

# Regeneracijska sposobnost stanica postnatalne zubne pulpe u miša

---

**Braut, Alen**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2006**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:176423>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-01**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U RIJECI**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Alen Braut**

**REGENERACIJSKA SPOSOBNOST STANICA**  
**POSTNATALNE ZUBNE PULPE U MIŠA**

**Doktorska disertacija**

**Rijeka, 2006.**

## PODACI O AUTORU I DOKTORSKOM RADU

### 1. AUTOR

IME I PREZIME	Alen Braut
DATUM I MJESTO ROĐENJA	21. srpnja 1973., Rijeka
NAZIV FAKULTETA I GODINA ZAVRŠETKA DODIPLOMSKOG STUDIJA	Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, 1996.
NAZIV FAKULTETA I GODINA ZAVRŠETKA POSLIJEDIPLOMSKOG STUDIJA	Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, 2001.
SADAŠNJE ZAPOSLENJE, ADRESA	Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Katedra za bolesti zuba

### 2. DOKTORSKI RAD

NASLOV	Regeneracijska sposobnost stanica postnatalne zubne pulpe u miša
USTANOVA NA KOJOJ JE PRIJAVLJEN I IZRAĐEN DOKTORSKI RAD	Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci; Ucom Health Centre, Department of Pediatric Dentistry, Farmington, USA
BROJ STRANICA, SLIKA, GRAFIKONA, TABLICA I BIBLIOGRAFSKIH PODATAKA	Stranica 76, slika 33, bibliografskih podataka 82
ZNANSTVENO PODRUČJE, POLJE I GRANA	Znanstveno područje <i>biomedicina i zdravstvo</i> , znanstveno polje <i>stomatologija</i> , znanstvena grana <i>stomatologija i oralna kirurgija</i>
IME I PREZIME MENTORA	Prof.dr.sc. Bojan Polić
FAKULTET NA KOJEM JE OBRANJEN DOKTORSKI RAD	Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

### 3. OCJENA I OBRANA

DATUM PRIJAVE TEME	28. travnja 2003.
DATUM PREDAJE RADA	26. travnja 2006.
DATUM SJEDNICE FAKULTETSKOG VIJEĆA NA KOJOJ JE RAD PRIHVAĆEN	13. lipnja 2006.
POVJERENSTVO ZA OCJENU DOKTORSKOG RADA	Prof.dr.sc. Stipan Jonjić, doc.dr.sc. Maja Kovačević, prof.dr.sc. Tonči Staničić
POVJERENSTVO ZA OBRANU DOKTORSKOG RADA	Prof.dr.sc. Stipan Jonjić, doc.dr.sc. Maja Kovačević, prof.dr.sc. Tonči Staničić, prof.dr.sc. Bojan Polić
DATUM OBRANE	11. srpnja 2006.

Mentor rada: prof.dr.sc. Bojan Polić, dr.med.

Doktorska disertacija obranjena je dana 11.7.2006. u Rijeci pred  
povjerenstvom u sastavu:

1. prof.dr.sc. Stipan Jonjić
2. prof.dr.sc. Bojan Polić
3. doc.dr.sc. Maja Kovačević
4. prof.dr.sc. Tonči Staničić

Rad ima: 76 listova

32 slike

UDK: \_\_\_\_\_

## SAŽETAK:

### Cilj istraživanja:

Osnovni cilj doktorske disertacije bio je istražiti mogućnost postojanja progenitorskih stanica odontoblastne loze u postnatalnoj zubnoj pulpi miša, korištenjem transgena Colla1-GFP kao biljega, te ispitati njihovu sposobnost diferencijacije i sudjelovanja u regeneraciji zubnog tkiva.

### Materijal i metode:

U radu sam koristio transgenične miševe pOBCol2.3-GFP koji specifično izražavaju zeleni fluorescentni protein (GFP) pod kontrolom fragmenta (2.3 kb) promotora za gen štakorskog kolagena tipa I. U prvom dijelu istraživanja sam uz pomoć fluorescentne mikroskopije i histoloških tehnika karakterizirao izražaj Colla1-GFP transgena u različitim razdobljima razvoja zubnih tkiva i usporedio ga sa izražajem drugih poznatih biljega diferencijacije odontoblasta, poput *DSPP* i *Dmp1*, kako bih utvrdio mogućnost korištenja transgena u identifikaciji pojedinih razvojnih stadija odontoblasta. U cilju dokazivanja nazočnosti progenitorskih stanica odontoblastne loze izvršio sam transplantaciju koronarnih dijelova zubne, u kojima nije bilo diferenciranih odontoblasta, pod bubrežnu kapsulu SCID miševa. Tkiva nastala nakon transplantacije sam analizirao standardnim histološkim i histokemijskim tehnikama bojenja demineraliziranih i nedemineraliziranih uzoraka te *in situ* hibridizacijom za *DSPP* i *Dmp1*. Potencijal diferencijacije matičnih stanica analiziran je i u uvjetima kulture stanica zubne pulpe *in vitro* pri čemu je praćena sposobnost stvaranja kolonija, izražaj alkalne fosfataze te stvaranje minerala u izvanstaničnom matriksu. Stanice su također promatrane pod fluorescentnim svjetlom radi izražaja transgena (GFP), a ukupna RNK je izolirana u različitim vremenskim intervalima i korištena za Northern blot i RT-PCR analize.

### Rezultati:

Karakterizacijom izražaja Colla1-GFP transgena u zubnim tkivima miša utvrdio sam da je on prisutan u funkcionalnim i zrelim odontoblastima te da korelira s izražajem *DSPP* i *Dmp1* gena. Korelacija je potvrđena u različitim fazama razvoja molara i kontinuirano rastućih inciziva.

U transplantacijskim pokusima dobiveno tkivo pokazalo je stvaranje tubularnog i osteotipičnog matriksa s visokim sadržajem minerala i kolagena te polariziranim novostvorenim stanicama nalik na odontoblaste. Novodiferencirane stanice izražavale su visoke razine Colla1-GFP i *DSPP*, što odgovara zreloom odontoblastnom fenotipu. U uvjetima stanične kulture izolirane stanice zubne pulpe stvarale su kolonije, izražavale povišenu razinu alkalne fosfataze te je opažena mineralizacija novostvorenog tkiva. One su također izražavale molekularne biljege diferenciranih odontoblasta poput: Colla1-GFP transgena, *DSPP*, *OC* te nisku razinu *Dmp1*-a.

### Zaključci:

Colla1-GFP transgen (pOBCol2.3-GFP transgeničnih miševa) je izražen samo u zrelim formama odontoblasta i može se koristiti kao molekularni biljeg u praćenju diferencijacije odontoblasta u *in vivo* i u *in vitro* uvjetima. Koronarni dijelovi postnatalne zubne pulpe miša sadrže progenitorske stanice koje se mogu diferencirati i stvarati tubularni matriks, poput dentina u transplantacijskim uvjetima. Stanice odvojene od svog izvanstaničnog matriksa, u uvjetima stanične kulture, se također mogu diferencirati u odontoblastni fenotip, ali je proces sporiji nego kada se one transplantiraju zajedno sa svojim izvanstaničnim matriksom.

**KLJUČNE RIJEČI:** dentin; matične stanice; odontoblast; regeneracija tkiva; tkivni inženjering; zeleni fluorescentni protein; zubna pulpa.

## SUMMARY

### Objectives:

The main objective of this work was to investigate the possible presence of odontoblast progenitor cells in the postnatal dental pulp of mice, using *Colla1*-GFP as a marker gene, and their potential of differentiation and contribution to the regeneration of dental tissues.

### Materijal and Methods:

The pOBCol2.3-GFP transgenic mice expressing GFP under the control of rat *Colla1* promoter fragment (2.3 kb) were used in this work. In the first part of the research the pattern of expression of the *Colla1*-GFP in the dental tissues was established and correlated to the expression of known odontoblast differentiation markers (*DSPP* and *Dmp1*). The transplantation procedures of the 5 day old coronar portions of the dental pulps devoid of odontoblasts placed under the kidney capsule of the SCID mice for 7, 10 and 14 days, were used to establish the presence of the adult stem cells. The induced tissue was analyzed by standard histological and histochemical methods of both demineralized and undemineralized samples for the presence of minerals, morphological and functional characteristics. For the presence of the differentiation marker genes the samples were *in situ* hybridized for *DSPP* and *Dmp1*. The cells were isolated and cultured in order to induce their differentiation in conditions *in vitro*. The cells were tested for the ability to form colonies, upregulate alkaline phosphatase and mineralize extracellular matrix. The cell cultures were analyzed under fluorescent conditions in order to observe the onset of differentiation marked by the appearance of *Colla1*-GFP transgene. For the presence of *DSPP*, *OC*, *Colla1* and *Dmp1* differentiation markers, the total RNA was isolated at different time points and analyzed by Northern blot and RT-PCR.

### Results:

The pattern of *Coll1a1*-GFP correlates to the functional and mature odontoblasts, and also with the endogenous *DSPP* and *Dmp1*. The correlation was tested on different stages of developing molars and the continuously growing incisors.

The transplantation experiments showed the presence of cells capable of differentiating into elongated well polarized odontoblast like cells capable of secreting tubular mineralized matrices that morphologically resemble dentin. These cells were expressing high levels of *Coll1a1*-GFP and *DSPP* that resembles the mature odontoblast phenotype. In the culture the cells were forming colonies, upregulating alkaline phosphatase and capable of mineralizing the extracellular matrix. Furthermore, the cells were expressing *GFP*, endogenous *Coll1a1*, *DSPP*, *OC* at high and *Dmp1* at low levels, all markers of the differentiated odontoblast phenotype.

### Conclusions:

pOBCol2.3-GFP represent a powerful tool in monitoring the odontoblast differentiation in both *in vivo* and *in vitro* conditions. Coronar portions of the dental pulps contain adult stem cells capable of differentiating into odontoblasts in the transplantation conditions. Cells devoid of their extracellular matrix are capable of differentiating into odontoblasts in conditions *in vitro*, but the process is slower due to the lack of cellular communications that enhances the cell differentiation.

**KEY WORDS:** dental pulp; dentin; green fluorescent protein; odontoblast; stem cells; tissue engineering; tissue regeneration.



Eksperimentalni dio rada je izrađen na University of Connecticut Health Center, Department of Pediatric Dentistry, Farmington, CT, SAD; pod vodstvom prof. Mina Mine, tijekom trogodišnjeg boravka na znanstvenom usavršavanju. Financijska sredstva su osigurana iz NIH projekata DE13363 i DE08682, te projekta Patterson Trust Foundation, a dio rezultata iz ove disertacije je objavljen u slijedećim člancima:

**Braut A**, Kalajzic I, Kalajzic Z, Rowe DW, Kollar EJ, Mina M. Colla1-GFP transgene expression in developing incisors. *Connect Tissue Res* 2002; 43: 216-9.

**Braut A**, Kollar EJ, Mina M. Analysis of the odontogenic potential of dental pulp *in vivo* using a Colla1-2.3-GFP transgene. *Int J Dev Biol* 2003; 47:281-92.

Mina M. and **Braut A**. New insight into progenitor/stem cells in dental pulp using Colla1-GFP transgenes. *Cells Tissues Organs* 2004; 176:120-33.

*Posveta*

Mojim najmilijima,  
mojoj obitelji.

## ***Zahvala***

Zahvaljujem se mentoru rada prof.dr.sc. Bojanu Poliću na nesebičnoj pomoći, savjetima i strpljenju koje mi je pružio tijekom izrade ove doktorske disertacije.

## SADRŽAJ:

1. UVOD .....	1
1.1. Struktura zuba .....	1
1.2. Razvoj zuba .....	2
1.2.1. Razvoj odontoblasta i stvaranje dentina .....	4
1.2.2. Molekularni biljezi sazrijevanja odontoblasta .....	7
1.2.3. Ozljede zuba i neodentinogeneza .....	9
1.3. Matične stanice .....	11
1.3.1. Embrionalne matične stanice .....	11
1.3.2. Germinativne matične stanice .....	12
1.3.3. Tkivne matične stanice .....	12
1.3.4. Upotreba matičnih stanica u staničnoj terapiji i tkivnom inženjeringu .....	13
1.4. Transgenične životinje i postupak njihovog dobivanja .....	15
1.4.1. Genski biljezi i njihova upotreba u eksperimentalnim istraživanjima .....	18
1.5. Col1a1-GFP transgenični miševi .....	19
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	22
3. MATERIJALI I METODE .....	23
3.1. Laboratorijski miševi .....	23
3.2. Histološke tehnike pripreme uzoraka .....	23
3.3. Histološka bojenja .....	24
3.4. Analiza fluorescencije Col1a1-GFP-a na histološkim rezovima .....	24

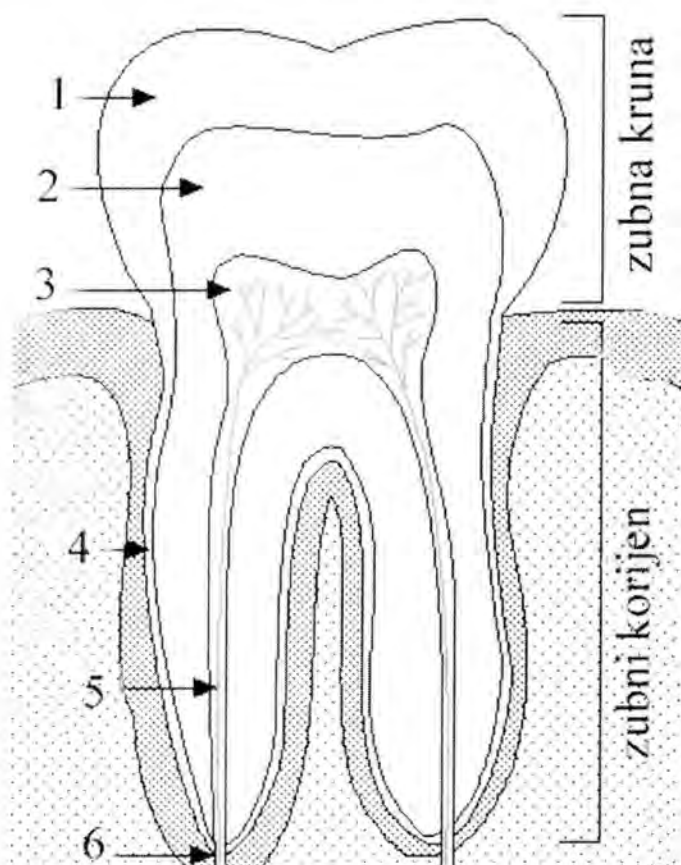
3.5. <i>In situ</i> hibridizacija na histološke rezove .....	25
3.6. Transplantacija intaktnih dijelova zubne pulpe .....	25
3.7. Histokemijsko bojenje minerala .....	26
3.8. Kultura stanica zubne pulpe .....	26
3.9. Protočna citometrija .....	27
3.10. Northern blot analiza .....	28
3.11. RT-PCR analiza .....	28
4. REZULTATI .....	30
4.1. Col1a1-GFP gen je specifično izražen u funkcionalnim i zreлим odontoblastima tijekom razvoja zuba .....	30
4.2. Izražaj Col1a1-GFP korelira s endogenim <i>DSPP</i> i <i>Dmp1</i> genima tijekom diferencijacije odontoblasta .....	35
4.3. Transplantacija zubne pulpe .....	37
4.3.1. Karakterizacija pulpnog tkiva prije transplantacije .....	37
4.3.2. Histologija i histokemija novostvorenog tkiva nakon transplantacije .....	39
4.3.3. <i>DSPP</i> i <i>Dmp1</i> izražaj je nazočan u novostvorenom tkivu .....	43
4.4. Citometrijska analiza digestiranih stanica zubne pulpe .....	46
4.5. Kultura stanica zubne pulpe .....	48
4.5.1. Stanice zubne pulpe formiraju kolonije i posjeduju izražaj alkalne fosfataze .....	48
4.5.2. Stvaranje minerala u <i>in vitro</i> uvjetima stanične kulture .....	51
4.5.3. Genski biljezi diferencijacije su izraženi u kulturi stanica .....	54
5. RASPRAVA .....	59
6. ZAKLJUČCI .....	67



## 1. UVOD

### 1.1. Struktura zuba

Zubi su složene strukture nastale iz dvije osnove, epitelne i mezenhimne. Mezenhimna osnova iz koje nastaje veći dio glave zove se još i mezektoderm. Njegove stanice nastaju od stanica neuralnog grebena (ektodermalnog podrijetla) koje u ranim fazama razvoja migriraju, proliferiraju i diferenciraju se u mezenhim glave. Tkiva koja tvore zube se dijele na meka i tvrda zubna tkiva. U meka zubna tkiva spada zubna pulpa, a u tvrda caklina, dentin i cement.



**Slika 1. Struktura zuba.** 1 caklina; 2 dentin; 3 zubna pulpa; 4 cement; 5 krvne žile i živci u radikularnom dijelu pulpe; 6 vršak korijena s otvorom za krvne žile i živce.

Od svih zubnih tkiva jedino je caklina podrijetla iz oralnog epitela kao produkt specijaliziranih stanica, ameloblasta. Jednom izlučena i mineralizirana caklina tijekom života se ne mijenja i ne dograđuje jer prilikom nicanja zuba ameloblasti propadaju. Površni sloj

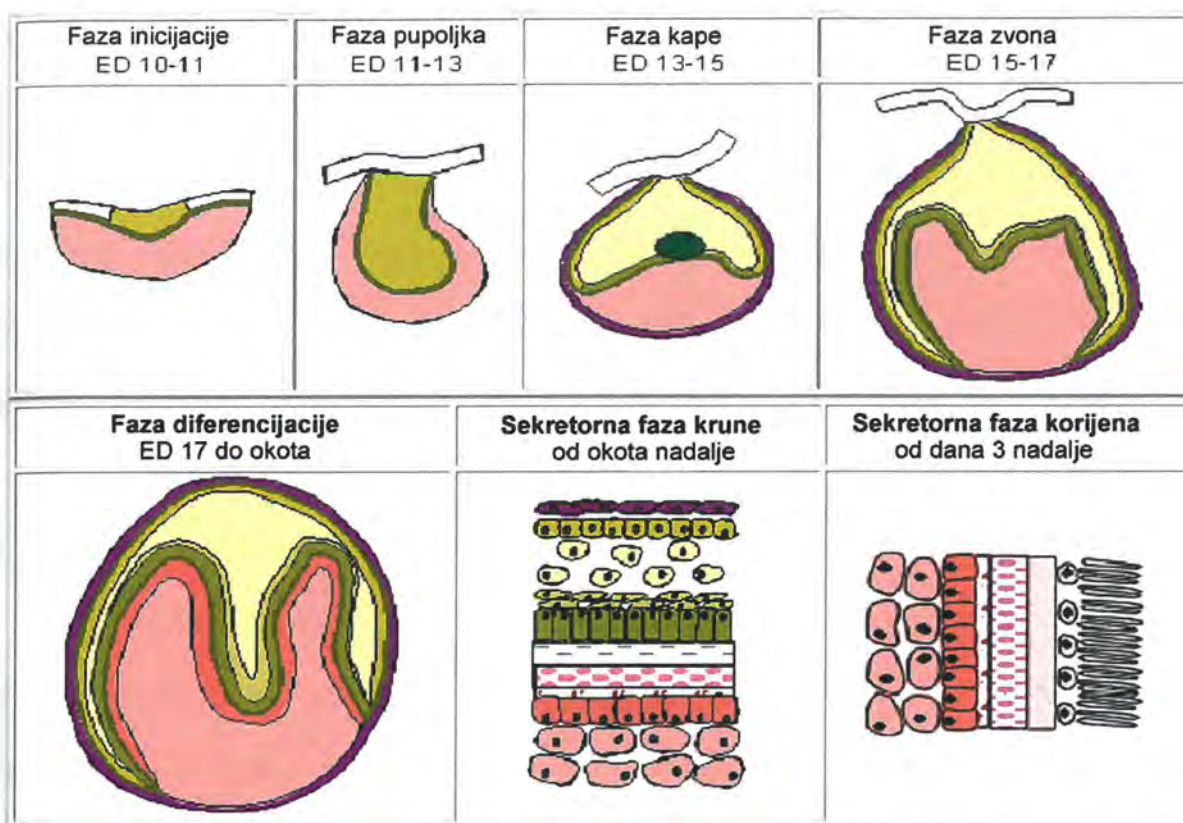
čakline se neznatno mijenja u svom mineralnom sastavu procesima demineralizacije i remineralizacije u kojima sudjeluju ioni iz sline. Nasuprot tome, dentin, cement i pulpa nakon nicanja zuba smanjuju svoje funkcije, premda ne u potpunosti jer su stanice, koje ih izgrađuju, prisutne i nisko aktivne tijekom cijelog života. Njihova aktivnost ovisna je o funkcionalnim i patološkim podražajima što doprinosi izvjesnom stupnju mogućnosti remodelacije ovih tkiva (1).

