26(4):363-9.
20. Morszeck C, Schmalz G, Reichert TE, Vollner F, Galler K, Driemel O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Investig*. 2008 Jun;12(2):113-8.
21. Stanislawski L, Carreau JP, Pouchelet M, Chen ZH, Goldberg M. In vitro culture of human dental pulp cells: some aspects of cells emerging early from the explant. *Clin Oral Investig*. 1997 Sep;1(3):131-40.
22. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000 Dec 5;97(25):13625-30.
23. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002 Jul 4;418(6893):41-9.
24. Perry BC, Zhou D, Wu X, Yang FC, Byers MA, Chu TM, 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 Jun;14(2):149-56.
25. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*. 2003 Apr;18(4):696-704.
26. Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone*. 2001 Dec;29(6):532-9.
27. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *Journal of dental research*. 2002 August 1, 2002;81(8):531-5.
28. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003 May 13;100(10):5807-12.
29. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs*. 2006;184(3-4):105-16.
30. Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev*. 2008 Spring;4(1):21-6.
31. Markovic D, Milenkovic A, Koliakos G, Kostidou E, Karadzic I, Debeljak Martacic J, et al. Potential preservation of dental pulp stem cells. *Balk J Stom*. 2010;14(1):4-7.
32. Asti A, Gastaldi G, Dorati R, Saino E, Conti B, Visai L, et al. Stem Cells Grown in Osteogenic Medium on PLGA, PLGA/HA, and Titanium Scaffolds for Surgical Applications. *Bioinorg Chem Appl*. 2010:831031.
33. Zhang W, Walboomers XF, van Kuppevelt TH, Daamen WF, Bian Z, Jansen JA. The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. *Biomaterials*. 2006 Nov;27(33):5658-68.
34. de Mendonça Costa A, Bueno D, Martins M, Kerkis I, Kerkis A, Fanganiello R, et al. Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. *J Craniofac Surg*. 2008 Jan;19(1):204-10.

35. Stevens A, Zuliani T, Olejnik C, LeRoy H, Obriot H, Kerr-Conte J, et al. Human dental pulp stem cells differentiate into neural crest-derived melanocytes and have label-retaining and sphere-forming abilities. *Stem Cells Dev.* 2008 Dec;17(6):1175-84.
36. Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar S, Gronthos S. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells.* 2008 Jul;26(7):1787-95.
37. d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, et al. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ.* 2007 Jun;14(6):1162-71.
38. Papaccio G, Graziano A, d'Aquino R, Graziano MF, Pirozzi G, Menditti D, et al. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *J Cell Physiol.* 2006;208:319-25.
39. Zhang W, Walboomers XF, Van Kuppevelt TH, Daamen WF, Van Damme PA, Bian Z, et al. In vivo evaluation of human dental pulp stem cells differentiated towards multiple lineages. *J Tissue Eng Regen Med.* 2008 Mar-Apr;2(2-3):117-25.
40. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *Journal of dental research.* 2003 Dec;82(12):976-81.
41. About I, Bottero MJ, de Denato P, Camps J, Franquin JC, Mitsiadis TA. Human dentin production in vitro. *Experimental cell research.* 2000 Jul 10;258(1):33-41.
42. Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials.* 2001 Oct;22(19):2581-93.
43. Hill PA. Bone remodelling. *British journal of orthodontics.* 1998 May;25(2):101-7.
44. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromolecular bioscience.* 2004 Aug 9;4(8):743-65.
45. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN.* 2008 Nov;3 Suppl 3:S131-9.
46. Martini F, editor. *Anatomy and physiology*: Pearson Education, Inc.; 2007.
47. Recker RR. Embriology aamobICF, Favus MJ, eds. *Disorder of Bone and Mineral Metabolism.* New York, NY: Raven Press; 1992: 219-240. Embriology, anatomy and microstructure of bone. In: Coe FL FM, editor. *Disorder of Bone and Mineral Metabolism.* New York: Raven Press; 1992. p. 219-40.
48. Prolo DJ. Biology of bone fusion. *Clin Neurosurg.* 1990;36:135-46.
49. Hart DJ, Dickman CA. Biology of sinal fusion. In: Bambakidis NC DC, Spetzler RF, Sonntag VKH, editor. *Surgery of the Craniovertebral Junction.* 2nd ed: Thieme Medical Publishers, Inc.; 2012.
50. Urist MR. Bone transplants and implants. In: Urist MR, editor. *Fundamentals and Clinical Bone Physiology.* Philadelphia, PA: JB Lipincott; 1980. p. 331-68.
51. Urist MR, Dawson E. Intertransverse process fusion with the aid of chemosterilized autolyzed antigen-extracted allogenic (AAA) bone. *Clin Orthop Relat Res.* 1981;154:97-113.
52. Urist MR, Mikulski A, Lietze A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1979;76(4):1828-32.

