



Општи подаци и протокол истраживања

Назив Пројекта : ПОТЕНЦИЈАЛ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА ИЗ ЕКСФОЛИРАНИХ МЛЕЧНИХ ЗУБА ДА ДИФЕРЕНЦИРАЈУ У ЋЕЛИЈЕ СА НЕРВНИМ КАРАКТЕРИСТИКАМА У IN VITRO УСЛОВИМА

Кључне речи : матичне ћелије из ексфолираних млечних зуба, нервна диференцијација

Предмет, садржај и циљ истраживања

Сажетак

Млечни зуби представљају најдоступнији извор адултних матичних ћелија. Матичне ћелије из млечних зуба су високо пролиферативне, клонogene, мултипотентне ћелије пореклом од ћелија неуралне кресте (Nourbakhsh et al., 2011). Поступак добијања матичних ћелија из млечних зуба је једноставан, безболан и неинвазиван. У поређењу са матичним ћелијама коштане сржи и матичним ћелијама зубне пулпе показују значајно вишу стопу пролиферације што их чини способним за стварање довољног броја ћелија за потенцијалну клиничку апликацију (Miura et al., 2003). У циљу евалуације потенцијала матичних ћелија из ексфолираних млечних зуба за *in vitro* диференцијацију у нервне ћелије користићемо протокол индукције уз помоћ фактора раста у трајању од три недеље (Arthur et al., 2008). Након третмана имунофлуоресцентним бојењем и проточном цитометријом утврђиваћемо експресију нервних маркера: нестина, глијалног фибриларног киселог протеина (GFAP), неуралног нуклеарног антигена (NeuN), β III тубулина и неурофиламента М (NF-M). Очекује се да ће експресија маркера значајно порастати (Nourbakhsh et al., 2011; Arthur et al., 2008). Како би утврдили да ли су ћелије диференциране у функционалне неуроне применићемо електрофизиолошку анализу. Очекује се да ћелије култивисане у нервном индукционом медијуму продукују деполаризациону струју око 8.5 пута јачег интензитета у односу на ћелије култивисане у медијуму за раст (Arthur et al., 2008). Млечни зуби представљају потенцијални извор матичних ћелија за аутологну трансплантацију у лечењу многих обољења, између осталог и неуродегенеративних болести и неуротрауматских повреда.

Циљ истраживања:

Циљеви овог истраживања су:

1. Диференцијација матичних ћелија из ексфолираних млечних зуба у ћелије са нервним карактеристикама у присуству фактора раста.



2. Доказивање нервног фенотипа одређивањем експресије макера карактеристичних за нервне ћелије.
3. Електрофизиолошком анализом утврдити да ли су ћелије диферентоване у функционално активне неуроне.

Актуелност истраживања:

Многе студије су показала да се мезенхималне матичне ћелије (MSC) могу користити у третману неуролошких обољења (Zhao et al., 2002, Tai et al., 2004). Наиме, доказано је да њихова примена резултује функционалним опоравком, који је често у диспропорцији са постигнутом репарацијом. Механизам којим долази до побољшања још увек је нејасан. Три различите теорије објашњавају неурогенезу посредовану MSC: теорија трансдиференцијације, постојање ћелијске фузије и паракрини ефекат услед ослобађања различитих солубилних фактора од стране MSC. Иако постоје докази за сва три феномена још увек није разјашњено у којој мери сваки од њих доприноси репарацији оштећења (Rutenberg et al., 2004).

Мезенхималне матичне ћелије могу се изоловати из коштане сржи, масног ткива, крви из пупчане врпце, амнионске течности, хорионских чупица плаценте, тетива и лигамената, олфакторне мукозе итд. Последњих година посебно је актуелна популација денталних мезенхималних матичних ћелија, пре свега због њихове доступности. До сада је доказано постојање пет различитих популација денталних матичних ћелија: матичне ћелије зубне пулпе (*Dental Pulp Stem Cells, DPSCs*) (Gronthos et al., 2000), матичне ћелије из ексфолираних млечних зуба (*Stem Cells From Human Exfoliated Deciduous Teeth, SHED*) (Miura et al., 2003), матичне ћелије из апибалне папиле (*Stem Cells From Apical Papilla, SCAP*) (Seo et al., 2004), матичне ћелије периодонталног лигамента (*Periodontal Ligament Stem Cells, PDLSCs*) (Sonoyama et al., 2008) и прогениторске ћелије денталних фоликула (*Dental Follicle Progenitor Cells, DFPCs*) (Morsczech et al., 2005). Сматра се да денталне матичне ћелије поседују већи потенцијал за неурогенезу у односу на мезенхималне матичне ћелије добијене из других извора, вероватно захваљујући пореклу које воде од ћелија нервне кресте (Karaoz et al., 2011).