## 1.2. Razvoj zuba

Prenošenje signala među stanicama je osnova za inicijaciju, oblikovanje i razvoj organa kao što su zubi. Zubi su složene strukture koje nastaju uzajamnom interakcijom epitela i mezenhima (2, 3). Prvi morfološki znak razvoja zuba je zadebljanje oralnog epitela (E11-E11.5 kod miša) koje postepeno urasta u podupirući mezenhim (4). U ranoj fazi razvoja oralni epitel i rani dentalni epitel izražavaju signalne molekule koje su važne za proces proliferacije i diferencijacije stanica. Tako je pronađeno da oralni i dentalni epitel izražava *Wnt4* koji pobuđuje *semaphorin 3a (Sema3a)* u mandibularnom mezenhimu, a što se nastavlja i u fazi pupoljka (*Wnt4* i *TGFβ*). Izražaj *Wnt*-a je tako neophodan za rani razvoj zuba (5). Kod razvoja zuba razlikujemo faze pupoljka, kape i zvona (slika 2.). Brojne signalne molekule, koje pripadaju porodicama poput koštanih morfogenetskih proteina (BMP) (eng. *Bone morphogenic proteins*), fibroblastni čimbenici rasta (FGF) (eng. *Fibroblast growth factor*) i WNT (*wingless* i *int*), sudjeluju u regulaciji svake faze razvoja zuba (6-8).

BMP porodica signalnih molekula utječe na apoptozu i proliferaciju stanica, a većina njih (BMP-2, -4, -5, -7 i -7) su izražene tijekom razvoja zuba (9).





Navedena vremena odnose se na razvoj miša (ED, embrionalni dani)

**Slika 2. Shematski prikaz razvojnih faza zuba i sastavnih dijelova tkiva (preuzeto s <http://bite-it.helsinki.fi/> ; službena stranica: Tooth and Craniofacial Development Group of the Developmental Biology Programme, Institute of Biotechnology, University of Helsinki )**

FGF porodica signalnih molekula se sastoji od oko 20 članova (10). Kod sisavaca i ptica imaju značajnu ulogu u morfogenezi i organogenezi udova, kose, pluća i perja. Većina članova FGF porodice (FGF -1, -2, -3, -4, -8, -9, 10) aktivno sudjeluju u morfogenezi zuba (11-13). U epitelu zubnog pupoljka javlja se FGF4 koji pobuđuje FGF3 u okolnom dentalnom mezenhimu (12), koji je potreban da bi se pojavio izražaj Shh u caklinskoj kvržici zubnog zametka u fazi kape. Prelazak faze pupoljka u fazu kape karakteriziran je pojavom vratnih petlji (engl. cervical loop) te histodiferencijacijom unutarnjeg i vanjskog caklinskog epitela koji biva razdvojen reticullum stellatum-om. Većina pokušaja uplitanja u izražaj pojedinih signalnih molekula rezultirao je zaustavljanjem razvoja zuba baš u ovoj fazi prelaska pupoljka u kapu (14, 15). BMP-2 je izražen u dentalnom epitelu na vršku pupoljka (9) što je dokazano *in situ* hibridizacijom, ali se on može naći i u mezenhimu

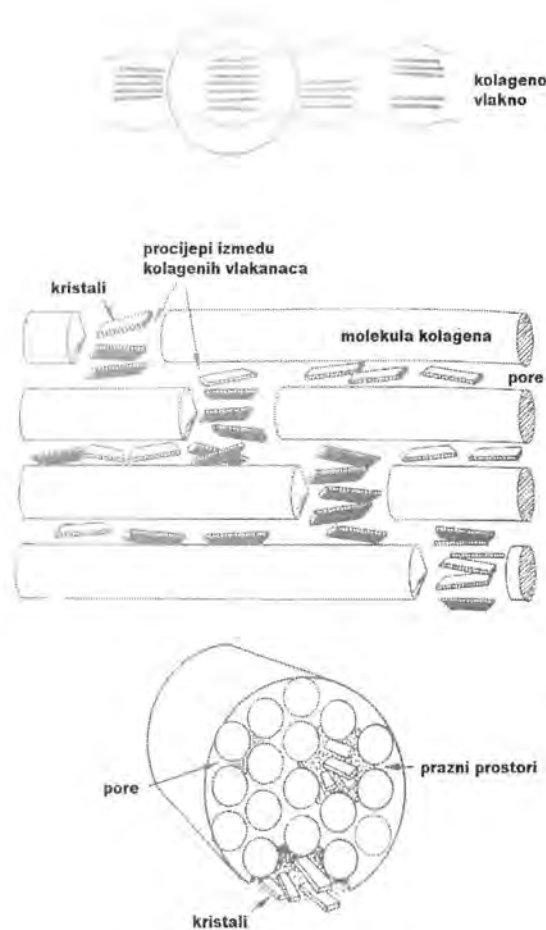
imunohistokemijskim bojanjem. To govori o sposobnosti BMP-2 da difundira u okolne strukture i tamo ostvaruje svoje učinke. BMP-4 je u fazi pupoljka pronađen u kondenzirajućem mezenhimu (9), a kao i BMP-2, i BMP-4 je imunohistokemijskim bojanjem pronađen i u epitelu. BMP-4 igra značajnu ulogu u prelasku faze pupoljka u fazu kape. Njegov izražaj se pojačava u E14 i E15 danu, što se podudara s apoptozom stanica primarnog caklinskog čvorića.

### 1.2.1. Razvoj odontoblasta i stvaranje dentina

Diferencijacija stanica zubne papile u odontoblaste je ovisna o induktivnim signalima iz epitela unutarnjeg lista caklinskog organa te njegove bazalne (16, 17). U vrijeme početka stvaranja dentina, stanice zubne papile u blizini graničnog polja epitel-mezenhim postupno migriraju, proliferiraju te diferenciraju iz kuboidalnog oblika u polarizirane i cilindrične stanice zvane odontoblasti. Odontoblasti tada započinju sekreciju dentinskog izvanstaničnog supstrata (DIS) (17, 18). Ove stanice luče specifične produkte aktivnih gena koji dovode do stvaranja visoko mineraliziranog izvanstaničnog matriksa dentina. Organske komponente predentina podijeljene u dvije velike skupine: kolagenske i nekolagenske proteine (19-21).

Odontoblasti luče izvanstanični matriks koji sadrži fibrilarni kolagen i dentinske nekolagenske proteine (DNKP). Od organskih komponenata dentina, kolagen tipa I je najzastupljeniji protein (86-90%) (19-21). Kolagen tip I nalazimo u svim mineraliziranim tkivima mezenhimnog porijekla u tijelu (dentin, cement i kost) jer on, za razliku od ostalih vrsta kolagena koje nalazimo u koži, hrskavici, tetivama, očnoj leći, krvnim žilama i drugdje, uz povoljne ostale čimbenike iz okoline u mogućnosti mineralizirati. Kolagen tip I se sastoji od dva  $\alpha_1$  i jedan  $\alpha_2$  lanca duga 300 nm.. Njegova terciarna struktura slaganja ova tri lanca, te način međusobnog povezivanja pojedinih vlaknaca u kolagena vlakna i prazni prostori

koji zaostaju, omogućuju naknadnu ugradnju hidroksil-apatitnih kristala. Ugradnjom kristala dolazi do mineralizacije organskog produkta odontoblasta čime predentin prelazi u dentin (1).

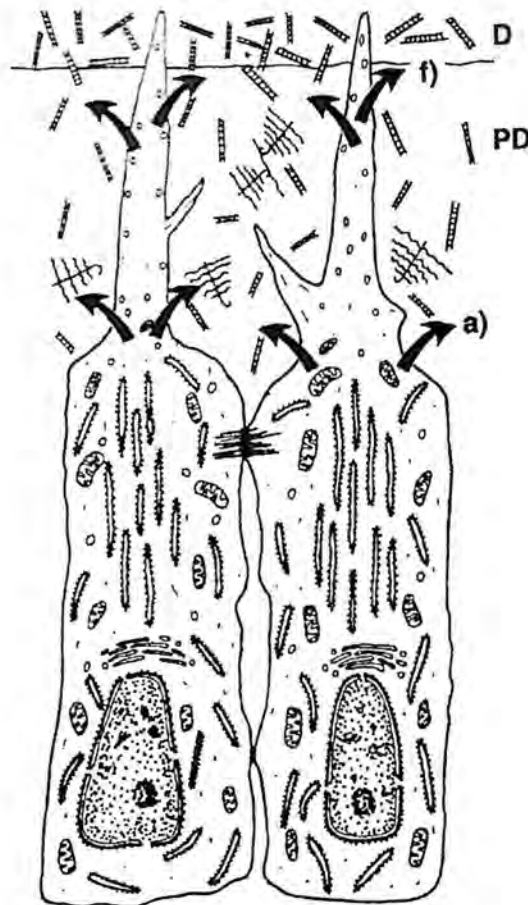


**Slika 3. Povezivanje kolagenih vlaknaca u vlakna.** Mjesta ugradnje kristala hidroksilapatita u zaostale prostore između kolagenih vlaknaca i posljedična mineralizacija izlučenog matriksa (*preuzeto iz Cate i sur. 1998.*).

Dentinski nekolagenski proteini su važni u pokretanju i održavanju procesa mineralizacije DIS-a (19, 22, 23). U isto vrijeme odontoblasti razvijaju odontoblastni nastavak (procesus) koji seže duboko u dentinski matriks. Uklapanjem odontoblastnog nastavka u izlučeni matriks nastaje karakteristična tubularna građa dentina (19).

Zreli odontoblasti su visoke cilindrične postmitotične stanice (50-70  $\mu\text{m}$ ) podrijetlom iz neuralnog grebena čije je tijelo bogato polarno raspoređenim organelama. Njihov dugački odontoblastni nastavak koji se proteže duboko u dentinske kanaliće. Odontoblasti luče

organske dijelove predentina te sudjeluju u njegovom sazrijevanju i mineralizaciji. Ovaj izlučeni izvanstanični matriks sadrži složenu mješavinu proteoglikana, glikoproteina, sialoproteina, fosfoproteina te drugih molekula u tragovima (20).



**Slika 4. Shema dobro polariziranih funkcionalnih odontoblasta s prikazom njihovog izvanstaničnog produkta. D-dentin; PD-predentin; f-fronta mineralizacije; a-smjer i mjesta izlučivanja matriksa (preuzeto iz Ruch 1998.)**

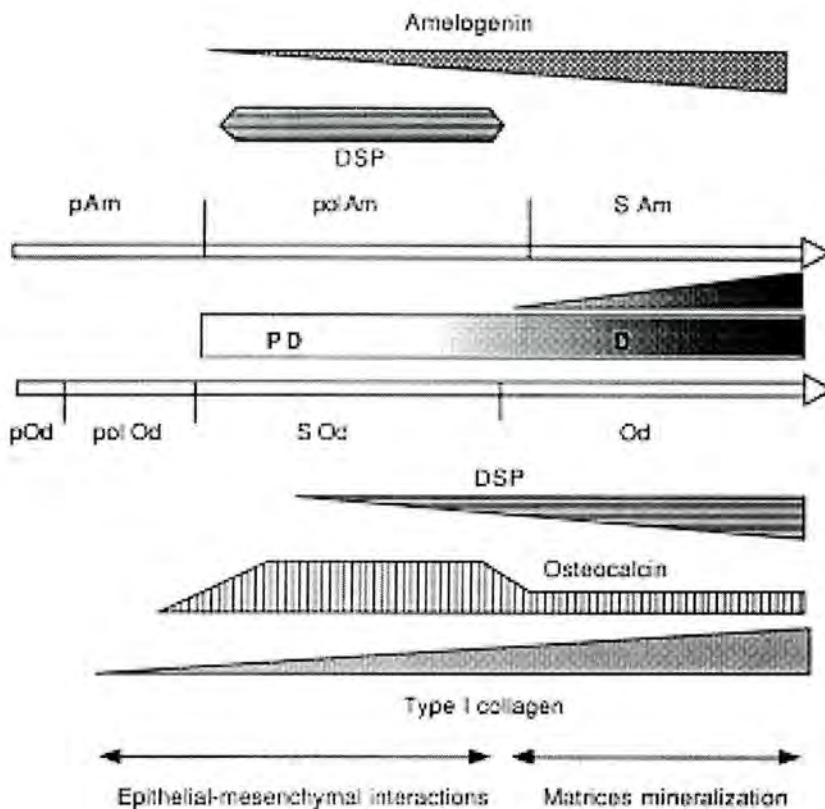
Jednom izlučene ove komponente ne podliježu remodeliranju kao kost, već se vremenom samo povećava anorganski udio (1). Nakon nicanja zuba produkcija izvanstaničnog dentinskog matriksa se nastavlja, ali u smanjenom obimu (sekundarni dentin). U slučaju ozlijede, kao npr. mehaničke traume, izlaganje kemijskim faktorima ili patološkom

procesu kao zubni karijes, inducira se ubrzano stvaranje reakcijskog (tercijarnog) dentina. Blage stimulacije odontoblasta omogućavaju njihovo preživljavanje i stvaranje reakcijskog dentina, dok ih snažnija narušavanja homeostaze ireverzibilno uništavaju. Na mjestu uništenih odontoblasta diferenciraju se nove stanice i sudjeluju u stvaranju reparacijskog dentina (1, 24-27). Reparacijski dentin je neorganizirano tvrdo zubno tkivo i služi kao zaštita zubne pulpe (27). Eksperimentalna opažanja podržavaju teoriju po kojoj je reparacijski dentin produkt novoformiranih stanica morfološki sličnih odontoblastima (27). Premda se smatra da se ove novo-diferencirane stanice regrutiraju od stanica zubne pulpe, njihovo točno podrijetlo nije utvrđeno niti su stanice detaljno karakterizirane.

### **1.2.2. Molekularni biljezi sazrijevanja odontoblasta**

Odontoblasti kao i sve specijalizirane stanice tijekom diferencijacije izražavaju sukladno pojedinim stupnjevima diferencijacije, određene molekularne biljege. Ti biljezi su proteini te ih se može kao takve otkriti ili se pak mogu pratiti njihove gRNK koje prethode sintezi svakog od tih proteina.

Nekolagenski proteini (engl. NCP) dentina su osteonektin (ON), osteokalcin (OC), osteopontin (OP), koštani sialoprotein (engl. bone sialoprotein - BSP) i protein dentinskog matriksa 1 (engl. dentin matrix protein 1-DMP1), te dentinski sialoprotein (DSP) i dentinski fosfoprotein (DPP). Većina NCP je pronađena i u kostima (20, 21), dok su dentinski sialoprotein (DSP) i dentinski fosfoprotein (DPP) proteini u značajnoj količini ograničeni na zube. Oni su derivati zajedničke gRNK koja kodira zajednički protein poznat kao dentinski sialofosfoprotein (DSPP) (20, 21, 28, 29). Prethodna istraživanja su ukazala na izražaj DSPP-a u funkcionalnim i završno diferenciranim odontoblastima te prijelazni izražaj u presekretornim ameloblastima (20, 21, 29).

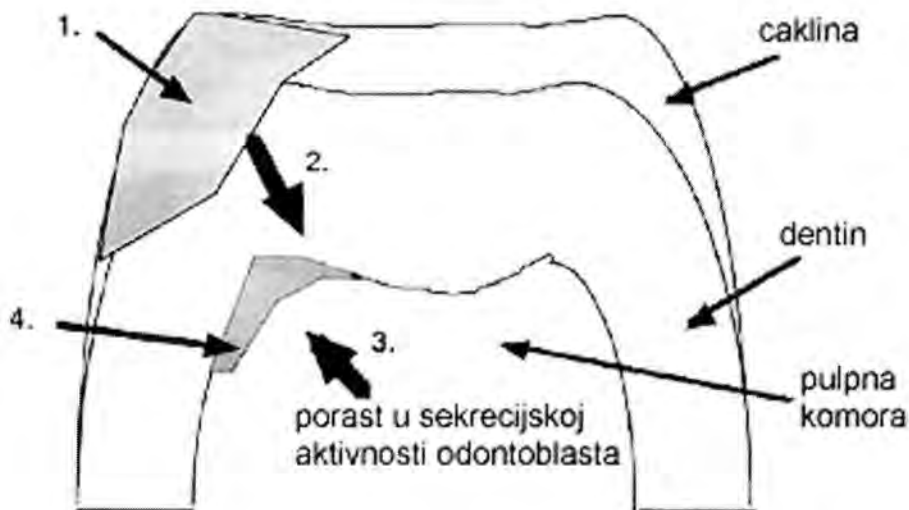


**Slika 5. Korelacija pojedinih proteina s diferencijacijom specijaliziranih stanica poput odontoblasta i ameloblasta.** pOd preodontoblasti; pol Od polarizirajući odontoblasti; S Od sekretorni odontoblasti; Od zreli odontoblasti; PD predentin; D dentin; pAm preameloblasti; pol Am polarizirajući ameloblasti; s Am sekretorni ameloblasti; DSP dentinski sijalo protein (preuzeto iz Bleicher i sur 1999. ).