53. Hayes WC. Biomechanics of cortical and trabecular bone: implications for assessment of fracture risk. In: Mow VC, Hayes WC, editors. *Basic Orthopedic Biomechanics*. New York: Raven Press; 1991. p. 93-142.
54. White AA, Panjabi MM. *Clinical Biomechanics of the Spine*. Philadelphia: JB Lipincott; 1990.
55. Chalmers J, Gray DH, Rush J. Observations on the induction of bone in soft tissues. *J Bone Joint Surg Br*. 1975;57(1):36-45.
56. Muschler GF, Lane JM, Dawson EG. The biology of spinal fusion. In: Cotler JM CH, editor. *Spinal Fusion Science and Technique*. Berlin: Springer-Verlag; 1990. p. 9-21.
57. Copehaver WM Kelly DE, Wood RL. The connective tissues: cartilage and bone. In: Copehaver WM, Kelly DE, Wood RL, editors. *Bailey's textbook of Histology*. Baltimore: Wiliams & Wilkins; 1978. p. 170-205.
58. Robey PG, Boskey AL. The composition of bone. In: Rosen CJ, editor. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. Washington DC: American Society for bone and mineral research; 2008. p. 32-7.
59. Caetano-Lopes J, Canhao H, Fonseca JE. Osteoblasts and bone formation. *Acta reumatologica portuguesa*. 2007 Apr-Jun;32(2):103-10.
60. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2006 Jan;235(1):176-90.
61. Franceschi RT, Li Y. Vitamin D. In: Feldman D, Pike JW, Adams JS, editors. *Vitamin D*. 3rd ed 2011.
62. Skjodt H, Gallagher JA, Beresford JN, Couch M, Poser JW, Russell RG. Vitamin D metabolites regulate osteocalcin synthesis and proliferation of human bone cells in vitro. *The Journal of endocrinology*. 1985 Jun;105(3):391-6.
63. Bala Y, Farlay D, Delmas PD, Meunier PJ, Boivin G. Time sequence of secondary mineralization and microhardness in cortical and cancellous bone from ewes. *Bone*. 2010 Apr;46(4):1204-12.
64. Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone. *Journal of cellular biochemistry*. 1994 Jul;55(3):287-99.
65. Vaananen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. *Journal of cell science*. 2000 Feb;113 (Pt 3):377-81.
66. Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *The Journal of clinical investigation*. 2005 Feb;115(2):282-90.
67. Kim SS, Sun Park M, Jeon O, Yong Choi C, Kim BS. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006 Mar;27(8):1399-409.
68. Rizzi SC, Heath DJ, Coombes AG, Bock N, Textor M, Downes S. Biodegradable polymer/hydroxyapatite composites: surface analysis and initial attachment of human osteoblasts. *J Biomed Mater Res*. 2001 Jun;55(4):475-86.
69. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005 Nov;36 Suppl 3:S20-7.
70. Reddi AH. BMPs: from bone morphogenetic proteins to body morphogenetic proteins. *Cytokine & growth factor reviews*. 2005 Jun;16(3):249-50.
71. Calasans-Maia MD, Ascoli FO, Novellino ATN, Rossi AM, Granjeiro JM. Comparative histological evaluation of tibial bone repair in rabbits treated with xenografts. *Acta Ortop Bras*. 2009 [online].17(6):340-3.