Матичне ћелије из ексфолираних млечних зуба су високо пролиферативне, клоногене, мултипотентне матичне ћелије способне да се диферентују у остеобласте, одонтобласте, ендотелне ћелије, нервне ћелије, адипоците и хондроците *in vitro* и *in vivo* (Chadipiralla et al., 2010; Laino et al., 2006; Miura et al., 2003; Sakai et al., 2010; Koyama et al., 2009). Откривене су 2003. године од стране Миуре и сарадника (Miura et al., 2003). Матичне ћелије из зубне пулпе не само да су лако доступне за изолацију већ су способне и да обезбеде довољан број ћелија за клиничку примену. У поређењу са матичним ћелијама коштане сржи и матичним ћелијама зубне пулпе показују вишу стопу пролиферације и већи број удвостручења популација као и формирање накупина ћелија у виду сфера (*sphere like clusters*) (Miura et al., 2003). SHED експримирају маркере нервних и ћелија глије, што може бити у последица порекла зубне пулпе од ћелија нервне кресте (Miura et al., 2003).



Студије су показале да SHED представљају популацију адултних матичних ћелија способних за екстензивну пролиферацију и диференцијацију у различите ћелијске типове. Оне могу представљати идеалан извор матичних ћелија за лечење различитих обољења, између осталог и неуродегенеративних болести и неуротрауматских оштећења.

Предмет и опис истраживања: задаци, методологија, очекивани резултати:

Матичне ћелије из ексфолираних млечних зуба купљене су од фирме „Allcells“ (California, USA).

Ћелије ће бити култивисане у присуству α MEM (α -modification of Eagle's medium) медијума обогаћеног са 20% раствором говеђег серума, 100 μ M L-ascorbic acid 2-phosphate, 2 mM L-глутамин, 100 U/ml пеницилина и 100 μ g/ml стрептомицина. Култивација ћелија ће се вршити на 37° C у присуству 5% влажног ваздуха и 95% угљен диоксида (Arthur et al., 2008).

FACS анализа (*fluorescence activated cell sorting*)

Матичне ћелије из млечних зуба експримирају антигене карактеристичне за мезенхималне матичне ћелије попут STRO-1, CD146, CD45, CD90, CD106 и CD166 али не и маркере хематопоеетских и ендотелних ћелија CD34 и CD31, што ће бити доказано FACS анализом (Nourbakhsh et al., 2011).

Нервна индукција:

У циљу евалуације потенцијала матичних ћелија из ексфолираних млечних зуба за *in vitro* диференцијацију у нервне ћелије користићемо протокол индукције уз помоћ фактора раста.

Фласкови за култивацију ћелија се најпре обложе полиорнитином (10 μ g/ml) преко ноћи на собној температури. Након тога се два пута исперу водом, а затим обложе ламинином (5 μ g/ml) и оставе преко ноћи на 37° C у влажном инкубатору. Након тога фласкови се испирају PBS-ом а затим и медијумом за раст пре него што се додају ћелије. Ћелије се затим култивишу у обложеним фласковима до постизања 80% конфлуентности а затим се пресејавају.

Након тога ћелије ће бити култивисане било у медијуму А или медијуму Б три недеље. Медијум А сачињавају неуробазал А медијум, 100 U/ml пеницилина, 1 x B27 суплемент, 100 μ g/ml стрептомицина, 20 ng/ml епидермалног фактора раста и 40 ng/ml базалног фибробластног фактора раста. Медијум Б састоји се од 3 одвојена медијума. Првих седам дана примењује се медијум А, затим наредних седам дана медијум који сачињавају DMEM и F12 у односу 50:50 са додатком ITTS-а (insulin-transferrin-sodium-selenite supplement), 100 U/ml пеницилина, 100 μ g/ml стрептомицина и 40 ng/ml базалног фибробластног фактора раста.