S ciljem boljeg razumijevanja mehanizama koji stoje iza diferencijacije stanica *in vivo*, mnogi su autori pribjegli *in vitro* modelima pomoću kojih su pokušali reproducirati tijek zbijanja (30-32). Od organskih komponenata dentina, kolagen tipa I je najzastupljeniji (86-90%) (19-21). Prethodna istraživanja pokazala su izravnu povezanost završne diferencijacije odontoblasta i znatno povećanje razine lučenja kolagena tipa I. Regulatorni elementi štakorskog gena (Coll1a1), koji određuju izražaj za kolagen tip I u kosti, zubima i ostalim tkivima, su identificirani (33-36).

### 1.2.3. Ozljede zuba i neodentinogeneza

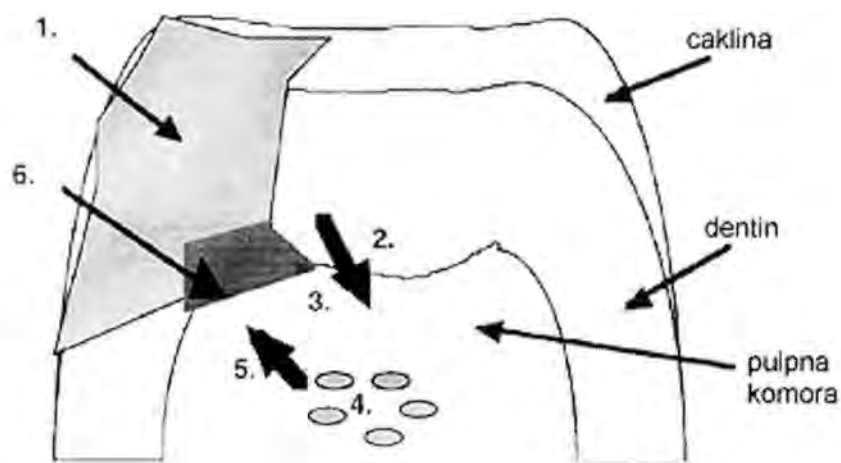
Odontoblasti mogu na određene podražaje, kao npr. karijesne lezije, značajno povećati razinu lučenja izvanstaničnih tvari u cilju zaštite pulpe i stvarati reakcijski dentin. Ti podražaji ne moraju biti izravni, već procesi poput karijesnog mogu dovesti do otapanja dentinskog vanstaničnog matriksa, koji nije inertan nego sarži mnoge bioaktivne molekule. Ove molekule se mogu otopiti u peritubularnoj tekućini i djelovati kao posrednici na obranu i izazvati aktivaciju procesa ubrzanog stvaranja reakcijskog i sklerozaciju postojećeg dentina (18, 37).



**Slika 6. Lučenje reakcijskog dentina kao reakcija odontoblasta na iritaciju i blaži podražaj**  
 1. Dentinska rana kod manje opsežnog karijesa/preparacije kaviteta/restauracije,  
 2. Bioaktivne molekule i dentinski matriks, 3. Povećanje aktivnosti lučenja odontoblasta,  
 4. Lučenje reakcijskog dentina (preuzeto iz Murray 2002).

U slučaju ozljeda, kod kojih dolazi do premašivanja kompenzatornih mehanizama odontoblasta, dolazi do njihovog propadanja i narušavanja integriteta sloja. Iz stanica zubne pulpe se obično izdvoje stanice koje se mogu dijeliti i ponašati kao preodontoblasti. U nedostatku primjerene mehaničke strukture one se ne polariziraju i luče dentinski matriks difuzno, dok se u prisustvu pogodne površine (sterilne nekrotične površine) polariziraju i luče

matriks apikaino (38, 39). Ovaj dentin koji luče novodiferencirane stanice zovemo reparacijski dentin (1).



**Slika 7. Lučenje reparacijskog dentina kao reakcija pričuvnih stanica pulpe na propadanje primarnih odontoblasta.** Opsežna ozljeda pulpe uslijed karijesa / preparacije kaviteta/ resauracije, 2. Pogođeni odontoblasti odumiru, 3. Bioaktivne molekule iz dentina i pulpe difundiraju u pulpu, 4. Prekursorske stanice odontoblasta proliferiraju /migriraju /diferenciraju, 5. Kemotaktilni signali privlače nove odontoblastima slične stanice na mjesto ozljede, 6. Odontoblastima slične stanice se grupiraju paralelno postavljaju i počinju s lučenjem dentinskog mostića. (preuzeto iz Murray 2002)

Kao i u mnogim drugim sustavima i organima, tako i u zubima ne postoji sigurna spoznaja o raspoloživosti i lokalizaciji matičnih stanica. U teških ozljeda, kao npr. dugotrajnog karijesa, traume, prirodnih mana i drugih bolesti, gdje dolazi do uništenja ne samo odontoblasta, nego i okolnih stanica, dolazi do propadanja pulpnog tkiva. Zubi nemaju sposobnost regeneracije izgubljenog cjelokupnog ili većeg dijela pulpnog tkiva. Takav zub je moguće zadržati samo pravovremenom endodontskom terapijom. Ukoliko ipak dođe do gubitka zuba, on se nadoknađuje raznim konvencionalnim metodama, kao na primjer klasičnim fiksnim i mobilnim nadomjestkom ili implantatima. Ovakvi načini oralne rehabilitacije ne omogućavaju fiziološko opterećenje i prijenos sila žvakanja na čeljusti i lubanjske trajektorije. Narušeno fiziološko remodeliranje kosti nakon određenog vremena rezultira neuspjehom i gubitkom preopterećenih preostalih zuba ili implantata.



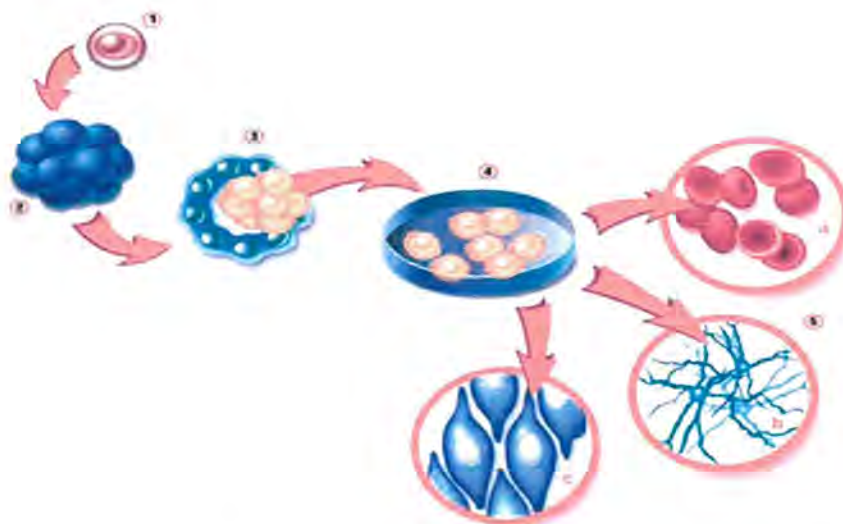
### **1.3. Matične stanice**

Tijekom prošlog stoljeća dobivene su brojne nove spoznaje o stanicama i molekularnim procesima važnim za determinaciju, inicijaciju i morfogenezu razvoja zuba u kralježnjaka. Značajan napredak je također učinjen i u spoznaji uloge embrionalnih, germinativnih i postnatalnih (tkivnih ili adultnih) matičnih stanica u regeneraciji tkiva, što je doprinijelo razvoju tkivnog inženjeringa i biomaterijala (40, 41).

Općenito, matične stanice su stanice podrijetlom iz embrija, fetusa ili odraslog tkiva koje imaju veliku sposobnost umnožavanja te diferencijacije u visoko specijalizirane stanice od kojih su sastavljena tkiva i organi tijela (42-44).

#### **1.3.1. Embrionalne matične stanice**

Embrionalne matične stanice (EMS) se izoliraju iz ranog stadija embrionalnog razvitka [iz unutarnje mase stanica (embrioblasta) morule ili blastociste] te su, za razliku od tkivnih, pluripotentne i iz njih je moguće diferencirati sve vrste stanica koje izgrađuju tkiva odraslog organizma.



**Slika 8. Dobivanje i kultivacija embrionalnih zametnih stanica.** 1. In vitro oplodena jajna stanica, 2. Blastocista (5-7 dana star embrio), 3. Unutarnja zametna masa, 4. Umnožene nediferencirane zametne stanice, 5. Specijalizirane stanice; a krvne, b neuralne, c mišićne.

### 1.3.2. Germinativne matične stanice

Germinativne matične stanice (GMS) se izoliraju kasnije tijekom razvoja embrija (između 5. - 9. tjedana starosti (45)). One su pluripotentne te je iz njih moguće diferencirati većinu staničnih tkiva organizma, premda nije poznato da li i sve vrste stanica kao i iz EMS. Za razliku od EMS, broj dioba GMS u nediferenciranom stanju *in vitro* je znatno ograničen i one prilikom injiciranja u tkiva ne stvaraju teratome.

### 1.3.3. Tkivne matične stanice

Za razliku od embrionalnih i germinativnih, tkivne matične stanice (TMS) su stanice tkivne rezerve, koje se nalaze unutar odraslog specijaliziranog tkiva u “nepobuđenom” stanju (46, 47). One su sposobne stvarati identične vlastite kopije kroz cijeli vijek organizma, ali i diferencirati se po potrebi u druge stanice tkiva u kojem se nalaze. Ta se osobina zove asimetrična dioba. Tkivne matične stanice (TMS) se obično dijele i stvaraju progenitorske ili prekursorske stanice koje pod određenim uvjetima diferenciraju i stvaraju specijalizirane

tipove stanica (46, 47). Nedavno je ustanovljeno da postnatalne tkivne matične stanice posjeduju mnogo veći potencijal diferencijacije u regeneraciji mišića, kosti, hrskavice i dentina, nego što se je to prije pretpostavljalo (46-48).

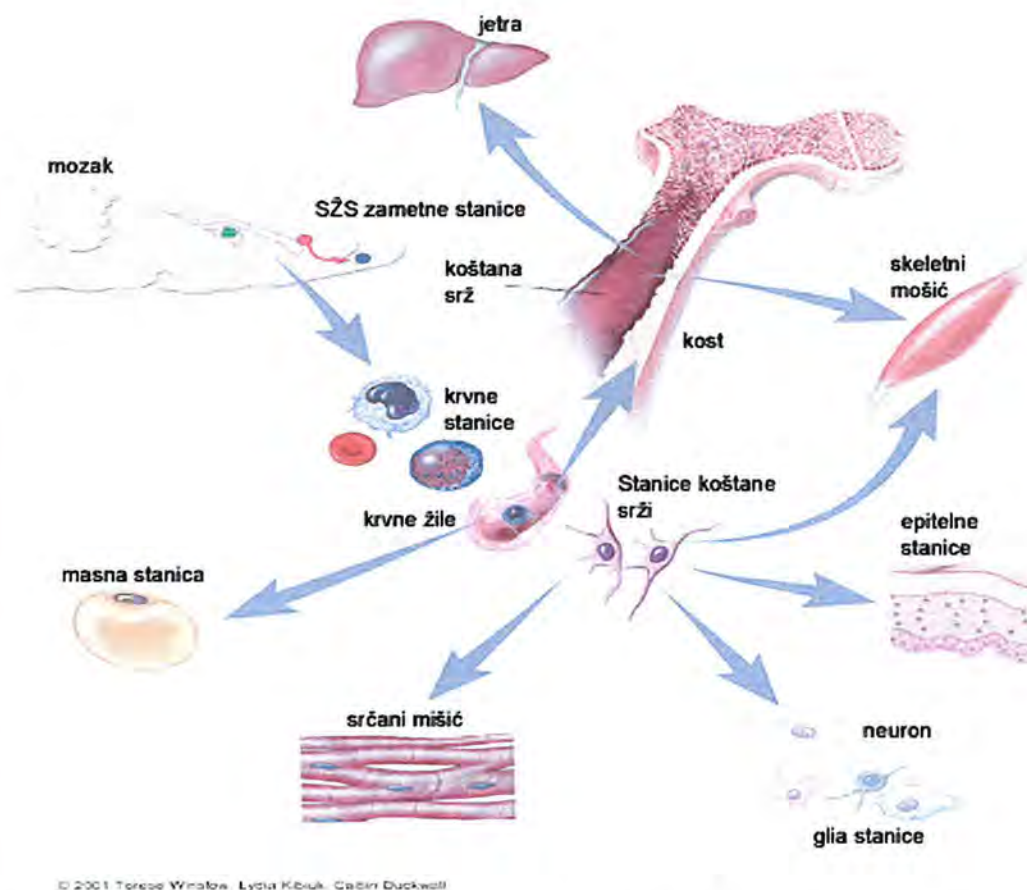
Osnovna saznanja o biologiji matičnih stanica dolaze iz životinjskih modela, posebno mišjeg modela. Matične stanice su pronađene u nekim, ali ne svim odraslim tkivima. Tkiva sa dokazanim matičnim stanicama uključuju koštanu srž, krv, rožnicu oka, mozak, jetru, kožu i crijeva (42-44, 49).

#### **1.3.4. Upotreba matičnih stanica u staničnoj terapiji i tkivnom inženjeringu**

Spoznaje o postojanju i biologiji tkivnih matičnih stanica potakle su razvoj tkivnog inženjeringa. Tkivni inženjering je relativno nova grana u području tkivne regeneracije i podrazumijeva stvaranje novih tkiva iz biomaterijala i staničnih kultura (50, 51). Jedan od pristupa u stvaranju novog tkiva jest pobuđivanje matičnih stanica na procese koji se fiziološki događaju tijekom razvoja (42-44, 49). Za korištenje tog pristupa neophodno je identificirati tkivne matične stanice u odraslom tkivu te signalne molekule koje ih pobuđuju na njihovu diferencijaciju u visoko specijalizirane tkivne stanice.

Tkivni inženjering je do sada uspješno korišten u stvaranju jetrenih i hematopoetskih stanica (42-44, 49). Pokazano je, na primjer, da matične stanice igraju značajnu ulogu u regeneraciji jetre te omogućuju bolje preživljavanje miševa sa eksperimentalno induciranim oštećenjem jetre (52). Potencijal matičnih stanica izoliranih iz koštane srži u regeneraciji kosti je također dobro opisan u literaturi (46, 47, 53-55). Postnatalna koštana srž sadrži dvije populacije matičnih stanica: progenitore hematopoetske i mezenhimske loze. Hematopoetske matične stanice su sposobne stvoriti sve tipove krvnih stanica, dok se matične stanice mezenhimske loze diferenciraju u specijalizirane stanice odgovorne za stvaranje kosti,

hrskavice, masnih stanica i fibroznog vezivnog tkiva, ali i u neuroglia stanice. Ove pluripotentne stanice predstavljaju važan dokaz o postojanju postnatalnih matičnih stanica u odraslom tkivu.



**Slika 9. Postnatalne matične stanice koštane srži.** Zadržale su sposobnost preusmjeravanja u pojedine stanične loze. (preuzeto s <http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics4.asp>)

Tijekom razvoja zuba, međusobne sprege između epitelnih stanica unutarnjeg lista caklinskog organa i mezektoderma dovode do diferencijacije stanica zubne papile u odontoblaste i diferencijacije stanica unutarnjeg lista caklinskog organa u ameloblaste od kojih svaka vrsta luči specifične izvanstanične produkte i posljedično komponente dentina odnosno cakline. Zubna pulpa je prokrvljeno rahlo vezivno tkivo koje hrani dentin (24-27). Stanične komponente zubne pulpe su odontoblasti, fibroblasti, makrofazi i limfociti (1, 24-27). Fibroblasti su najzastupljeniji od svih staničnih tipova. Drugi po zastupljenosti u zubnoj

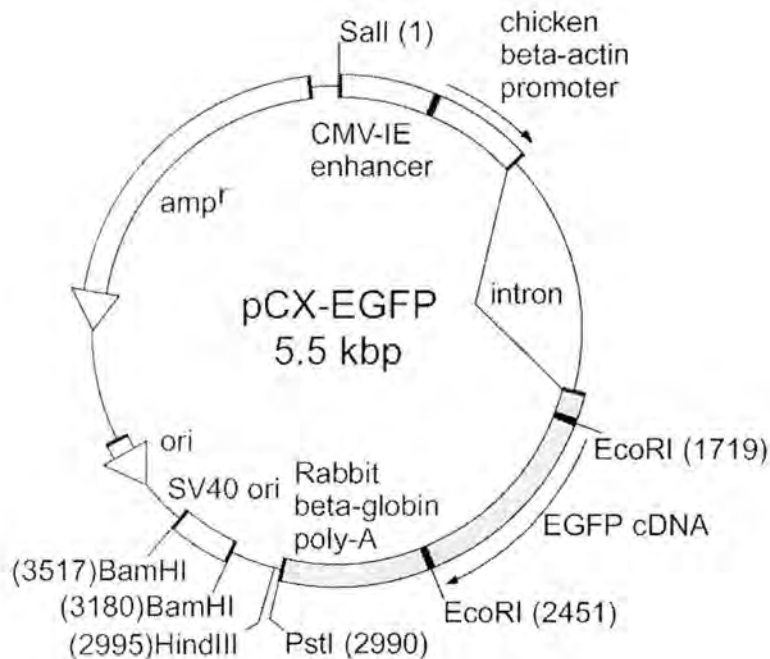
pulpi su odontoblasti. Oni se nalaze u jedinstvenom sloju na periferiji pulpe. Za fibroblaste ili stanice poput fibroblasta se smatra da se u određenim okolnostima mogu transformirati i ponašati poput preodontoblasta i kasnije odontoblasta (56). Usprkos nepostojanju nedvojbenog dokaza o porijeklu matičnih stanica pulpe, značajan kapacitet zubne pulpe u reparaciji i regeneraciji dentina ukazuje na realnu mogućnost postojanja pluripotentnih matičnih ili progenitorskih stanica u mladoj zubnoj pulpi.

#### **1.4. Transgenične životinje i postupak njihovog dobivanja**

Znanstvenicima su do nedavno za praćenje aktivnosti gena unutar tkiva bile na raspolaganju tehnike *in situ* hibridizacije, Northern blot analize i RT-PCR. Za sve ove tehnike potrebno je tkiva fiksirati. *In situ* hibridizacija pruža točnu lokalizaciju trenutnog traženog izražaja gena, ali ne daje njegovu točnu jačinu jer ovisi o korištenoj probi, njezinoj dužini koja utiče na njenu sposobnost difuzije u tkivo i vezanja, trajanju hibridizacije, dužini ekspozicije fotografske emulzije, temperaturi i ostalim čimbenicima koje nije moguće sve odjednom reproducirati. Tkivo koje se tako promatra može se obilježiti samo jednom probom te nije moguće promatrati koizražaj drugih molekula na istom uzorku. Kod korištenja Northern blot i RT-PCR analize, koje su osjetljivije jer je kod njih izražaj sumiran i pojačan izolacijom RNK cijelog tkiva ili pojačavanjem slabih izražaja RT-PCR-om, moguće je odrediti relativnu jačinu izražaja, ali ne i njihovu točnu lokalizaciju. Ovim tehnikama se ne može pratiti migracija, interakcija ili diferencijacija ciljanih stanica jer je postupak fiksacije nepovratan, a dobivene informacije govore samo o trenutnom stanju.