72. Miao X, Tan DM, Li J, Xiao Y, Crawford R. Mechanical and biological properties of hydroxyapatite/tricalcium phosphate scaffolds coated with poly(lactic-co-glycolic acid). *Acta Biomater.* 2008 May;4(3):638-45.
73. Sittisak H, Vinai P. Tissue engineering for bone regeneration: stem cells and growth factors in biomaterial scaffolds. *Asian Biomedicine.* [review]. 2007 october 2007;1(3):229-38.
74. Meinel L, Karageorgiou V, Fajardo R, Snyder B, Shinde-Patil V, Zichner L, et al. Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow. *Annals of biomedical engineering.* 2004 Jan;32(1):112-22.
75. Heng BC, Cao T, Stanton LW, Robson P, Olsen B. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. *J Bone Miner Res.* 2004 Sep;19(9):1379-94.
76. Banerjee C, Javed A, Choi JY, Green J, Rosen V, van Wijnen AJ, et al. Differential regulation of the two principal Runx2/Cbfa1 n-terminal isoforms in response to bone morphogenetic protein-2 during development of the osteoblast phenotype. *Endocrinology.* 2001 Sep;142(9):4026-39.
77. Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005 Jun;16(3):251-63.
78. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* 1997 May 30;89(5):747-54.
79. Malaval L, Liu F, Roche P, Aubin JE. Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. *J Cell Biochem.* 1999 Sep 15;74(4):616-27.
80. Rossert J, de Crombrughe B. Type I collagen: Structure, synthesis and regulation. In: Bilezikian J, Raisz L, Rodan G, editors. *Principles of Bone Biology*, San Diego: Academic Press; 2002. p. 189-209.
81. Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(3):279-303.
82. Viereck V, Siggelkow H, Tauber S, Raddatz D, Schutze N, Hufner M. Differential regulation of Cbfa1/Runx2 and osteocalcin gene expression by vitamin-D3, dexamethasone, and local growth factors in primary human osteoblasts. *J Cell Biochem.* 2002;86(2):348-56.
83. Nagata T, Bellows CG, Kasugai S, Butler WT, Sodek J. Biosynthesis of bone proteins [SPP-1 (secreted phosphoprotein-1, osteopontin), BSP (bone sialoprotein) and SPARC (osteonectin)] in association with mineralized-tissue formation by fetal-rat calvarial cells in culture. *Biochem J.* 1991 Mar 1;274 (Pt 2):513-20.
84. Zhou HY, Takita H, Fujisawa R, Mizuno M, Kuboki Y. Stimulation by bone sialoprotein of calcification in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Calcif Tissue Int.* 1995 May;56(5):403-7.
85. Zhu JX, Sasano Y, Takahashi I, Mizoguchi I, Kagayama M. Temporal and spatial gene expression of major bone extracellular matrix molecules during embryonic mandibular osteogenesis in rats. *Histochem J.* 2001 Jan;33(1):25-35.
86. Tenenbaum HC, Heersche JN. Differentiation of osteoblasts and formation of mineralized bone in vitro. *Calcif Tissue Int.* 1982 Jan;34(1):76-9.
87. Chang YL, Stanford CM, Keller JC. Calcium and phosphate supplementation promotes bone cell mineralization: implications for hydroxyapatite (HA)-enhanced bone formation. *J Biomed Mater Res.* 2000 Nov;52(2):270-8.

88. Togari A, Arakawa S, Arai M, Matsumoto S. Inhibition of in vitro mineralization in osteoblastic cells and in mouse tooth germ by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem Pharmacol.* 1993 Nov 2;46(9):1668-70.
89. Sugawara Y, Suzuki K, Koshikawa M, Ando M, Iida J. Necessity of enzymatic activity of alkaline phosphatase for mineralization of osteoblastic cells. *Jpn J Pharmacol.* 2002 Mar;88(3):262-9.
90. Liu X, Ma PX. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Annals of biomedical engineering.* 2004 Mar;32(3):477-86.
91. Neuss S, Apel C, Buttler P, Denecke B, Dhanasingh A, Ding X, et al. Assessment of stem cell/biomaterial combinations for stem cell-based tissue engineering. *Biomaterials.* 2008 Jan;29(3):302-13.
92. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993 May 14;260(5110):920-6.
93. Yamazaki H, Tsuneto M, Yoshino M, Yamamura K, Hayashi S. Potential of dental mesenchymal cells in developing teeth. *Stem Cells.* 2007 Jan;25(1):78-87.
94. Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng.* 2006 Oct;12(10):2813-23.
95. Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells.* 2008 Jul;26(7):1787-95.
96. Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res.* 2005 Aug;20(8):1394-402.
97. Yang X, Walboomers XF, van den Beucken JJ, Bian Z, Fan M, Jansen JA. Hard tissue formation of STRO-1-selected rat dental pulp stem cells in vivo. *Tissue Eng Part A.* 2009 Feb;15(2):367-75.
98. El-Backly RM, Massoud AG, El-Badry AM, Sherif RA, Marei MK. Regeneration of dentine/pulp-like tissue using a dental pulp stem cell/poly(lactic-co-glycolic) acid scaffold construct in New Zealand white rabbits. *Aust Endod J.* 2008 Aug;34(2):52-67.
99. Huang S, Ingber DE. The structural and mechanical complexity of cell-growth control. *Nature cell biology.* 1999 Sep;1(5):E131-8.
100. Wang C, Meng G, Zhang L, Xiong Z, Liu J. Physical properties and biocompatibility of a core-sheath structure composite scaffold for bone tissue engineering in vitro. *Journal of biomedicine & biotechnology.* 2012;2012:579141.
101. Stevens MM. Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today.* 2008;11(5):18-25.
102. Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science.* 2002 Feb 8;295(5557):1014-7.
103. Jokanovic V, Nikcevic I, Dacic B, Uskokovic D. Synthesis of nanostructured carbonated calcium hydroxyapatite. *J Ceramic Processing Research* 2004;2:157-62.
104. Tsigkou O, Hench LL, Boccaccini AR, Polak JM, Stevens MM. Enhanced differentiation and mineralization of human fetal osteoblasts on PDLA containing Bioglass composite films in the absence of osteogenic supplements. *J Biomed Mater Res A.* 2007 Mar 15;80(4):837-51.
105. Wang M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials.* 2003 Jun;24(13):2133-51.