Задњих седам дана користи се медијум који сачињавају DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) и F12 у односу 50:50 са додатком ITTS-а, 100 U/ml пеницилина, 100 µg/ml стрептомицина, 40 ng/ml базалног фибробластног фактора раста и 0.5 µM ретиноичне киселине (Arthur et al., 2008).

Проточна (*flow*) цитометрија и имунофлуоресценција

Имунофлуоресцентним бојењем и flow цитометријском анализом утврђиваћемо експресију нервних маркера: нестина, глијалног фибриларног киселог протеина (GFAP), неуралног нуклеарног антигена (NeuN), β III тубулина и неурофиламента М (NF-M). Очекује се да ће експресија маркера значајно порастати током третмана (Nourbakhsh et al., 2011; Arthur et al., 2008).

Електрофизиологија

Како би утврдили да ли су ћелије диференциране у функционално активне неуроне применићемо електрофизиолошку анализу (*whole-cell patch clamping*).

Након индукционог третмана ћелије се подижу трипсином и преносе на стаклене покровне љуспице третиране хидрохлорном и инкубирају се 24h у нервном индукционом медијуму или медијуму за раст. Раствор воденог купатила садржи (у mM): NaCl, 140; KCl, 4; CaCl₂, 2; MgCl₂, 2; глукозу, 10; и NERES, 10. Како би се блокирали K⁺ канали и издвојиле Na⁺ струје, K глутамат и KCl у раствору биће замењени еквимоларним количинама Cs глутамата и CsCl. Стаклена микропипета се поставља на површину ћелије и врши се блага сукција како би се направио отвор на мембрани. Пипета је повезана са компјутерским амплификатором који уз помоћ софтвера региструје јонске струје (Arthur et al., 2008).

Очекује се да ћелије култивисане у стандардном медијуму за раст стварају деполаризациону јонску струју (*inward current*) мањег интензитета, док би ћелије подвргнуте третману нервне индукције требало да продукују деполаризациону струју око 8.5 пута јачег интензитета.

Статистичка обрада података

За статистичку обраду података користиће се SPSS пакет, верзија 19.0.

Значај истраживања:

Овом студијом могуће је доказати да се матичне ћелије из ексфолираних млечних зуба могу диференцирати у нервне ћелије *in vitro* односно да млечни зуби представљају извор матичних ћелија за потенцијалну клиничку апликацију у неуролошким обољењима и неуротрауматским оштећењима.



Временски оквир:

Трајање студије процењује се на годину дана.

Литература:

Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA and Gronthos S (2008). Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells* 26: 1787-1795.

Chadipiralla K, Yochim JM, Bahuleyan B et al. (2010). Osteogenic differentiation of stem cells derived from human periodontal ligaments and pulp of human exfoliated deciduous teeth. *Cell Tissue Res* 340: 323-333.

Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S, (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 9: 13625-13630.

Karaoz E, Demircan PC, Saglam O, Aksoy A, Kaymaz F, Duruksu G (2011). Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochem Cell Biol* 136: 455-473.

Koyama, N., Okubo, Y., Nakao, K., and Bessho, K. (2009). Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. *J. Oral Maxillofac Surg* 67: 501–506.

Laino G, Carinci F, Graziano A et al. (2006). *In vitro* bone production using stem cells derived from human dental pulp. *J Craniofac Surg* 17: 511-515.

Nourbakhsh N, Soleimani M, Taghipour Z et al. (2011). Induced in vitro differentiation of neural-like cells from human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells. *Int J Dev Biol* 55: 189-195

Miura M, Gronthos S, Zhao M et al. (2003). SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 5807–5812.

Morsczeck C, Schmalz G, Reichert TE, Volner F, Galler K, Driemel O (2008). Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Invest* 12: 113-8

Rutenberg MS, Hamazaki T, Singh AM, Terada N et al. (2008). Stem cell plasticity, beyond alchemy. *Int J Hematol* 79: 15-21.

Sakai VT, Zhang Z, Dong Z., Neiva KG et al. (2010). SHED Differentiate into Functional Odontoblasts and Endothelium. *J Dent Res* 89: 791-796.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J et al. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364: 149-155.



Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S et al. (2008). Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod* 34: 166-171.

Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC (2002). Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 174: 11–20.

Tai YT, Svendsen CN (2004). Stem cells as a potential treatment of neurological disorders. *Curr Opin Pharmacol* 4: 98–104.