Razvojem molekularne biologije postalo je moguće manipulirati genomom pojedinih stanica, ali i čitavih višestaničnih organizama (transgenične životinje i biljke). Tako je postalo moguće ciljano utišati pojedine gene (*eng.* knock out), ili ih ubaciti pod regulatornim sekvencama drugih gena i time potaknuti njihov ektopični izražaj ili pak ubaciti neki gen koji

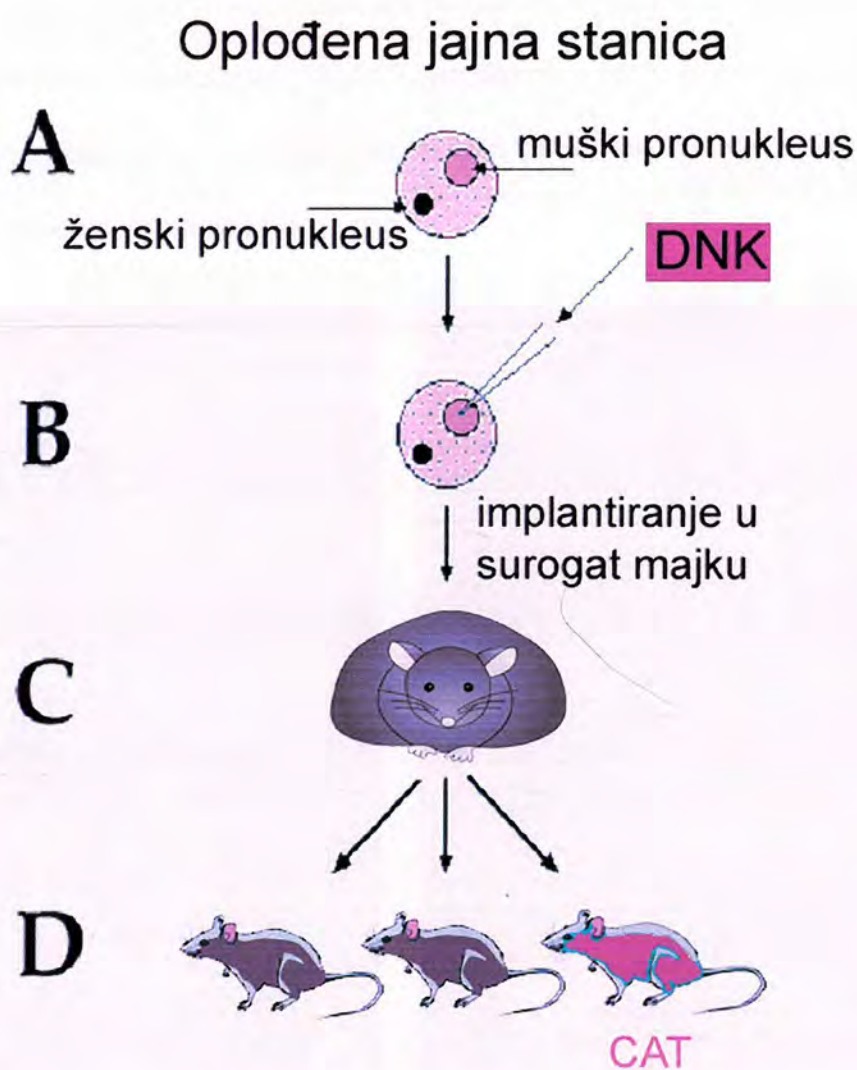
nije uopće prisutan u istraživanom genomu, već potiče iz druge vrste (*eng.* transgene). Priprema stvaranja transgeničnih životinja se vrši stvaranjem DNK konstrukta (vektora). Konstrukt za dobivanje transgeničnih životinja mora sadržavati regulacijske elemente (promotor, pojačivač, transkripcijski stop) kao i kodirajući slijed baza (najčešće cDNK). Ubačeni gen može biti neki endogeni gen koji će se pod kontrolom promotora aktivirati i izazvati ektopični izražaj ili će služiti kao biljeg aktivacije korištenog promotora (gen biljeg). Cijeli konstrukt se uklopi u plazmid da bi bio umnožen u bakterijama.



**Slika 10. Prikaz plazmida korištenog u stvaranju "zelenog miša".** Sadržava u svojem kodirajućem slijedu transgenični konstrukt beta-aktinskog promotora i eGFP biljeg gen (preuzeto s <http://kumikae01.gen-info.osaka-u.ac.jp/tg/greenmouse.cmf/link> ).

Transgenični konstrukt se obično testira transfekcijom staničnih linija *in vitro* kako bi se provjerila učinkovitost njegovog izražaja. Nakon pozitivnog rezultata prelazi se i na stvaranje transgeničnog višestaničnog organizma. Transgenični konstrukt se mikroinjektira u

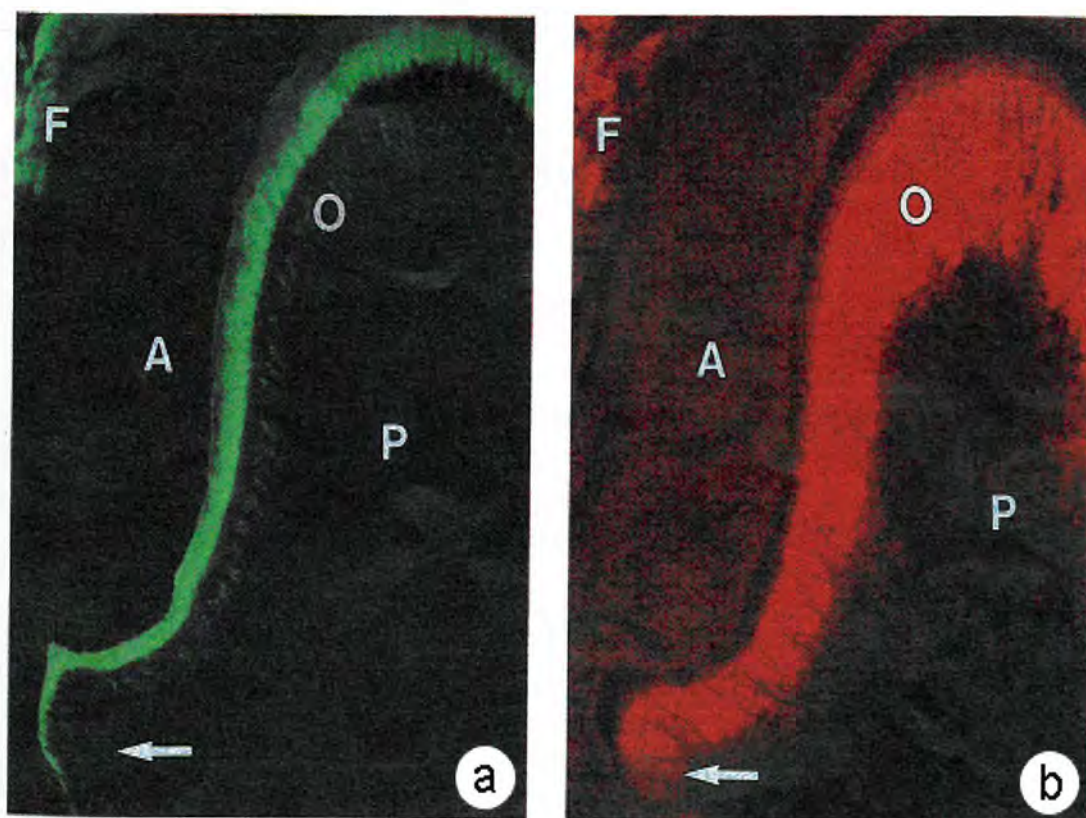
muški pronukleus oplodene oocite (zigote) i ondje se nasumično (nehomologno) integrira u DNK domaćina. Jajašca se implantiraju u surogat majke (pseudotrudne ženke). Ovako dobiveni mladunci se pretražuju na genski biljeg. Odabiru se mladunci s odgovarajućim izražajem (kriteriji su jačina i specifičnost izražaja) genskog biljega, gdje jačina i specifičnost izražaja biljeg gena ovise o mjestu integracije u genomu, a na njega se ne može experimentalno utjecati.



*Slika 11. Diagram postupaka u stvaranju transgeničnih životinja CAT – transgenični miš je nosilac biljeg gena kloramfenikol acetil transferaza*

### 1.4.1. Genski biljezi i njihova upotreba u eksperimentalnim istraživanjima

Koštane stanice, osteoblasti, tijekom procesa diferencijacije naglo povećavaju lučenje kolagena tip I. Stoga su prethodno stvorene transgenične životinje (miševi) koje izražavaju biljeg gen pod kontrolom različitih dijelova promotorske regije gena za štakorski kolagen tip I kako bi se mogla proučavati migracija i sudbina stanica u kojih je aktivna ova promotorska regija. Ovako stvorene prve transgenične životinje imale su kloramfenikol acetil transferazu (CAT) biljeg gen pod kontrolom promotorskih fragmenata za kolagen tipa I različitih dužina. Tako je ustanovljeno da su fragmenti od 2.3kb i 3.6kb aktivni u kosti, dok su kraći fragmenti značajno slabijeg izražaja (36). U zubima je također pronađena visoka aktivnost istih transgena u aktivnim odontoblastima (57).



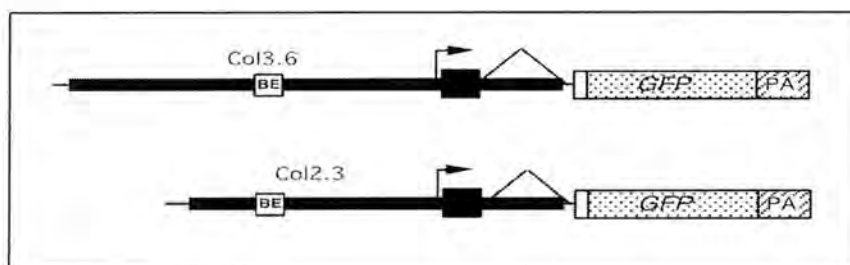
**Slika 12. Izražaj endogenog kolagena Tip I (lijevo a) i CAT biljeg gena (desno b) kod zubnog zametka. A, ameloblasti; O, odontoblasti; P, zubna pulpa; F zuba vrećica (Preuzeto iz Thomas 1995).**



No, upotreba novih biljnih gena omogućila nam je praćenje izražaja pojedinih gena ne samo u fiksiranim, već i u živim stanicama. Ovi geni proizvode proteine koji se mogu pratiti u živim stanicama preskačući postupak fiksacije. Oni, obasjani svjetlošću određene valne duljine, fluoresciraju, tj. bivaju pobudeni i emitiraju svjetlost koja se može u mraku lako otkriti. Shimomura je prvi izolirao jednu takvu molekulu iz planktona *Aequorea victoria* te ju je nazvao zeleni fluorescentni protein (engl. green fluorescent protein - GFP). Ovako izolirani protein nije se mogao koristiti u svrhe molekularne biologije sve dok se nije odredila njegova struktura i DNK kodirajući niz. To je prvi put uspješno pošlo za rukom prof. Chalfie-u sa sveučilištu Collumbia (58) koji je GFP gen klonirao u vektor i njime transficirao staničnu liniju u kojoj je on bio izražen.

### 1.5. *Coll1a1*-GFP transgenični miševi

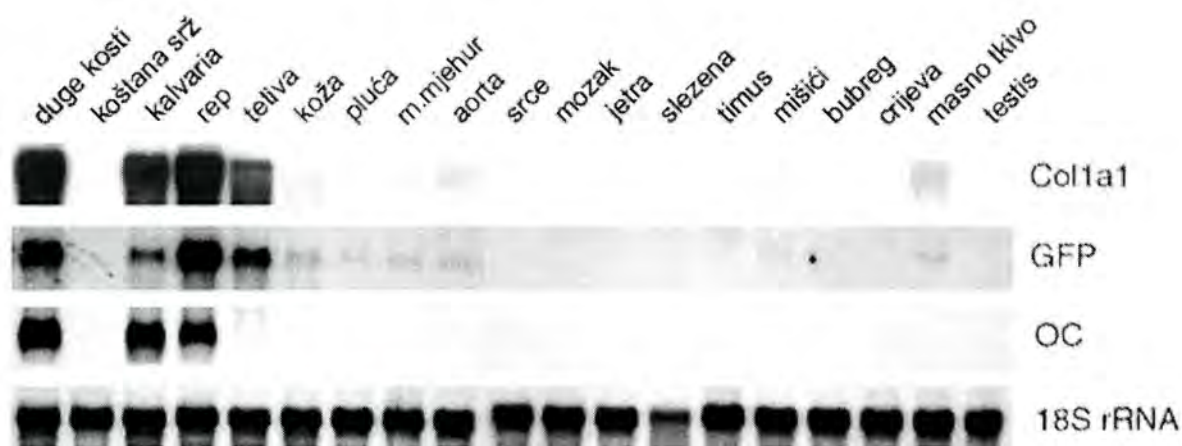
Kako bi se proučio razvojni put stanica koje izražavaju gen za kolagen tip I, stvoreni su transgenični miševi u kojih je pod kontrolom promotorske regije štakorskog *Coll1a1* gena ubačen biljni gen koji kodira zeleni fluorescentni protein (GFP) (59).



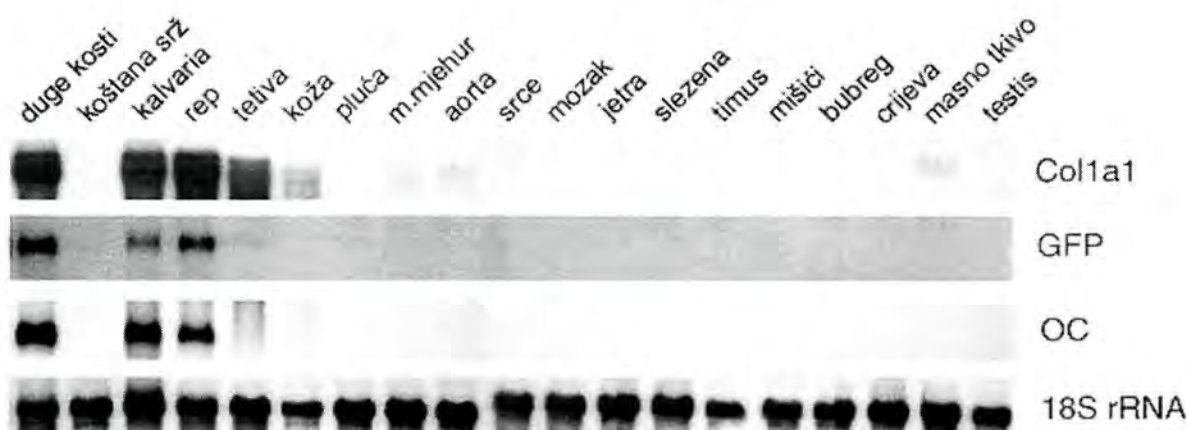
**Slika 13. Shema konstrukcije transgeničnih linija spajanja *Coll1a1* fragmenata promotora s GFP biljnim genom.** Col3.6 promotorski fragment od 3.6 kb; Col2.3 promotorski fragment od 2.3 kb štakorskog *Coll1a1* promotora; BE ubačeni intron; GFP kodirajući niz za zeleno fluorescentni protein; PA poli A stop signal (preuzeto iz Kalajzic i sur. 2002).

Dobivene su dvije transgenične linije, upotrebom fragmenata promotorske regije izvornog štakorskog gena veličine 2.3 i 3.6 kb, te su one analizirane u pokusima *in vivo* i *in*

*in vitro*. Izražaj Coll1a1-GFP gRNK i proteina u ovih miševa ukazuje na to da je promotorski fragment veličine 3.6 kb odgovoran za ekspresiju Coll1a1-GFP u većini tkiva koja produciraju kolagen tipa I, dok fragment veličine 2.3 kb ograničava njihovu ekspresiju samo na kosti i tetive (59).



**Slika 14.** Aktivnost po izoliranim tkivima Coll1a1-3.6GFP transgeničnih životinja: endogenog kolagena tip I (Coll1a1), zeleno fluorescentnog proteina (GFP) i osteokalcina (OC), te ribosomske 18S RNK kao pokazatelja integriteta izolirane RNK signal (preuzeto iz Kalajzic i sur. 2002).



**Slika 15.** Aktivnost u pojedinim tkivima Coll1a1-2.3GFP transgeničnih životinja: endogenog kolagena tip I (Coll1a1), zeleno fluorescentnog proteina (GFP) i osteokalcina (OC), te ribosomske 18S RNK kao pokazatelja integriteta izolirane RNK signal (preuzeto iz Kalajzic i sur. 2002).

U *in vitro* pokusima diferencijacije kalvarijskih stanica transgeničnih miševa, Colla1-GFP transgen pod kontrolom promotorskog fragmenta veličine 3.6 kb je bio izražen u ranijim stadijima diferencijacije osteoblasta, dok je njegov izražaj pod kontrolom 2.3 kb fragmenta uočen u kasnijim fazama diferencijacije osteoblastnih staničnih kultura (59).

Razinu izražaja Colla1-GFP biljeg proteina je moguće odrediti u živim izoliranim stanicama. Određivanje se vrši analizom protočne citometrije (*engl.* Fluorescence Activated Cell Sorter - FACS) analizom kojom se u suspenziji pojedinačnih stanica može odrediti proporcija stanica koje imaju izražen GFP biljeg, kao i razina njegovog izražaja. Tako je u svježe izoliranim stanicama neonatalne kalvarije pOB3.6GFP transgeničnih miševa utvrđeno 50% GFP pozitivnih stanica, dok je pOB2.3GFP miševa bilo 20% GFP pozitivnih. Tijekom kulture tih stanica ovaj se postotak mijenjao što je ovisilo o aktivaciji ili deaktivaciji transgena za vrijeme njihove diferencijacije.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada je bio istražiti da li se i u kojem slučaju Col1a1-GFP izražen pod kontrolom fragmenta promotorske regije štakorskog gena za kolagen tipa I (2.3 kb) može koristiti u obilježavanju pojedinih diferencijacijskih faza odontoblasta te utvrditi mogućnost postojanja progenitorske loze odontoblasta u postnatalnoj zubnoj pulpi miša. Tkivne matične ili progenitorske stanice zubne pulpe nastojali smo identificirati i izolirati koristeći se Col1a1-GFP transgenom te ih u *in vitro* uvjetima pobuditi na diferencijaciju u aktivne, specijalizirane stanice koje su sposobne lučiti DIS te posjeduju biljege specifične za zrele odontoblaste.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Laboratorijski miševi

Transgenična mišja linija (donori) pOBCo12.3GFP bila je uzgojena na Odjelu transgeničnih životinja u UCHC, CT, Farmington, USA. SCID miševi (3-4 tjedna starosti) koji ne posjeduju ni T ni B limfocite i time ne odbacuju strano tkivo (kao primaoci), korišteni su za transplantacijske pokuse. Miševi su uzgajani u kavezima sa mikrofilterima. Transplantacije su obavljene u sterilnim uvjetima i u općoj anesteziji koja je bila inducirana intraperitonealnom administracijom ketamine/zylazine (87mg/kg i 13mg/kg). Operacije su svedene na minimum po opsegu traume, a u cilju osiguravanja što manjeg stresa za pokusne životinje. Nakon operacije nije uočena značajna razlika u ponašanju i napredovnju životinja u odnosu na kontrolne, netretirane skupine miševa. Pokusni miševi su žrtvovani 5-6 tjedana nakon transplantacije, pod CO<sub>2</sub> narkozom, cervikalnom dislokacijom. Prednost Colla1-GFP transgeničnih miševa, u odnosu na druge modele, bila je u specifičnom izražaju biljega (GFP-a) u tkivima koja stvaraju kolagen, te mogućnosti otkrivanja transgena ne samo u fiksiranim tkivima i stanicama, nego i u živim stanicama i tkivima s mogućnošću njihove međusobne usporedbe.