106. Ginty PJ, Howard D, Rose FR, Whitaker MJ, Barry JJ, Tighe P, et al. Mammalian cell survival and processing in supercritical CO₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006 May 9;103(19):7426-31.
107. Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature materials*. 2005 Jul;4(7):518-24.
108. Yeong WY, Chua CK, Leong KF, Chandrasekaran M. Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. *Trends in biotechnology*. 2004 Dec;22(12):643-52.
109. Anderson DG, Levenberg S, Langer R. Nanoliter-scale synthesis of arrayed biomaterials and application to human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*. 2004 Jul;22(7):863-6.
110. Cushing MC, Anseth KS. Materials science. Hydrogel cell cultures. *Science*. 2007 May 25;316(5828):1133-4.
111. Tsang VL, Bhatia SN. Three-dimensional tissue fabrication. *Advanced drug delivery reviews*. 2004 Sep 22;56(11):1635-47.
112. Liao SS CF, Zhu Y. Osteoblasts adherence and migration through three-dimensional porous mineralized collagen based composite: nHAC/PLA. *J Bioact Compat Polym*. 19:117-30.
113. Lickorish D, Guan L, Davies JE. A three-phase, fully resorbable, polyester/calcium phosphate scaffold for bone tissue engineering: Evolution of scaffold design. *Biomaterials*. 2007 Mar;28(8):1495-502.
114. Khan YM, Katti DS, Laurencin CT. Novel polymer-synthesized ceramic composite-based system for bone repair: an in vitro evaluation. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Jun 15;69(4):728-37.
115. Ngiam M, Liao S, Patil AJ, Cheng Z, Chan CK, Ramakrishna S. The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering. *Bone*. 2009 Jul;45(1):4-16.
116. Jokanovic V. *Nanomedicina - najveci izazov 21. veka*. Beograd: Data Status; 2012.
117. Pereira MM, Jones JR, Orefice RL, Hench LL. Preparation of bioactive glass-polyvinyl alcohol hybrid foams by the sol-gel method. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2005 Nov;16(11):1045-50.
118. Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am*. 2004 Jul;86-A(7):1541-58.
119. Pettinicchio M, Traini T, Murmura G, Caputi S, Degidi M, Mangano C, et al. Histologic and histomorphometric results of three bone graft substitutes after sinus augmentation in humans. *Clin Oral Investig*. 2010 Nov 3.
120. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
121. Brunauer S, Emmett PH, Teller E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society*. 1938 1938/02/01;60(2):309-19.
122. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