#### 3.2. Histološke tehnike priprema uzoraka

U pokusima su korištena tkiva heterozigotnih miševa dobivenih križanjem transgeničnih homozigota Colla1-GFP(mužjaci) i CD-1(ženke) miševa. S ciljem određivanja razvojne raspodjele izražaja transgena, miševi su žrtvovani u različitim razvojnim stadijima zuba radi histoloških i fluorescentnih ispitivanja. Tkiva su nakon disekcije uronjena u ledeno/hladni 1xPBS (eng. phosphate buffered saline pH 7.4; Gibco BRL) te fiksirana u 4% paraformadlehidu u PBS-u (4% pfa) na +4°C uz mehaničku agitaciju 1-5 dana ovisno o

starosti radi prodiranja fiksativa u dublje i mineralizirane dijelove tkiva uz očuvanje strukture. Mineralizirana tkiva nisu bila pogodna za ispitivanje pomoću parafinskih histoloških rezova, koji najbolje prikazuju tkivnu morfologiju, jer su po tvrdoći visoko iznad parafina. Stoga ih je bilo potrebno prije uklapanja demineralizirati. Tkiva su demineralizirana u 10% EDTA pH 8.0 tijekom 0-7 dana, što je ovisilo o starosti životinja. Tkiva su postupno dehidrirana u etanolu rastućih koncentracija, pročišćena u ksilolu te uklopljena u parafin. Rezovi od 5-7  $\mu\text{m}$  su položeni na Probe ON plus (Fisher scientific) predmetna stakalca.

### 3.3. Histološka bojenja

Rezovi su analizirani standardnim histološkim bojenjima poput: HE za osnovnu morfologiju te anilinskim modrilom (bojanje po Mallory-iju) za vizualizaciju izvanstaničnog kolagena (60). Histološki preparati analizirani su pod mikroskopom Nikon Eclipse 600, a nalaz je dokumentiran korištenjem Spot RT TM digitalne kamere (Diagnostic instruments Inc, Sterling Heights, MI).

### 3.4. Analiza fluorescencije GFP-a na histološkim rezovima

Aktivacija transgeničnog kolagenskog promotora i posljedični izražaj Colla1-GFP-a označava stanice s aktivnim endogenim kolagenskim genom pomoću zeleno fluorescerirajućeg proteina (GFP) koji se zadržava unutar stanice te pobuđen fluorescentnim svjetlom određene valne duljine emitira zelenu svjetlost .

Predmetna stakalca sa serijskim rezovima tkiva u neposrednoj blizini rezova ispitivanih osnovnim histološkim bojenjima su deparafinizirana u ksilolu po dvije izmjene od 15min te postepeno hidratizirana u silaznim koncentracijama alkohola i pripremljena za fluorescentnu analizu mješavinom glicerol/PBS (omjer 1:1 ). Tkiva su promatrana pod mikroskopom Nikon

Eclipse 600 uz fluorescentno svjetlo i dvovalni filter (FITC i Texas Red). Nalaz je dokumentiran korištenjem Spot RT TM digitalne kamere.

### 3.5. *In situ* hibridizacija na histološkim rezovima

Aktivni geni u stanicama se prepisuju u gRNK koje se mogu dokazati hibridizacijom sa specifičnim komplementarnim probama koje su obilježene biobiljegom ili s radioaktivnim izotopom. Prednost *in situ* hibridizacije jest mogućnost usporedbe specifičnog signala (izražaja) između pojedinih stanica, a nedostatak metode je taj što nije u mogućnosti otkriti niski izražaj promatranih gena u stanicama.

S ciljem ispitivanja ekspresije gRNK za *DSPP* i *DMP-1* gene, izvršena je *in situ* hibridizacija po prethodno ustanovljenom protokolu (61). Probe su dobivene na slijedeći način: fragment veličine 1,4 kb mišje cDNA u pBluescript-u (ljubaznošću M. MacDougall) pocijepan je s EcoRI ili SacI te *in vitro* prepisan s T3 i T7 RNK polimerazom kako bi se dobile "antisens" i "sense" probe (29). Riboprobe su obilježene s  $^{32}\text{P}$ -UTP i djelomično hidrolizirane jer se je radilo o probi većoj od 1 kb. Nakon *in situ* hibridizacije tkiva su kontra-bojena sa hematoksilinom (10-15s), uklopljena Permount smolom (Biomedica, Foster City, CA, USA), te analizirana u tamnom polju na Nikon Eclipse 600 mikroskopu. Nalaz je dokumentiran korištenjem Spot RT TM digitalne kamere.

### 3.6. Transplantacija intaktnih dijelova pulpe

U cilju ispitivanja regeneracijskog potencijala stanica unutar intaktnih dijelova pulpe s endogenim izvanstaničnim matriksom, dijelovi zubne pulpe su transplantirani na mjesto koje omogućava ishranu i diferencijaciju tkiva.

Koronarni dijelovi pulpe prvih mandibularnih molara su izolirani iz 5 dana starih transgeničnih heterozigotnih miševa (bez obzira na spol). Pripremljeno pulpno tkivo bez

diferenciranih odontoblasta, je transplantirano pod bubrežnu kapsulu domaćina (62). Domaćini su eutanazirani 7, 10 i 14 dan nakon implantacije, a tkivo fiksirano u 4% parafinu na +4°C uz mehaničku agitaciju 1-5 dana. Dio dobivenih tkiva je pripremljen za demineralizaciju (10% EDTA) te je uklopljen u parafin. Serijski rezovi su naizmjenično korišteni za histološku analizu te *in situ* hibridizaciju (prethodno opisanim načinom). Histološka analiza se je sastojala od fluorescentne analize te analize preparata obojenih HE ili anilinskom modrilom po Malory-u (60).

### 3.7. Histokemijsko bojenje minerala

Sadržaj minerala u novostvorenom tkivu je osnovni preduvjet za dokazivanje hipoteze o sposobnosti stvaranja dentina, a detekcija je izvršena bojanjima specifičnim za kalcij u komadićima tkiva (pregledno ispitivanje) te histološkim rezovima (detaljno ispitivanje). Ne-demineralizirano tkivo se ne može rezati uklopljeno u parafin uslijed razlike u tvrdoći, pa su se radili smrznuti rezovi. Ne-demineralizirano tkivo je testirano na sadržaj minerala taktilno i specifičnim bojanjem. Specifičnim bojanjem ne-dekalciniranih rezova s Alizarin Red-S (pH 4.3) dokazan je mineral u histološkim smrznutim rezovima, a u cjelovitom transplantiranom tkivu bojanjem u Alizarin Red/Alcian Blue (0.015% Alcian Blue, 0.005% Alizarin red u 1% kiselom alkoholu) (60).

### 3.8. Kultura stanica zubne pulpe

Matične stanice izdvojene iz prirodne sredine se mogu u strogo kontroliranim uvjetima promatrati i/ili zadržati u nediferenciranom obliku, ali i po potrebi pobuditi i usmjeravati u diferencirane oblike.



Primarne stanice dobivene iz organizama u *in vitro* uvjetima prilagođenim za njih, mogu nastaviti većinu svojih funkcija kao i u *in vivo* uvjetima te se može njima preciznije i raznovrsnije manipulirati i ispitivati ih detaljnije nego je to moguće u živim organizmima.

Zubne pulpe su izolirane iz mandibularnih i maksilarnih prvih molara od 5 dana starih heterozigota odvajanjem od mineraliziranih dijelova zubne krune. Pulpno tkivo je enzimatski razgrađeno na pojedinačne stanice pomoću mješavine enzima (0.05% Trypsina (Gibco BRL) i 0.1% kolagenaze P (Boeringer, Mannheim)), na 37°C uz 90 o/min mehaničku agitaciju. Nakon razgradnje međustaničnih tvari, enzimi su inaktivirani dodatkom hladnog staničnog medija (Dulbecco's Modified Eagle's medium - DMEM) sa fetalnim telećim serumom (FCS). Stanice su centrifugirane i resuspendirane. Suspenzija pojedinačnih stanica se je dobila propuštanjem mješavine stanica i enzima kroz mrežice veličine otvora 70µm (Falcon) koje omogućuju prolaz samo pojedinačnim stanicama. Stanice su potom zasađene u različitim gustoćama ( $0.5 - 5.0 \times 10^5$  stanica/jažici) u ploče sa 6 jažica (35mm) (Costar) te hranjene s DMEM uz dodatke 10% FCS, 100µM L-askorbinske kiseline, 2mM L- glutamina, 100 U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin. Stanice su inkubirane na 37°C uz 5% CO<sub>2</sub> do 25 dana. Diferencijacija stanica je stimulirana dodatkom 50 µg/ml askorbinske kiseline, 10 nM deksametazona te 8 mM β-glicerofosfata (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) koji su se pokazali uspješni u stimulaciji diferencijacije stanica koštane srži (59).

### 3.9. Protočna citometrija

Colla1-GFP transgen u stanicama s aktivnim promotorom je moguće detektirati uz pomoć protočnog citometra. Uskim snopom laserskog svjetla odgovarajuće valne duljine pobudi se fluorescencija GFP-a unutar živih stanica čiji se intenzitet potom detektira i očita. Odnosi broja te intenziteta fluorescencije stanica s aktivnim i stanica s neaktivnim transgenom mogu se brojčano izraziti i analizirati.

Prethodno kultivirane stanice su bile dva puta oprane u PBS-u prije nego što su podvrgnute protočnoj citometriji. Protočna citometrijska analiza je sprovedena na protočnom citometru (FACSscan Calibur; Becton Dickinson) korištenjem 15 MW argonskog lasera ekscitacijske valne dužine 488 nm. Emisija svjetla je detektirana korištenjem 500 nm filtera (GFP). Stanice netransgenične mišje linije iste starosti i istog tkiva su korištene kao negativna kontrola.

### 3.10. Northern blot analiza

Svi se aktivni geni u stanicama prepisuju u gRNK. Ona se može iz promatranog tkiva ili stanica izolirati te potom analizirati. Izolacija ukupne gRNK iz nekog tkiva omogućuje otkrivanje slabije izraženih gena te mjerenje njihove prosječne aktivnosti na temelju intenziteta hibridizacije za specifične gene.

Totalna RNA iz različitih tkiva izolirana je korištenjem guanidin i thiocyanate/phenol-phenol metode. Uzorak od 10 µg ukupne izolirane stanične RNA je denaturiran s formamide-formaldehidom, razdvojen elektroforezom na 1% agaroznom gelu i naposljetku prebačen na najlonsku membranu. Plazmidi sa cDNA su pripremljeni kako je to prethodno opisano (36, 63). Membrane su prehibridizirane po standardnom protokolu te hibridizirane sa cDNA probama ciljnih gena prethodno obilježenih radioaktivnim izotopom fosfora ( $^{32}\text{P}$ -CTP).

### 3.11. RT-PCR analiza

Približno 3µg ukupne RNK je za svaki uzorak je reverzno prepisano pomoću Superscript II reverse transcriptase (Life Technologies, USA) uz dodatak oligo dT primera. Umnažanje dobivenog produkta je izvršeno pomoću Ready-to-GO PCR beads (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway; NJ, USA) te specifičnim početnicama za DSPP (napried GGC ATA ATC AAA ACA CCG CTG C; nazad GGG GAA ATA GGG AAA TGA CAA AGG) u slijedećim uvjetima. PCR umnažanje je vršeno u 30 i 35 ciklusa denaturacijom na

94°C 30 sekundi, prijanjanje na 56.3°C 30 sekundi, elongacija na 72°C 1 minutu. Ovi nukleotidi su odgovarali nukleotidima 3355 i 3910 5 eksona DSPP gena (MacDougal i sur 1998.).

Početnice iz komercijalno raspoloživih izvora su korištene za pojačanje GAPDH (Clontech Ct.N. 5409-1; lot 2090360) te su korištene u slijedećim uvjetima: broj ciklusa 23, denaturacija na 94°C 45 sekundi, prijanjanje na 60°C 45 sekundi, elongacija na 72°C 1.15minute.

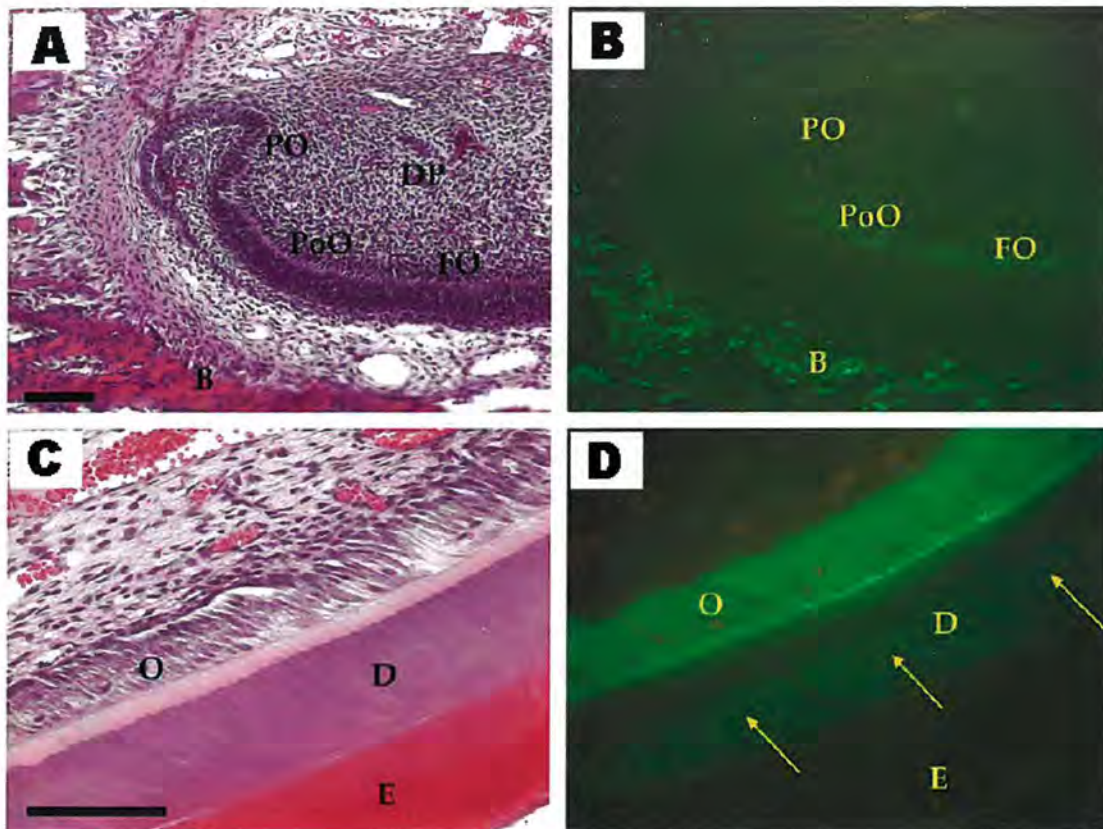
PCR produkti su razdvojeni elektroforzom u 1% agaroznom gelu, obojeni s etidjum bromidom i slikani. Specifičnost DSPP produkta je potvrđena cijepanjem pomoću *Hind*III koja reže DSPP produkt od 556 pb na nejednake dijelove od 331 pb i 225 pb. Sve reakcije su ponavljane s minimalno dva nezavisna RNK uzorka. Za kontrolu kontaminacije su korišteni uzorci bez izvršene reverzne transkripcije sa specifičnim početnicama za GAPDH i DSPP te u skladu s očekivanjem nisu dale produkte.

## 4. REZULTATI

### 4.1. *Colla1*-GFP gen je specifično izražen u funkcionalnim i zrelim odontoblastima tijekom razvoja zuba

Osobitost glodavaca jest da njihovi incizivi nakon nicanja neprekidno rastu nadomještajući glodanjem izgubljeno tkivo. Ostvarenje ove osobitosti im omogućava rezervoar zametnih stanica u korijenu tih zuba koje se neprekidno diferenciraju i podržavaju rast inciziva. Te stanice ne posjeduju biljege zrelih stanica u koje se diferenciraju kao što su odontoblasti i ameloblasti, a koji luče matriks potreban za stvaranje dentina i cakline.

S ciljem potvrde teze o postnatalnom postojanju nediferenciranih stanica i dobivanja dodatnih informacija o njihovoj lokalizaciji promatrani su konstantno rastući incizivi (P13) u *Colla1*-GFP miševa. *Colla1*-GFP nije detektiran u području vrška korijena inciziva, odnosno cervikalnoj ili vratnoj petlji (*eng. Cervical loop*). To područje vrška korijena sadrži nezrele stanice i stanice pred diferencijacijom u pojedine specijalizirane stanice epitelialnog i mezenhimnog podrijetla. Preodontoblasti (PO), kao ni polarizirajući odontoblasti (PoO), ne izražavaju *Colla1*-GFP. *Colla1*-GFP je detektiran najranije u funkcionalnim odontoblastima (FO) položenim uz tanak sloj prvoizlučenog predentina (slika 16A i B) te se postepeno pojačavao usporedno sa stupnjem maturacije i bio konstantno izražen u zrelim odontoblastima (O) (vidljivo na slici 16D). Zreli odontoblasti pružaju duboko citoplazmatski nastavak, u kojem je *Colla1*-GFP također detektiran cijelom dužinom, sve do dentinsko-caklinskog spoja (označeno strelicama na slici 14D). Izražaj *Colla1*-GFP transgena prisutan je i u stanicama alveolarne kosti koja okružuje incizive. Slab, ali prisutan *Colla1*-GFP izražaj nalazi se i u pojedinim stanicama zubne pulpe (DP) (Slika 16B.).

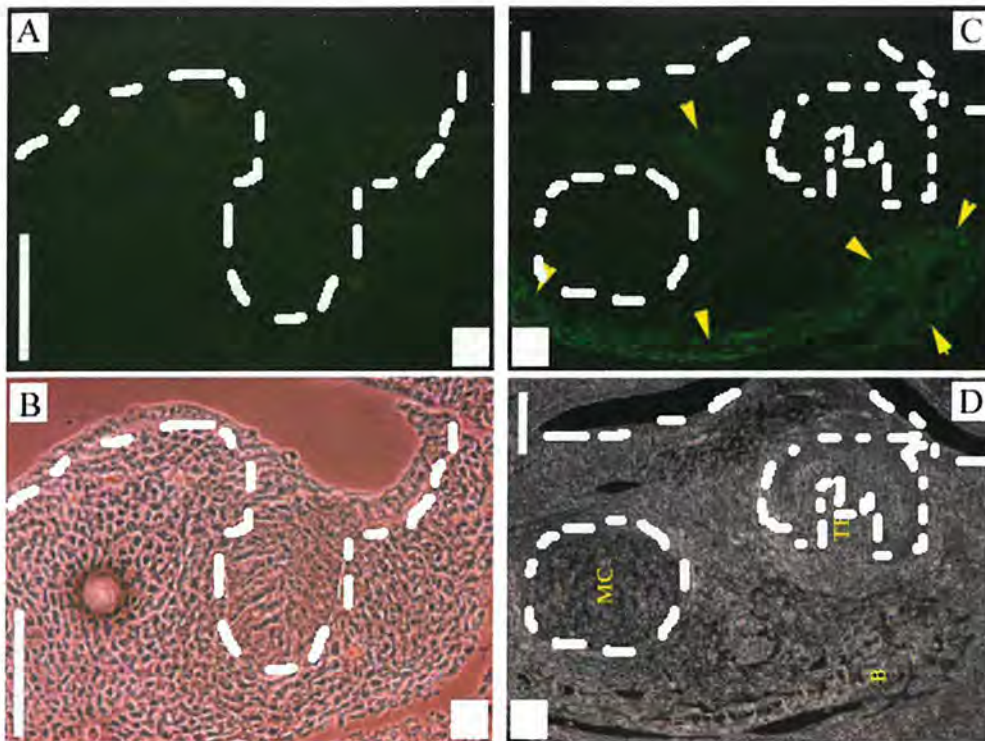


**Slika 16. Coll1a1-GFP izražaj kod 13 dana starih miševa** HE bojanje (A, C), Prikaz fluorescencije (B, D), su slike rezova kroz postnatalne zubne zametke mandibularnih inciziva P13. **A i B** cervikalna petlja inciziva s nediferenciranim stanicama: preodontoblasti (PO) te polarizirajući odontoblasti (PoO) ne izražavaju Coll1a1-GFP. Funkcionalni odontoblasti (FO) blago pozitivno izražavaju Coll1a1-GFP. Coll1a1-GFP je izražen i u pojedinim stanicama zubne pulpe (DP). **C** incizalni kraj sadrži zrele odontoblaste koji pružaju svoje nastavke duboko u dentin. Vidljiv je i sloj cakline (E) nad dentinom. **D** zreli odontoblasti (O) izražavaju visoke razine Coll1a1-GFP-a koji se može detektirati i cijelom debljinom dentina (D) unutar njihovih citoplazmatskih nastavaka (označeni strelicama). Mjerila u slikama=100 $\mu$ m

S ciljem dobivanja točnijih podataka o lokalizaciji početka Coll1a1-GFP i lokalizaciji zametnih stanica, promatrani su molari u različitim fazama razvoja.

U vrijeme rane faze razvoja molara (faze inicijacije, pupoljka, fazi kape; E10 – 15) izražaj Coll1a1-GFP biljeg gena nije detektiran u tkivima budućih zuba (prikazano na slikama 17A-D). Oko zubnog zametka u kondenzirajućem mezenhimu, kao osnovi buduće koštane

strukture mandibule (B), Coll1a1-GFP je detektiran u mladim osteoblastima (prikazani vrhovima strelica na slici 1C).

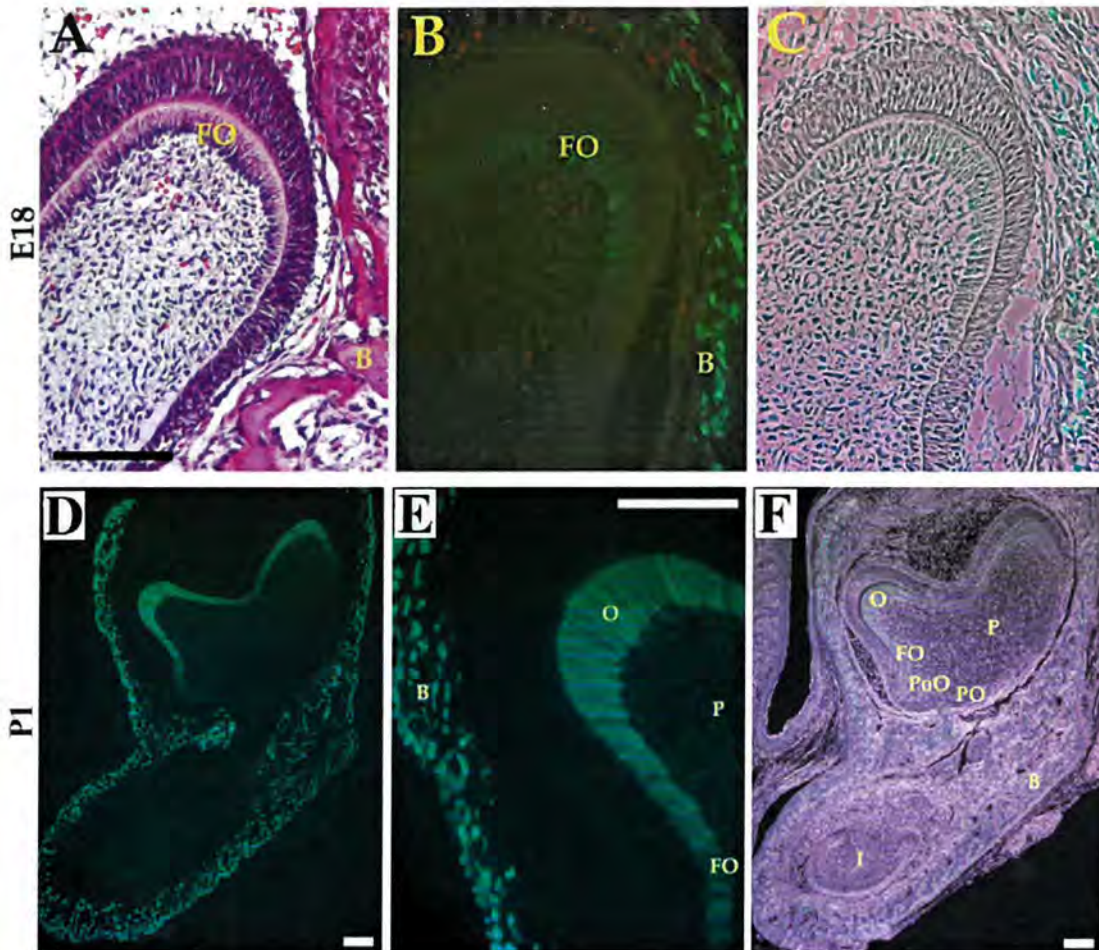


**Slika 17. Slike rezova učinjene kroz embrionalne zubne zametke mandibularnih molara E13 (A i B) i E14 (C i D).** Prikaz fluorescencije (A, C) i slike tamnog polja (B, D). Za sve rezove je slikano prvo vidno polje pod fluorescentnim svjetlom, pa zatim identično polje u uvjetima tamnog polja. A i B, u vrijeme E13 Coll1a1-GFP nije izražen ni u strukturama zubnog zametka kao epitelnog tako niti mezenhimnog porijekla, a niti u okolnim strukturama. C i D, u vrijeme E14 Coll1a1-GFP nije izražen u strukturama zubnog zametka epitelnog ili mezenhimnog porijekla, dok je u mladim osteoblastima u sklopu kondenzacije mezenhima, grupiranih oko mladog osteoida (B), Coll1a1-GFP izražaj detektiran (označeno strelicama). Mjerila u slikama=100 $\mu$ m

U fazi zvona razvoja zuba (E18), Coll1a1-GFP transgen se počinje prepisivati i izražavati u mladim funkcionalnim odontoblastima (FO) koji luče predentin. Predentin je vidljiv na samom vrhu buduće meziolingualne kvržice (slika 18A- C). U ovoj fazi razvoja zuba Coll1a1-GFP se ne detektira u drugim kvržicama niti drugim molarima koji sadrže manje diferencirane stanice odontoblastne loze.

Postnatalnim nastavkom razvoja zuba (P1) izražaj Coll1a1-GFP-a se pojačava i detektira u odontoblastima u obje kvržice, dok se u preodontoblastima (PO) i polarizirajućim

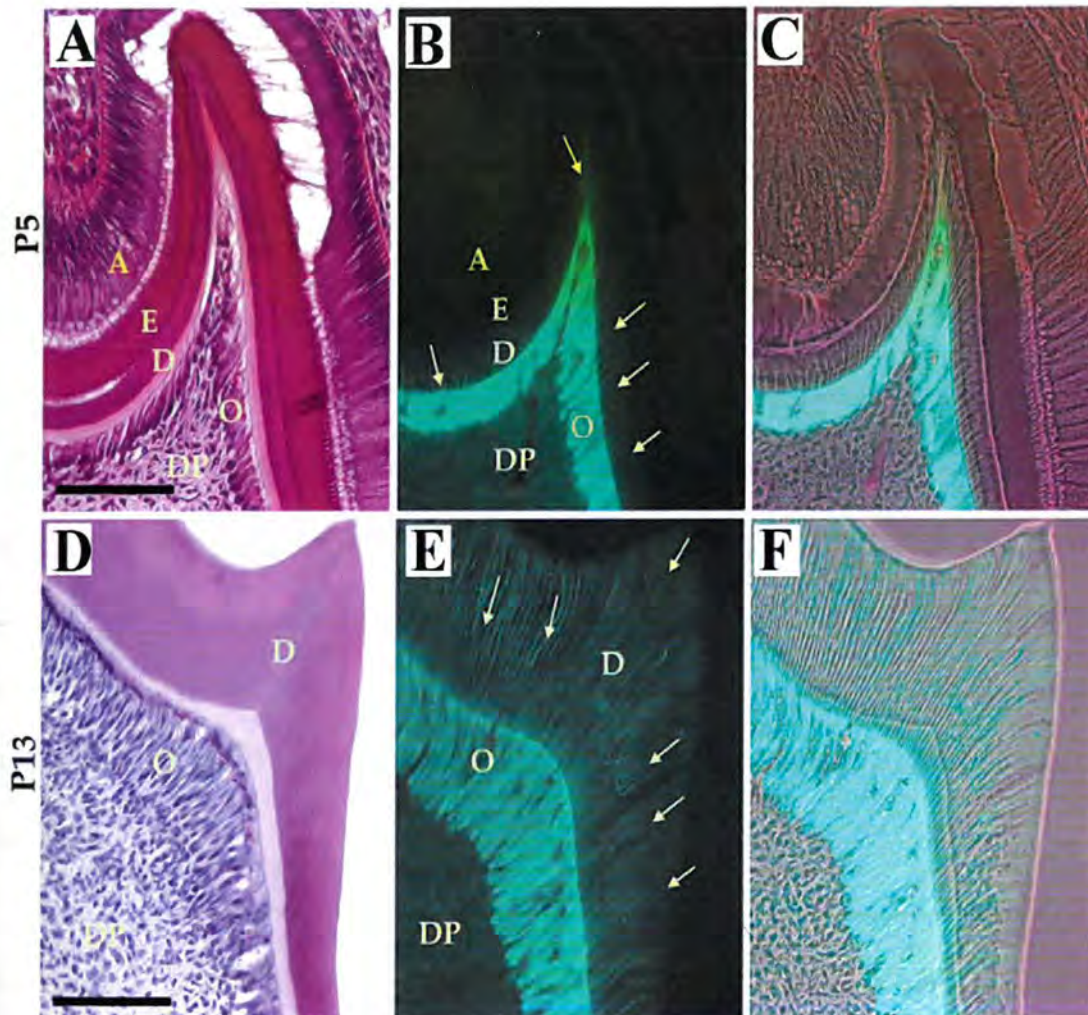
odontoblastima (PoO) ne detektira. Coll1a1-GFP izražaj je vidljiv i u osteoblastima okolne alveolarne kosti (vidljivo na slikama 18D i E).



**Slika 18.** Slike rezova kroz embrionalne i postnatalna zubne zametke mandibularnih molara E18 (A -C) i P1 (D-E). Hemalaun-eozin bojanje (A), Prikaz fluorescencije (B, D), slike tamnog polja (C, E, F). Za sve rezove je slikano vidno polje pod fluorescentnim svjetlom pa zatim identično polje u uvjetima tamnog polja. Nakon slikanja prikaza fluorescencije i slika tamnog polja preparati su obojani standardnim histološkim metodama. A u vrijeme E18 tanak sloj predentina je vidljiv između funkcionalnih odontoblasta i preameloblasta. B, C Coll1a1-GFP je izražen u funkcionalnim odontoblastima na vrhu meziobukalne kvržice dok se u manje diferenciranim odontoblastima i pulpi ne detektira. D i F u vrijeme P1 Coll1a1-GFP je izražen u obje kvržice te je pojačanog intenziteta. E povećana regija kvržice sa slike D. Mjerila u slikama=100 $\mu$ m

U vrijeme postnatalne sekretorne faze razvoja zuba Coll1a1-GFP se detektira u cijelom sloju terminalno diferenciranih odontoblasta. Oni se nalaze na periferiji zubne pulpe i u kontaktu su s predentinom i dentinom (slika 19A-C). Odontoblasti nastavljaju izražavati visoke razine Coll1a1-GFP-a i u daljnjoj fazi lučenja sekundarnog dentina gdje je Coll1a1-

GFP vidljiv i u strukturi odontoblastnog nastavka koji se pruža duboko u dentin do spoja s caklinom. Niska razina Colla1-GFP-a može se detektirati i u nekim stanicama zubne pulpe (slika 19Bi E).



**Slika 19. Slike rezova kroz postnatalne zubne zametke mandibularnih molara P5 (A -C) i P13 (D-E).** Hemalauneozin bojanje (A, D), Prikaz fluorescencije (B, E), slike tamnog polja (C, F). Za sve rezove slikano je vidno polje pod fluorescentnim svjetlom pa zatim identično polje u uvjetima tamnog polja i fluorescentnog osvjetljenja. Nakon slikanja prikaza fluorescencije i slika tamnog polja preparati su obojani standardnim HE bojanjem. **A** u vrijeme P5 sloj predentina je u kontaktu s pulpne strane sa slojem odontoblasta, a ujedno prekriven slojem mineraliziranog matriksa dentina, koji se uslijed različitog sastava boji tamnije. **B, C** Colla1-GFP je izražen u cijelom sloju odontoblasta uključujući i njihove produžetke (označeni strelicama). **D** u vrijeme lučenja sekundarnog dentina (P13) odontoblasti i dalje luče dentinski organski matriks. Odontoblastni produžeci su ponegdje i dvostruke dužine u odnosu na same odontoblaste, zakopani su duboko u dentinu sve do granice s caklinom. **E** zreli odontoblasti s dugim produžecima i dalje izražavaju visoke razine Colla1-GFP-. **F** visoka razina Colla1-GFP-a sa slike **E** vidljiva je i u osvjetljenju tamnog polja. Mjerila u slikama = 100 μm



#### 4.2. Izražaj *Colla1-GFP* korelira s endogenim *DSPP* i *Dmp1* genima tijekom diferencijacije odontoblasta

U cilju precizne identifikacije razvojnih stadija odontoblasta u kojima je izražen *Colla1-GFP* transgen, uspoređen je izražaj *Colla1-GFP*-a s poznatim biljezima diferencijacije *DSPP* i *Dmp1*. Izvršena *in situ* hibridizacija pokazala je da *DSPP* i *Dmp1* u ranih faza razvoja zuba u vrijeme postojanja samo nediferenciranih stanica prekursora odontoblasta (faze pupoljka i kape), nisu izraženi (podaci nisu prikazani).

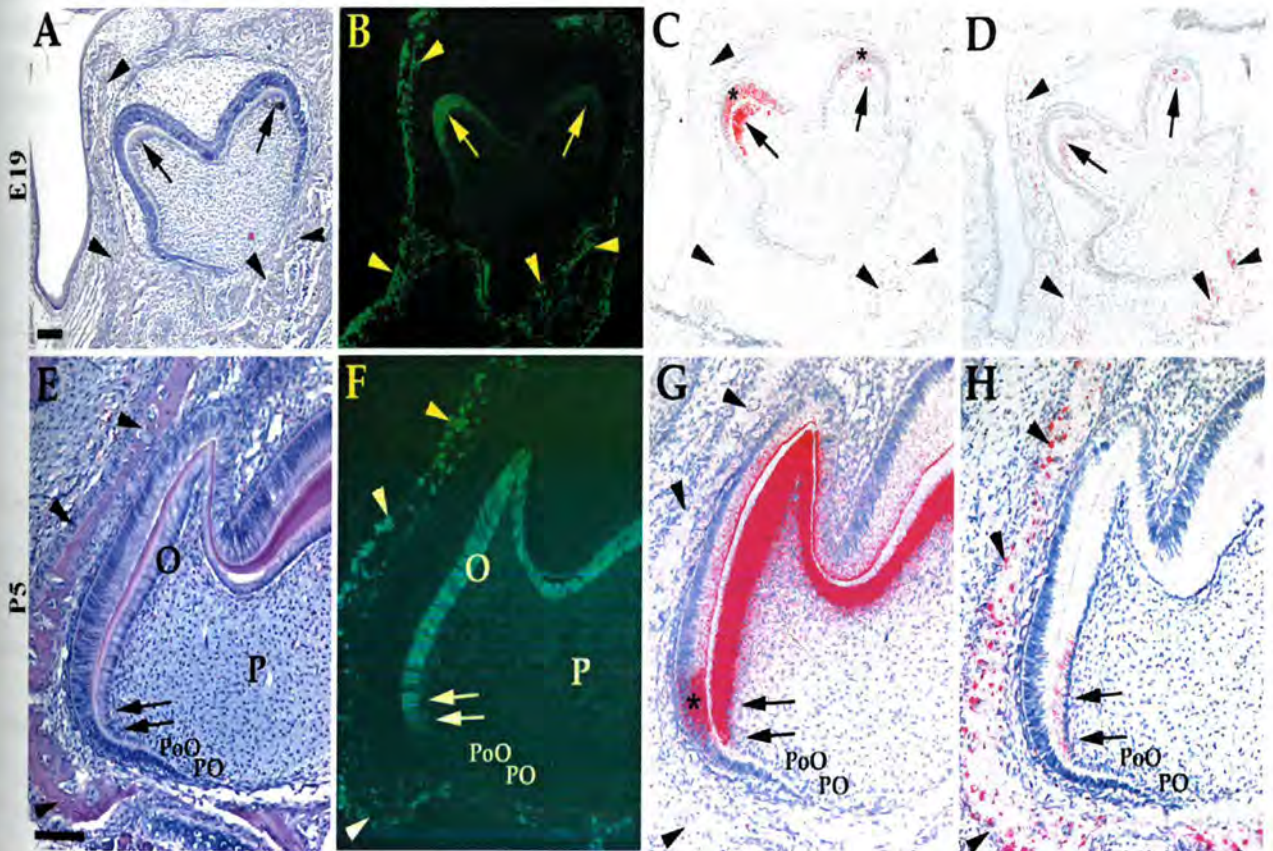
Najraniji izražaj koji se može otkriti ovim putem bio je u fazi zvona (E19). U ovoj fazi razvoja, visoke razine *DSPP* i niske, ali prisutne razine *Dmp1* su izražene u ograničenom broju funkcionalnih odontoblasta (FO) lociranim u vršcima kvržica prvih mandibularnih molara. U ovoj fazi razvoja zuba (E19) *DSPP*, ali ne i *Dmp1*, izražaj je bio opažen i u presekretornim ameloblastima smještenim nasuprot funkcionalnim odontoblastima (slika 20B). *Dmp1* (ne i *DSPP*) je izražen u osteocitima (ne i u osteoblastima!) alveolarne kosti (slika 20C).