123. Ohno M, Abe T. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *J Immunol Methods*. 1991 Dec 15;145(1-2):199-203.
124. Huang GT, Shagramanova K, Chan SW. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. *Journal of endodontics*. 2006 Nov;32(11):1066-73.
125. Laino G, Carinci F, Graziano A, d'Aquino R, Lanza V, De Rosa A, et al. In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. *J Craniofac Surg*. 2006 May;17(3):511-5.
126. Couble ML, Farges JC, Bleicher F, Perrat-Mabillon B, Boudeulle M, Magloire H. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcif Tissue Int*. 2000 Feb;66(2):129-38.
127. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation*. 2005 Sep 27;80(6):836-42.
128. Souza LMD, Bittar JD, Silva ICRd, Toledo OAd, Bírigo MDM, Poças-Fonseca MJ. Comparative isolation protocols and characterization of stem cells from human primary and permanent teeth pulp. *Brazilian Journal of Oral Sciences*. 2010;9:427-33.
129. Huang AH, Chen YK, Lin LM, Shieh TY, Chan AW. Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. *J Oral Pathol Med*. 2008 Oct;37(9):571-4.
130. Morszeck C, Vollner F, Saugspier M, Brandl C, Reichert TE, Driemel O, et al. Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation in vitro. *Clin Oral Investig*. 2010 Aug;14(4):433-40.
131. Pivoriunas A, Surovas A, Borutinskaite V, Matuzevicius D, Treigyte G, Savickiene J, et al. Proteomic analysis of stromal cells derived from the dental pulp of human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cells Dev*. 2010 Jul;19(7):1081-93.
132. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res*. 2005 Aug;8(3):191-9.
133. Wang J, Wang X, Sun Z, Yang H, Shi S, Wang S. Stem cells from human-exfoliated deciduous teeth can differentiate into dopaminergic neuron-like cells. *Stem Cells Dev*. 2010 Sep;19(9):1375-83.
134. Nikolic N, Krstic A, Trivanovic D, Mojsilovic S, Kocic J, Santibanez JF, Jovcic G, Bugarski D. Mesenchymal stem cell properties of dental pulp cells from deciduous teeth. *Archives of Biological Sciences*. 2011;63(4):933-42.
135. Tuli R, Tuli S, Nandi S, Wang ML, Alexander PG, Haleem-Smith H, et al. Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. *Stem Cells*. 2003;21(6):681-93.
136. Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, Sugito T, Ito K, Ueda M. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. *Journal of endodontics*. 2009 Nov;35(11):1536-42.
137. Arora V, Arora P, Munshi AK. Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): saving for the future. *J Clin Pediatr Dent*. 2009 Summer;33(4):289-94.

138. Hutmacher DW, Schantz JT, Lam CX, Tan KC, Lim TC. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007 Jul-Aug;1(4):245-60.
139. Chan KS, Liang W, Francis WL, Nicoletta DP. A multiscale modeling approach to scaffold design and property prediction. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2010 Nov;3(8):584-93.
140. Kamitakahara M, Ohtsuki C, Miyazaki T. Review paper: behavior of ceramic biomaterials derived from tricalcium phosphate in physiological condition. *J Biomater Appl*. 2008 Nov;23(3):197-212.
141. Vasilescu C, Calderon Moreno J, Cimpean A, Cojocaru D, Cinca I, Andronescu E, et al. Synthesis, mechanical and structural properties and biological activity of some nanostructured bone scaffolds. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 2011;6(2):523-34.
142. Nakayama H, Kawase T, Kogami H, Okuda K, Inoue H, Oda T, et al. Evaluation by bone scintigraphy of osteogenic activity of commercial bioceramics (porous beta-TCP and HAP particles) subcutaneously implanted in rats. *J Biomater Appl*. 2010 May;24(8):751-68.
143. Douglas T, Pamula E, Hauk D, Wiltfang J, Sivananthan S, Sherry E, et al. Porous polymer/hydroxyapatite scaffolds: characterization and biocompatibility investigations. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2009 Sep;20(9):1909-15.
144. Hofmann I, Müller L, Greil P, Müller F. Calcium phosphate nucleation on cellulose fabrics. *Surf Coat Techn*. 2006;201:2392-8.
145. Jokanović V, Marković D. Biološki nosači-skafoldi, osnov tkivnog inženjerstva u stomatologiji. In: Stamenković D, editor. *Stomatološki materijali, knjiga 2*. Beograd: Stomatološki fakultet u Beogradu; 2012. p. 429-54.
146. Colovic B, Jokanovic V, Markovic-Todorovic B, Markovic Z. AFM investigations of calcium hydroxyapatite thin films on the surface of thin silica films. *Journal of optoelectronics and advanced materials*. 2009;11(1):70-5.
147. Nge TT, Sugiyama J. Surface functional group dependent apatite formation on bacterial cellulose microfibrils network in a simulated body fluid. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Apr;81(1):124-34.
148. Hashizume M, Horii H, Kikuchi J, Kamitakahara M, Ohtsuki C, Tanihara M. Effects of surface carboxylic acid groups of cerasomes, morphologically stable vesicles having a silica surface, on biomimetic deposition of hydroxyapatite in body fluid conditions. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2010 Jan;21(1):11-9.
149. Tampieri A, Sandri M, Landi E, Celotti G, Roveri N, Mattioli-Belmonte M, et al. HA/alginate hybrid composites prepared through bio-inspired nucleation. *Acta Biomater*. 2005 May;1(3):343-51.
150. Lee M, Li W, Siu RK, Whang J, Zhang X, Soo C, et al. Biomimetic apatite-coated alginate/chitosan microparticles as osteogenic protein carriers. *Biomaterials*. 2009 Oct;30(30):6094-101.
151. Zhang R, Ma PX. Biomimetic polymer/apatite composite scaffolds for mineralized tissue engineering. *Macromolecular bioscience*. 2004 Feb 20;4(2):100-11.
152. Qu X, Cui W, Yang F, Min C, Shen H, Bei J, et al. The effect of oxygen plasma pretreatment and incubation in modified simulated body fluids on the formation of bone-like apatite on poly(lactide-co-glycolide) (70/30). *Biomaterials*. 2007 Jan;28(1):9-18.

153. Jokanović V, Čolović B, Marković Z. Coupling agents and biomimetic methods of calcium hydroxyapatites design as basic elements of the hierarchically structured bone scaffold. *Stomatološki glasnik Srbije*. 2009;56(3):130-5.
154. Armentano I, Dottori M, Fortunati E, Mattioli S, Kenny J. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. *Polymer degradation and stability*. 2010;95(11):2126-46.
155. Marković D. Ispitivanje biokompatibilnosti svetlosno polimerizujućih glas jonomer cemenata (disertacija). Beograd: Univerzitet u Beogradu; 1998.
156. Marques AP, Reis RL, Hunt JA. The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: in vitro studies. *Biomaterials*. 2002 Mar;23(6):1471-8.
157. Xue D, Zheng Q, Zong C, Li Q, Li H, Qian S, et al. Osteochondral repair using porous poly(lactide-co-glycolide)/nano-hydroxyapatite hybrid scaffolds with undifferentiated mesenchymal stem cells in a rat model. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Jul;94(1):259-70.
158. Zhuang H, Zheng JP, Gao H, De Yao K. In vitro biodegradation and biocompatibility of gelatin/montmorillonite-chitosan intercalated nanocomposite. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2007 May;18(5):951-7.
159. Dararutana B, Honsawek S, Damrongsakkul S. Characterization of thai silk fibroin/gelatin based scaffolds incorporated with hydroxiapatite and β -tricalcium phosphate. The 3rd biomedical engineering international conference (BMEICON 2010); Japan: Kyoto University; 2012. p. 21-5.
160. Warnke PH, Seitz H, Warnke F, Becker ST, Sivananthan S, Sherry E, et al. Ceramic scaffolds produced by computer-assisted 3D printing and sintering: characterization and biocompatibility investigations. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010 Apr;93(1):212-7.
161. Eslaminejad M, Bagheri F, Zandi M, Nejati E, Zomorodian E. Study of Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Bone Differentiation on Composite Scaffolds of PLLA and Nano Hydroxyapatite with Different Morphologies. *Cell Journal(Yakhteh)*. 2011;12(4):469-76.
162. Mittal A, Negi P, Garkhal K, Verma S, Kumar N. Integration of porosity and bio-functionalization to form a 3D scaffold: cell culture studies and in vitro degradation. *Biomed Mater*. 2010 Aug;5(4):045001.
163. Nikolić N. Odnos biološke aktivnosti i strukturnog dizajna hidroksiapatitnih ćelijskih nosača (magistarska teza). Beograd: Univerzitet u Beogradu; 2009.
164. Ito Y, Imanishi Y, Sisido M. Attachment and proliferation of fibroblast cells on polyetherurethane urea derivatives. *Biomaterials*. 1987 Nov;8(6):464-72.
165. Allen M, Millett P, Dawes E, Rushton N. Lactate dehydrogenase activity as a rapid and sensitive test for the quantification of cell numbers in vitro. *Clin Mater*. 1994;16(4):189-94.
166. Wroblewski F, Ladue JS. Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1955 Oct;90(1):210-3.
167. van Wachem PB, Beugeling T, Feijen J, Bantjes A, Detmers JP, van Aken WG. Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities. *Biomaterials*. 1985 Nov;6(6):403-8.
168. van Kooten TG, Schakenraad JM, van der Mei HC, Busscher HJ. Influence of substratum wettability on the strength of adhesion of human fibroblasts. *Biomaterials*. 1992;13(13):897-904.