U sekretornoj fazi razvoja zuba (P1 –P5) visoke razine *DSPP* detektirane su u cijelom sloju zrelih odontoblasta koji pokrivaju zubnu pulpu (Slika 20E) te u ograničenom broju presekretornih ameloblasta smještenim u cervikalnim petljama (*eng.* Cervical loop) (označeno zvjezdicama, slika 20E).

Hibridizacija susjednih rezova s *Dmp1* riboprobom ukazala je na ograničeni izražaj u mladim funkcionalnim odontoblastima smještenim u cervikalnim petljama. *Dmp1* izražaj nije detektiran u zrelim odontoblastima (slika 20F). Između E18 i P13 snažan izražaj je detektiran u osteocitima alveolarne kosti (slike 20C i F).

U svim promatranim fazama razvoja zuba rezovi hibridizirani sa "sense" riboprobama nizu davali signal iznad razine signala pozadine. Ovi rezultati *in situ* hibridizacije se

poklapaju s onima opisanima u literaturi (29, 64) i ukazuju da su i *DSPP* i *Dmp1* izraženi u funkcionalniom odontoblastima (označeni strelicama u slici 18A-H) koji su uključeni u sekreciji organskog matriksa predentina. Zreli odontoblasti koji su uključeni u lučenju nemineraliziranog predentina i u njegovoj mineralizaciji u dentin izražavaju visoke razine *DSPP* te ne izražavaju *Dmp1*. Nasuprot tome, osteociti u alveolarnoj kosti izražavaju *Dmp1*, ali ne izražavaju razine *DSPP* koje bi se mogle detektirati ovom metodom (29, 65, 66).



**Slika 20. Korelacija izražaja *Coll1a1-GFP*, *DSPP* i *dmp1* u zubima tijekom razvoja in vivo.** Svjetlo polje (A, E), prikaz fluorescencije (B, F) i pseudo obojena polja in situ hibridizacija svjetlog (C, D, G i H) frontalnih susjednih rezova kroz molare izolirane iz E19 (A-D) i P5 (E-H). **A** Rez kroz mandibularni prvi molar i fazi E19 razvoja bojan HE. Vidljiv je tanak sloj predentina na vrškovima kvržica. **B** Prikaz fluorescencije reza prikazanom pod A. Visoka razina *Coll1a1-GFP* je vidljiva u funkcionalnim odontoblastima na vrhovima kvržica molara (označeni dugim strelicama). *Coll1a1-GFP* je također izražen u osteoblastima i osteocitima alveolarne kosti u razvoju (označeni kratkim strelicama). **C** In situ hibridizacija reza, susjednog prikazanom u A i B, hibridiziran *DSPP* riboprobom. Slično *Coll1a1-GFP*, i *DSPP* je izražen u funkcionalnim odontoblastima na vrhovima kvržica molara (označeni dugim strelicama). *DSPP* je također izražen u presekretornim ameloblastima smještenim nasuprot funkcionalnih odontoblasta (označeni zvjezdicom \*). *DSPP* nije izražen u stanicama

alveolarne kosti u razvoju (označene kratkim strelicama). **D** In situ hibridizacija susjednog reza prikazanom u **C**, hibridiziran *Dmpl* riboprobom. Prikazuje slab, ali prisutan *dmpl* izražaj u funkcionalnim odontoblastima na vrhovima kvržica molara (označeni dugim strelicama). *Dmpl* je izražen i u osteocitima alveolarne kosti (označene kratkim strelicama). **E** HE bojanje reza kroz P5 maksilarni prvi molar. **F** Prikaz fluorescencije reza prikazanom pod **E**. Visoka razina *Colla1-GFP* vidljiva je u cijelom sloju odontoblasta na rubu zubne pulpe te u osteoblastima i osteocitima alveolarne kosti (označene kratkim strelicama). *Colla1-GFP* nije izražen u nediferenciranim preodontoblastima (PO) ni u polarizirajućim odontoblastima (PoO). Niže, ali prisutne, razine *Colla1-GFP* vidljive su u pojedinim stanicama zubne pulpe. Funkcionalni odontoblasti (FO) označeni su dugim strelicama. **G** i **H** **D** In situ hibridizacija susjednih rezova hibridiziranih *DSPP* (G) i *Dmpl* (H) riboprobom. *DSPP* je izražen u cijelom sloju odontoblasta koji pokrivaju zubnu pulpu te u grupi presekretornih ameloblasta (označeni zvjezdicom \*), smještenim u vratu zuba u sklopu cervikalne petlje (fertilnog prstena; eng. Cervical loop) nasuprot funkcionalnim odontoblastima (označeni dugim strelicama). *DSPP* nije izražen u nediferenciranim preodontoblastima (PO) ni u polarizirajućim odontoblastima (PoO), kao ni u stanicama alveolarne kosti (označene kratkim strelicama). Mjerilo je u svim slikama 100µm.

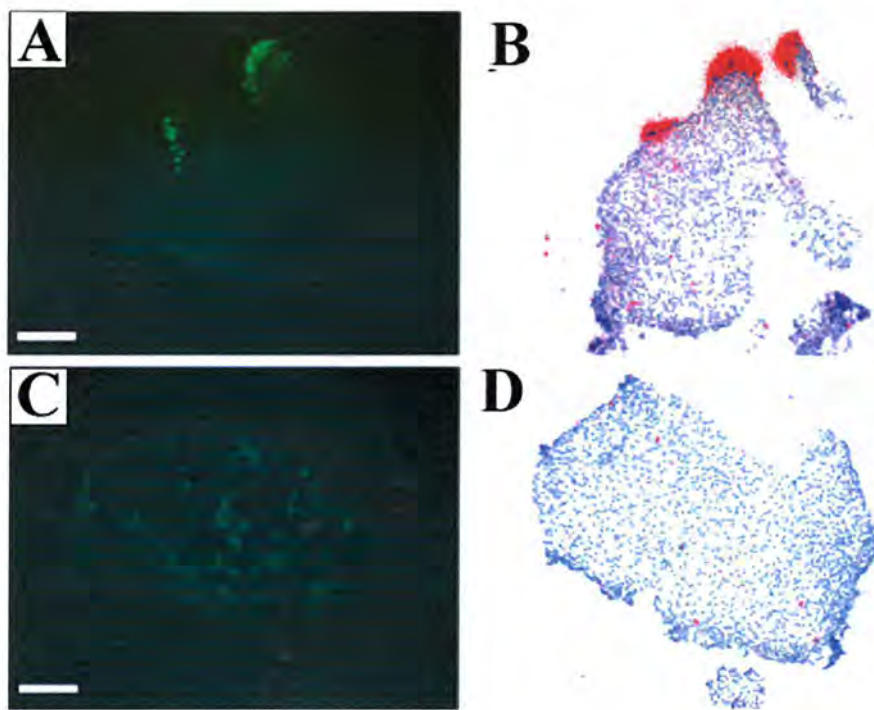
### 4.3. Transplantacija zubne pulpe

Promatranja tkiva *in vivo* ukazala su da je *Colla1-GFP* dobar biljeg gen za funkcionalne odontoblaste i krajnje diferencirane odontoblaste te se izražaj *Colla1-GFP* može koristiti u praćenju progresije progenitorskih stanica u odontoblaste. Korišten je transplantacijski materijal iz 5 dana starih pOBCol2.3GFP miševa s ciljem ispitivanja odontogenog potencijala stanica zubne pulpe.

#### 4.3.1. Karakterizacija pulpnog tkiva prije transplantacije

Svježe izolirani komadići pulpe iz transgeničnih životinja su pripremljeni za analizu fluorescencije na histološkim rezovima, te *in situ* hibridizacijsku analizu korištenjem *DSPP* riboprobe. Ovi eksperimenti su pokazali da, nakon mehaničkog odvajanja zubne pulpe od izlučenog tvrdog dijela krune, na vršcima pulpnih rogova zaostaje mala skupina odontoblasta koja posjeduje, isto kao i zreli odontoblasti, snažan izražaj *Colla1-GFP*-a (slika 21A) te

*DSPP-a* (slika 21B). S ciljem osiguranja čistog startnog materijala, pulpni rogovi su odstranjeni s izoliranog pulpnog tkiva te je takvo tkivo bez odontoblasta korišteno za transplantaciju. Odsustvo odontoblasta je potvrđeno odsustvom visoke razine Colla1-GFP i *DSPP* izražaja u tako obrađenom tkivu (slika 21C i D). U tkivu korištenom za transplantaciju detektiran je analizom fluorescencije slab Colla1-GFP izražaj u pojedinim stanicama (slika 21C).



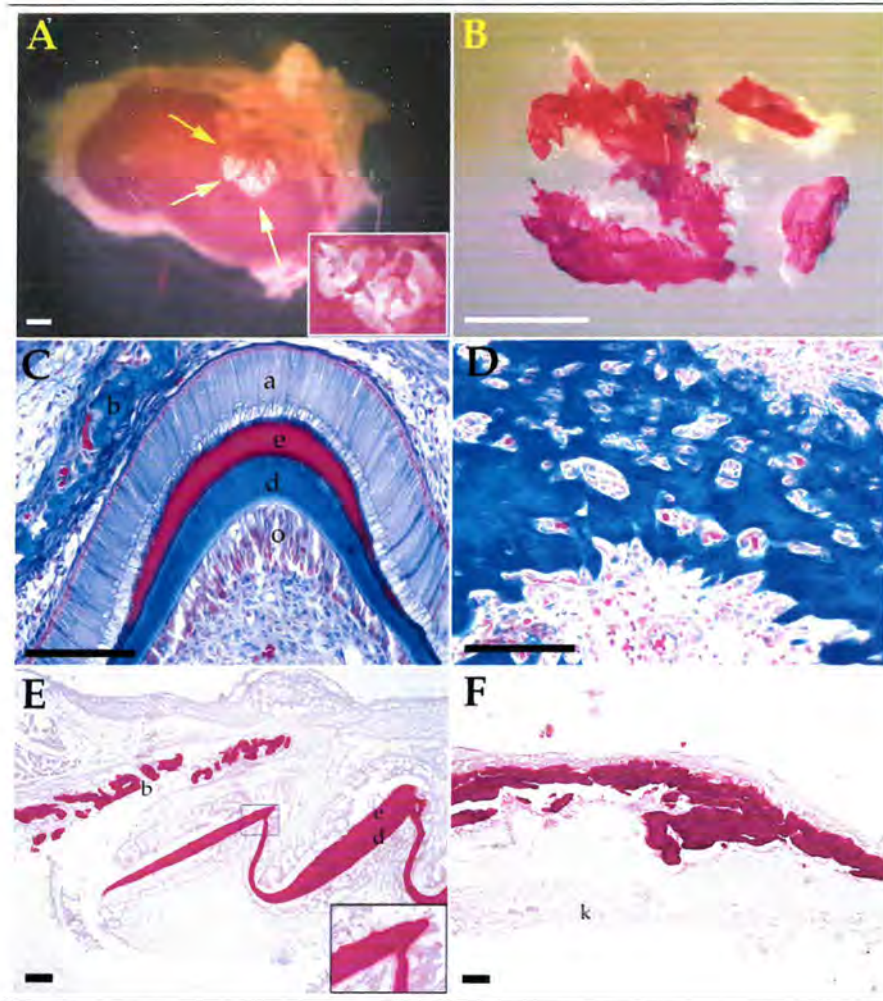
**Slika 21. Analiza pulpnog tkiva prije transplantacije;** *A i B, pulpno tkivo s pulpnim rogovima, te, C i D, s odstranjenim pulpnim rogovima. Slike A i C su prikaz fluorescencije svježe izolirane pulpe; B i D slike in situ hibridizacije s DSPP riboprobom. A pulpno tkivo s snažnim Colla1-GFP izražajem u maloj zaostaloj skupini odontoblasta te slabim, ali prisutnim Colla1-GFP izražajem u ostalom dijelu pulpnog tkiva; B pulpno tkivo sa snažnim DSPP izražajem u maloj zaostaloj skupini odontoblasta; C pulpno tkivo s prisutnim slabim Colla1-GFP izražajem u pojedinim stanicama pulpnog tkiva; D pulpno tkivo bez DSPP izražaja. Mjerila u slikama=100 $\mu$ m*

Transplantirana su 54 izolata zubnih pulpi pod bubrežnu kapsulu domaćina. Transplantirano tkivo je disektirano i obrađeno po slijedećem rasporedu: nakon 7 dana (n=20), 10 dana (n=25) i 14 dana (n=9).

#### **4.3.2. Histologija i histokemija novostvorenog tkiva nakon transplantacije**

Histološka ispitivanja 7 dana starog tkiva nakon transplantacije pokazala su prisustvo eozinofilnog i nemineraliziranog tkiva nalik na osteoid u svim uzorcima. Otoci hrskavice s diferenciranim hondrocitima, čiji je sastav potvrđen bojenjem alcian modrilom (Alcian Blue), pronađeni su u nekoliko uzoraka starih 7 dana (slika 22A).

U svim izoliranim uzorcima (7, 10 i 14 dana nakon transplantacije) transplantiranog tkiva nađeni su atubularni mineralizirani otočići s uklopljenim stanicama poput osteocita (slike 21A-C, 21E i 21G). Sadržaj minerala u ovim otočićima je potvrđen različitim metodama (slika 22A-F) uključujući bojanje alizarin crvenilom (Alizarin Red-S) nedemineraliziranih uzoraka u dodatnim izolatima (n=21). Ovi mineralizirani otočići su bili slični onima prethodno opisanim atubularnim osteotipičnim strukturama.

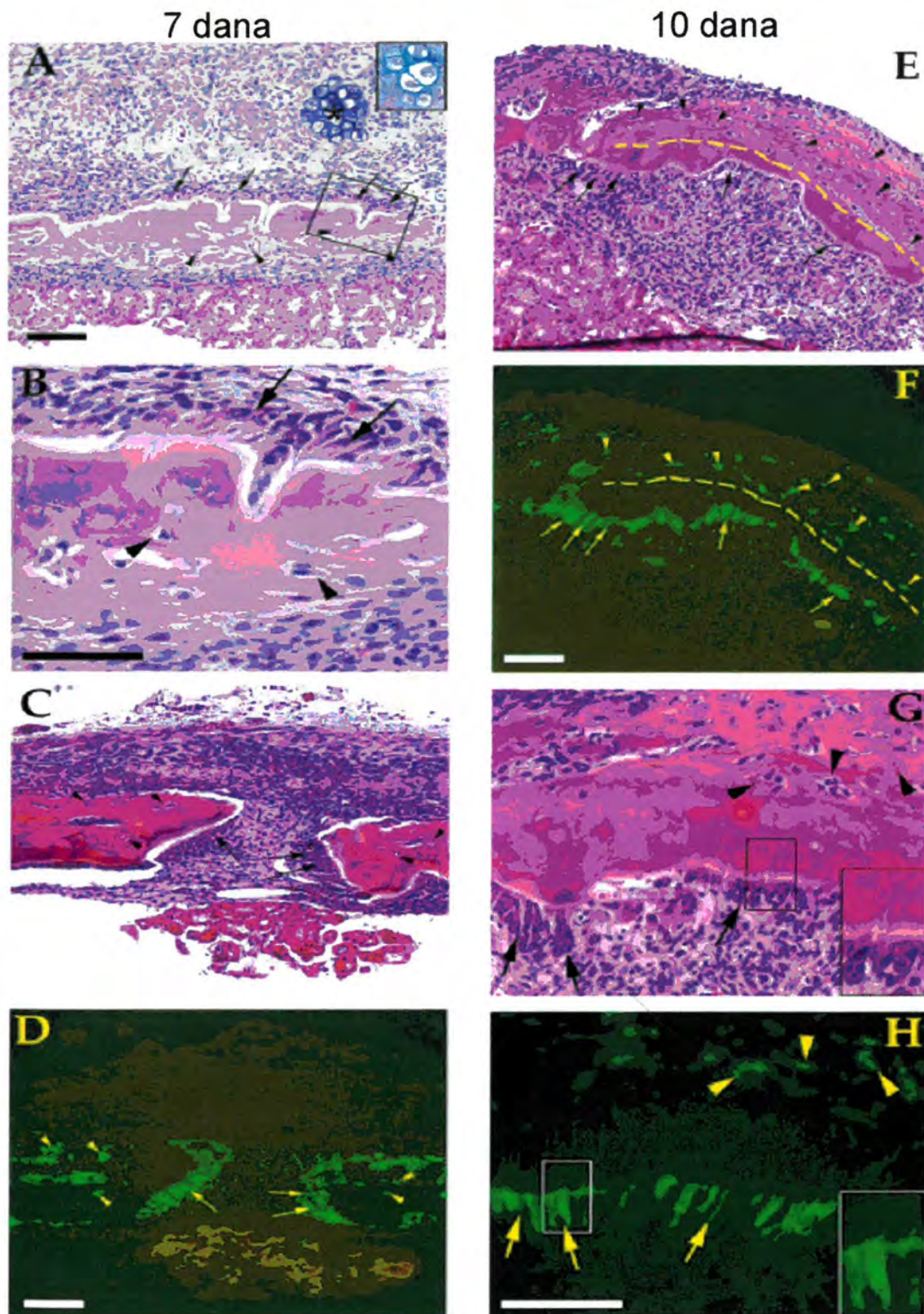


**Slika 22. Stvaranje mineraliziranog tkiva nakon transplantacije.** **A** Bubreg sa subkapsularno formiranim mineraliziranim tkivom (obilježeno strelicama). Umetak u donjem desnom kutu je veće povećanje mineraliziranog tkiva; **B** "whole mount" bojanje 10 dana starog uzorka alizarinsko crvenilo/alcian modriLO tehnikom koje ukazuje na opsežnu mineralizaciju tkiva koje se obojilo s Alizarinskim crvenilom; (**C**, **D**) Parafinski rezovi demineraliziranog tkiva prvog molara starosti P5 (**C**) i tkiva 10 dana nakon transplantacije (**D**) oba obojena anilinskim modrilom za kolagen po Mallory-u. Obratiti pažnju na intenzivno plavo obojenje kosti, dentina maksilarnog molara i tkiva nastalog 10 dana nakon transplantacije. Plava boja ukazuje na visok sadržaj kolagena. (**E**, **F**) Prikazani su smrznuti rezovi nedemineraliziranog maksilarnog molara (**E**) i tkiva 10 dana nakon transplantacije (**F**). (**E**) Treba obratiti pažnju da je intenzivna crvena boja obojala mineralizirana tkiva molara kao kost, dentin i caklina. Na većem povećanju se vidi selektivnost boje jer nije obojala nemineralizirani predentin. (**F**) Alizarin Red S bojanje prikazuje opsežnu mineralizaciju u transplantiranom tkivu; Mjerila u slikama (**A** i **B**) = 1mm, (**C** - **F**) = 100 $\mu$ m. Kratice: a, ameloblasti; b: kost; d, dentin; e, caklina; k, bubreg; o, odontoblasti.