169. Hattori S, Andrade JD, Hibbs Jr JB, Gregonis DE, King RN. Fibroblast cell proliferation on charged hydroxyethyl methacrylate copolymers. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1985;104(1):72-8.
170. van der Valk P, van Pelt AW, Busscher HJ, de Jong HP, Wildevuur CR, Arends J. Interaction of fibroblasts and polymer surfaces: relationship between surface free energy and fibroblast spreading. *J Biomed Mater Res*. 1983 Sep;17(5):807-17.
171. Rich A, Harris AK. Anomalous preferences of cultured macrophages for hydrophobic and roughened substrata. *Journal of cell science*. 1981 Aug;50:1-7.
172. Curtis AS, Forrester JV, McInnes C, Lawrie F. Adhesion of cells to polystyrene surfaces. *J Cell Biol*. 1983 Nov;97(5 Pt 1):1500-6.
173. Ertel SI, Ratner BD, Horbett TA. Radiofrequency plasma deposition of oxygen-containing films on polystyrene and poly(ethylene terephthalate) substrates improves endothelial cell growth. *J Biomed Mater Res*. 1990 Dec;24(12):1637-59.
174. Horbett TA, Waldburger JJ, Ratner BD, Hoffman AS. Cell adhesion to a series of hydrophilic-hydrophobic copolymers studied with a spinning disc apparatus. *J Biomed Mater Res*. 1988 May;22(5):383-404.
175. Chen B, Sun HH, Wang HG, Kong H, Chen FM, Yu Q. The effects of human platelet lysate on dental pulp stem cells derived from impacted human third molars. *Biomaterials*. 2012 Jul;33(20):5023-35.
176. Kruger EA, Im DD, Bischoff DS, Pereira CT, Huang W, Rudkin GH, et al. In vitro mineralization of human mesenchymal stem cells on three-dimensional type I collagen versus PLGA scaffolds: a comparative analysis. *Plast Reconstr Surg*. 2011 Jun;127(6):2301-11.
177. Eslaminejad MB, Vahabi S, Shariati M, Nazarian H. In vitro Growth and Characterization of Stem Cells from Human Dental Pulp of Deciduous Versus Permanent Teeth. *J Dent (Tehran)*. 2010 Fall;7(4):185-95.
178. Atari M, Caballe-Serrano J, Gil-Recio C, Giner-Delgado C, Martinez-Sarra E, Garcia-Fernandez DA, et al. The enhancement of osteogenesis through the use of dental pulp pluripotent stem cells in 3D. *Bone*. 2012 Apr;50(4):930-41.
179. Kang SW, Yang HS, Seo SW, Han DK, Kim BS. Apatite-coated poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres as an injectable scaffold for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Jun 1;85(3):747-56.
180. Vakhrushev IV, Suzdaltseva YG, Burunova VV, Karalkin PA, Lupatov AY, Yarygin KN. Mesenchymal cells of the decidual tooth pulp: cytophenotype and initial evaluation of possibility of their use in bone tissue engineering. *Bull Exp Biol Med*. 2010 Jul;149(1):161-6.
181. Zhou J, Xu C, Wu G, Cao X, Zhang L, Zhai Z, et al. In vitro generation of osteochondral differentiation of human marrow mesenchymal stem cells in novel collagen-hydroxyapatite layered scaffolds. *Acta Biomater*. 2011 Nov;7(11):3999-4006.
182. Lin L, Chow KL, Leng Y. Study of hydroxyapatite osteoinductivity with an osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 2009 May;89(2):326-35.
183. Magan A, Ripamonti U. Geometry of porous hydroxyapatite implants influences osteogenesis in baboons (*Papio ursinus*). *J Craniofac Surg*. 1996 Jan;7(1):71-8.
184. Reves B.T., Jennings J.A., Bumgardner J.D., W.O. H. Osteoinductivity Assessment of BMP-2 Loaded Composite Chitosan-Nano-Hydroxyapatite Scaffolds in a Rat Muscle Pouch. *Materials*. 2011;4(8):1360-74.

185. Stein G, Lian J. Molecular mechanisms mediating developmental and hormone-regulated expression of genes in osteoblasts: an integrated relationship of cell growth and differentiation. In: Noda M, editor. Cellular and molecular biology of bone. Tokyo: Academic Press; 1993. p. 47-95.
186. Kasperk C, Wergedal J, Strong D, Farley J, Wangerin K, Gropp H, et al. Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995 Aug;80(8):2511-7.
187. George J, Kuboki Y, Miyata T. Differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts on honeycomb collagen scaffolds. *Biotechnol Bioeng.* 2006 Oct 20;95(3):404-11.
188. Boonantananasarn K, Janebodin K, Suppakpatana P, Arayapisit T, Rodsutthi JA, Chunhabundit P, et al. Morinda citrifolia leaves enhance osteogenic differentiation and mineralization of human periodontal ligament cells. *Dent Mater J.* 2012;31(5):863-71.
189. Aronow MA, Gerstenfeld LC, Owen TA, Tassinari MS, Stein GS, Lian JB. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. *J Cell Physiol.* 1990 May;143(2):213-21.
190. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Miner.* 1991 Jul;14(1):27-40.
191. Bjerre L, Bunker CE, Kassem M, Mygind T. Flow perfusion culture of human mesenchymal stem cells on silicate-substituted tricalcium phosphate scaffolds. *Biomaterials.* 2008 Jun;29(17):2616-27.
192. Weir MD, Xu HH. Culture human mesenchymal stem cells with calcium phosphate cement scaffolds for bone repair. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010 Apr;93(1):93-105.
193. Becker ST, Douglas T, Acil Y, Seitz H, Sivananthan S, Wiltfang J, et al. Biocompatibility of individually designed scaffolds with human periosteum for use in tissue engineering. *Journal of materials science Materials in medicine.* 2010 Apr;21(4):1255-62.
194. Zhang Y, Venugopal JR, El-Turki A, Ramakrishna S, Su B, Lim CT. Electrospun biomimetic nanocomposite nanofibers of hydroxyapatite/chitosan for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2008 Nov;29(32):4314-22.
195. Eslaminejad M, Bagheri F, Zandi M, Nejati E, Zomorodian E, Mivehchi H. Comparison of proliferation and osteoblast differentiation of marrow-derived mesenchymal stem cells on nano- and micro-hydroxyapatite contained composite scaffolds. *Iran J Biotechnol.* 2010;8(4):234-42.
196. Liu Q, Douglas T, Zamponi C, Becker ST, Sherry E, Sivananthan S, et al. Comparison of in vitro biocompatibility of NanoBone((R)) and BioOss((R)) for human osteoblasts. *Clin Oral Implants Res.* 2011 Nov;22(11):1259-64.

Dr Ivana Karadžić rođena je 27.02.1981. godine u Subotici. Osnovnu i srednju školu završila je u Novom Sadu. Medicinski fakultet u Novom Sadu, odsek za stomatologiju upisala je 2000. godine a diplomirala je u junu 2007. godine sa prosečnom ocenom 8,98 (osam i 98/100). Nakon obavljenog pripravničkog staža, položila je stručni ispit za doktora stomatologije u julu 2008. godine. Dva meseca kasnije upisala je doktorske studije iz naučne oblasti Dečja i preventivna stomatologija na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu gde je prve dve godine ovih studija bila angažovana kao saradnik u nastavi. Ispite predviđene planom i programom akademskih doktorskih studija položila je sa prosečnom ocenom 9,33 (devet i 33/100). Nastavno-naučno veće Stomatološkog fakulteta je 2011. godine donelo odluku o usvajanju predloga teme doktorske disertacije.

U junu 2012. godine upisala je specijalizaciju iz Dečje i preventivne stomatologije na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Nakon konkursa 2009. godine, izabrana je za asistenta za užu naučnu oblast Stomatologija (Dečja i preventivna stomatologija) na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu gde je radila do kraja 2010. godine.

Od 01.01.2011. godine zaposlena je na Institutu za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu kao istraživač saradnik.

Koautor je naučno-leksikografske publikacije Stomatološki leksikon i autor 9 naučnih publikacija (jedan rad u međunarodnom časopisu sa impakt faktorom (M23) u kome je prvi autor, jedan rad u časopisu nacionalnog značaja (M52), tri rada u nacionalnom naučnom časopisu (M53) i 4 saopštenja na skupovima od međunarodnog i nacionalnog značaja).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а IVANA KARADZIC
број уписа 2007 / 4005

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

UTICAJ RAZLICITIH 3D BIOMATERIJALA NA OSTEOBLASTNU
DIFERENCIJACIJU MEZENHIMALNIH CELIJA ZUBNE PULPE

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 25.02.2013.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора IVANA KARADŽIĆ

Број уписа 2007/4005

Студијски програм DOKTORSKE STUDIJE

Наслов рада UTICAJ RAZLIČITIH 3D BIOMATERIJALA NA OSTEOBLASTNU
DIFERENCIJACIJU MEZENHIMALNIH ĆELIJA ZUBNE PULPE

Ментор PROF. DR. DEJAN MARKOVIĆ

Потписани IVANA KARADŽIĆ

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 25.02.2013.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

UTICAJ RAZLIČITIH 3D BIOMATERIJALA NA
OSTEOBLASTNU DIFERENCIJACIJU MEZENHIMALNIH ĆELIJA ZUBNE PULPE

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

① Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 25.02.2013.