U usporedbi sa 7 dana starim uzorcima, 10 dana stari uzorci bili su veći te je na njihovoj površini zamijećen veći broj cilindričnih polariziranih stanica. Dijelovi tkiva, na

čijoj su površini opisane polarizirane stanice, imaju većinom tubularnu strukturu i sadrže produljetke ovih stanica nalik na odontoblaste (slike 21E-H). Stanice poput osteocita su rijetke ili ih gotovo nema (slike 21A-D, 21E i 21G). Ova dva po strukturi različita tkiva su dobro razgraničena uslijed različitog afiniteta za boje prilikom HE bojanja (slika 23E).

Fluorescentna analiza je pokazala da, unatoč izrazito niskim i gotovo nezamjetnim razinama Colla1-GFP izražaja u svježe izoliranoj pulpi (slika 21C), u nastalom tkivu nakon 7-14 dana nalazimo stanice s izrazito visokom razinom Colla1-GFP izražaja (slika 21C, F, H). Colla1-GFP izražaj je bio prisutan u stanicama poput osteocita uklopljenim u matriksu i izduženim i polariziranim stanicama smještene uz rub stvorenog tkiva tubularne grade (slike 23D, F, H). Tubularno tkivo nastalo 10 dana nakon transplantacije sadržavalo je stanične nastavke koji su također imali visoki Colla1-GFP izražaj (23H). Ovaj fenotip stanica s Colla1-GFP izražajem podsjeća na izražaj u odontoblastima zubne pulpe i odontoblastnim produljetcima u dentinu *in vivo*. U istom tkivu primijećene su također neke stanice u osteotipičnom mineraliziranom tkivu koje nisu izražavale Colla1-GFP. Nasuprot tome, sve stanice nalik na odontoblaste su imale snažan Colla1-GFP izražaj te nije bilo stanica nalik na odontoblaste, a da nisu posjedovale izražen i Colla1-GFP.



**Slika 23.** Analiza diferencijacijskog potencijala pulpnog tkiva iz transgeničnih pOBCol2.3GFP miševa nakon transplantacije pod bubrežnu kapsulu. Hemalaun-eozin (A, B, C, E, G), prikaz fluorescencije (D, F, H) rezova tkiva nastalog nakon 7 (A-D) i 10 dana (E-H) posttransplantacijski. A HE bojanje reza kroz 7 dana stari transplantat u kojem je vidljiv otočić hrskavice (označen \*) te mineralizirani otočići. Umetak u gornjem desnom kutu prikazuje susjedni rez bojan za hrskavicu Alcian blue koje boji proteoglikane hrskavice intenzivno plavo. Mineralizirani otočići sadrže stanice uklopljene u mineralizirani matriks (kratke strelice) te izdužene stanice na površini mineraliziranog matriksa (duge strelice). B



veće povećanje područja označenog u slici A, koje pokazuje detaljnije izdužene stanice i njihovu polariziranu morfologiju uz mineralizirani otočić (duge strelice) te stanice poput osteocita uklopljene u tkivo (kratke strelice). C i D HE i prikaz fluorescencije drugog uzorka tkiva 7 dana nakon transplantacije u kojem se vide stanice odontoblastne (duge strelice) i osteocitne (kratke strelice) morfologije (C). Obje vrste stanica izražavaju visoke razine Colla1-GFP transgena (D). E i F HE i prikaz fluorescencije istog reza tkiva 10 dana nakon transplantacije u kojem se vide stanice odontoblastne (duge strelice) i osteocitne (kratke strelice) morfologije (E). Obje vrste stanica izražavaju visoke razine Colla1-GFP transgena (F). Isprekidanom crtom je označena zamišljena crta razgraničenja između osteotipičnog i tubularnog mineraliziranog tkiva. G HE bojano tkivo kroz drugi uzorak također staro 10 dana koje prikazuje stvaranje tubularnog matriksa. Uz njega su poredane izdužene i polarizirane stanice poput odontoblasta (duge strelice). Umetak je veće povećanje područja označenog pravokutnikom koje prikazuje tubularno tkivo i priležeće stanice. H prikaz fluorescencije reza sa (G) koja prikazuje visoku razinu Colla1-GFP izražaja u polariziranim stanicama (duge strelice), ali i u njihovim produljetcima koje pružaju duboko u tubularno tkivo (vidljivo na umetku dolje desno). Mjerilo za povećanje u svim slikama = 100 $\mu$ m.

#### 4.3.3. DSPP i Dmp1 izražaj je nazočan u novostvorenom tkivu

Izražaj Colla1-GFP-a 7 i 10 dana nakon transplantacije u tkivu podrijetlom iz transgeničnih Colla1-GFP miševa, ukazuje na to da zubna pulpa sadrži progenitorske stanice i da su se one sposobne diferencirati u stanice poput osteoblasta i odontoblasta. U *in vivo* istraživanju dokumentirano je da zreli odontoblasti izražavaju visoku razinu DSPP, ali ne i Dmp1 (slike 20G i H). Nasuprot tome mladi osteociti u kosti izražavaju visoke razine Dmp1, ali ne i DSPP (slike 20G i H). Uzevši u obzir dobivena saznanja iz *in vivo* fenotipskog izražaja navedenih stanica, osteoblastni i odontoblastni fenotip stanica je dalje uzet u razmatranje na uzorcima starim 7 i 10 dana primjenjujući metodu *in situ* hibridizacije na međusobno susjednim rezovima od onih na kojim je analizirana fluorescencija (n=15). U ovom istraživanju zreli odontoblasti su bili karakterizirani visokom razinom Colla1-GFP izražaja i DSPP, ali ne Dmp1, dok su osteociti izražavali visoke razine Colla1-GFP i Dmp1, ali ne DSPP.

*In situ* analiza uzoraka starih 7 i 10 dana pokazala je visoku razinu DSPP u većini stanica koje su izražavale Colla1-GFP (Slike 24A, B, D, E). U ovim uzorcima DSPP izražaj

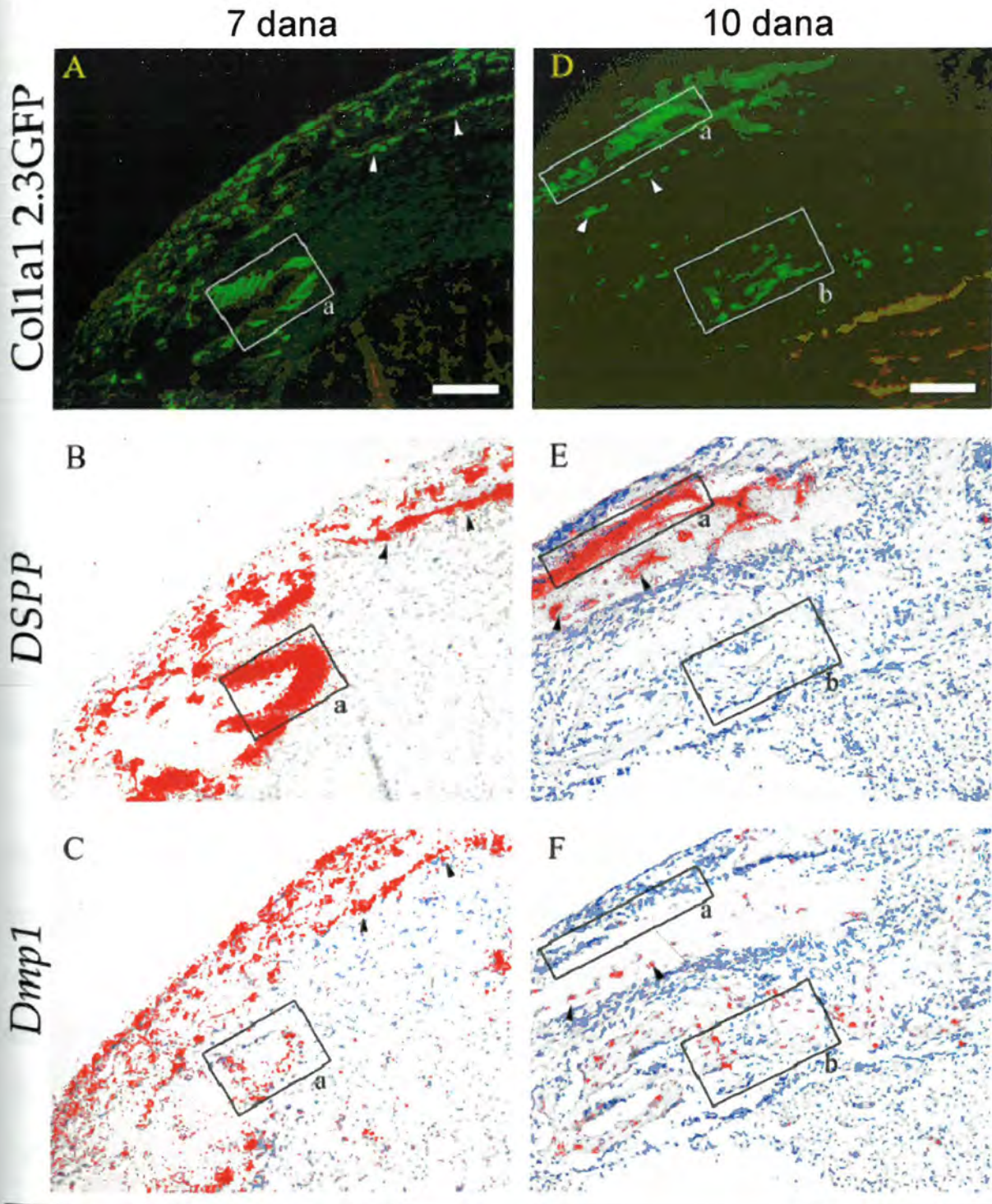
nije bio ograničen samo na izdužene stanice na površini mineraliziranog tkiva već se mogao uočiti i u uklopljenim stanicama poput osteocita u matriksu. Hibridizacija susjednih rezova s *Dmp1* riboprobom je također prikazala izražaj u većini, ali ne i svim stanicama koje su izražavale *Coll1a1*-GFP (Slike 24C i F). Slično *DSPP* izražaju *Dmp1* izražaj je uočen u uklopljenim stanicama, ali i u izduženim stanicama na površini mineraliziranog matriksa koje su izražavale *Coll1a1*-GFP.

Detaljnijim promatranjem ovih izražaja *Coll1a1*-GFP, *DSPP*, *Dmp1* mogu se uočiti tri vrste stanica:

Prva grupa stanica je karakterizirana izražajem visokih razina *Coll1a1*-GFP i *DSPP*, ali vrlo niske ili gotovo nezamjetne razine izražaja *Dmp1* (označeno s "a" u slikama 24A-F). Ova skupina stanica imala je većinom izduženu morfologiju i nalazila se je na površini tubularnog matriksa. Morfologija stanica i priležećeg matriksa, *DSPP* i *Dmp1* i *Coll1a1*-GFP izražaj podsjećali su na odontoblaste *in vivo* te su sugerirali odontoblastni fenotip. Ova zapažanja ukazuju da su stanice iz koronarnih dijelova zubne pulpe, bez odontoblasta, kada se stave u pogodno okruženje, sposobne izdiferencirati u nove stanice poput odontoblasta, koje izražavaju *DSPP* i luče tubularni dentin.

Druga skupina je bila karakterizirana visokom razinom *Coll1a1*-GFP te *DSPP*, ali i niskom, ali prisutnom razinom *Dmp1* izražaja (označeno kratkim strelicama u Slikama 24A-F). Istodoban izražaj *DSPP* i *Dmp1* uočen je u uklopljenim stanicama, ali i u izduženim stanicama na površini mineraliziranog matriksa. Ova zapažanja upućuju na to da ove stanice luče dentinski matriks i odgovaraju *in vivo* funkcionalnim odontoblastima.

Treća skupina stanica je bila karakterizirana visokom razinom *Coll1a1*-GFP te *Dmp1* te nezamjetnom razinom izražaja *DSPP* (označeno s "b" u Slikama 22D-F). Izražaj ovih stanica podsjeća na osteocite u mladoj alveolarnoj kosti te ukazuje i na osteogeni potencijal zubne pulpe.



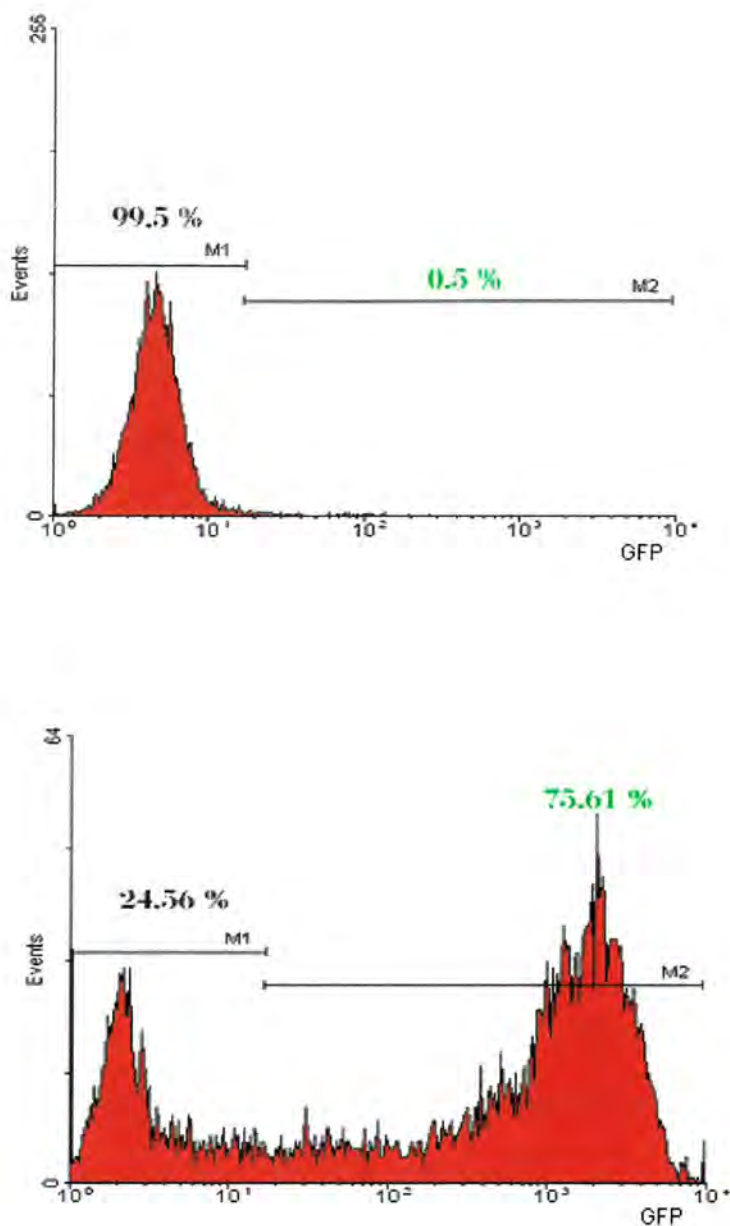
**Slika 24. Korelacija *Coll1a1*-GFP, *DSPP* i *Dmp1* izražaja u novostvorenom tkivu nakon transplantacije.** (A i D) prikaz fluorescencije i (B, C, E, F) pseudo obojane slike rezova in situ hibridizacije kroz tkiva nastala 7 (A-C) i 10 dana (D-F) nakon transplantacije komadića pulpe pod bubrežnu kapsulu. Istaknuta područja ("a", "b" i kratke strelice) služe za usporedbu promatranih izražaja. A-C područja označena s "a" ukazuju na izdužene i polarizirane stanice koje izražavaju visoke razine *Coll1a1*-GFP i *DSPP*, te nižu razinu *Dmp1*, koje zajedno upućuju na fenotipove nastalih stanica poput mladih funkcionalnih odontoblasta. Nalaz je usporedljiv s nalazom ranog razvoja zuba in vivo (slika 20C i D). Pravokutnici "a" označavaju izdužene i polarizirane stanice koje izražavaju visoke razine

*Colla1-GFP i DSPP, te ne izražavaju Dmp. Ovakav fenotip upućuje na zrele odontoblaste. Nalaz je usporedljiv s nalazom ranog razvoja zuba in vivo (slika 20G i H). U slikama D-F, područja označena s "b" ukazuju na nastanak kosti s osteocitima jer izražavaju Colla1-GFP i Dmp1 te ne izražavaju DSPP. Ovaj fenotip je karakteristika koštane strukture. U svim slikama (A-F) strelicama su označene stanice koje izražavaju Colla1-GFP, DSPP i Dmp1. Mjerilo u svim slikama =100 $\mu$ m*

#### **4.4. Citometrijska analiza digestiranih stanica zubne pulpe**

U *in vivo* histološkim istraživanjima uočen je slab, ali prisutan Colla1-GFP izražaj u dijelu stanica zubne pulpe (Slike 25A i B) te je u cilju određivanja udjela ovih stanica u cjelokupnom pulpnom tkivu napravljena suspenzija ovih stanica. Suspenzija je analizirana protočnom citometrijom. Za negativnu kontrolu korišteni su uzorci normalnih netransgeničnih miševa.

U svježe izoliranim stanicama dobivenim iz uzoraka koronarnih dijelova zubne pulpe, obrađenih kao i tkiva korištena za transplantaciju, udio stanica s detektiranim Colla1-GFP izražajem je bio 74 - 78% od ukupne suspenzije pojedinačnih stanica (n=10 uzoraka). Za negativnu kontrolu korišteni su identično obrađeni uzorci netransgeničnih miševa identične starosti, a za kalibriranje uređaja prije svakog uzorka korištena su normirana fluorescentna zrnca po upustvima proizvođača koja se nalaze u projaji na raspolaganju komercijalno (EGFP Calibration Beads, BDClontech).



**Slika 25. Prikaz analize protočnom citometrijom svježe izoliranih stanica zubne pulpe.**

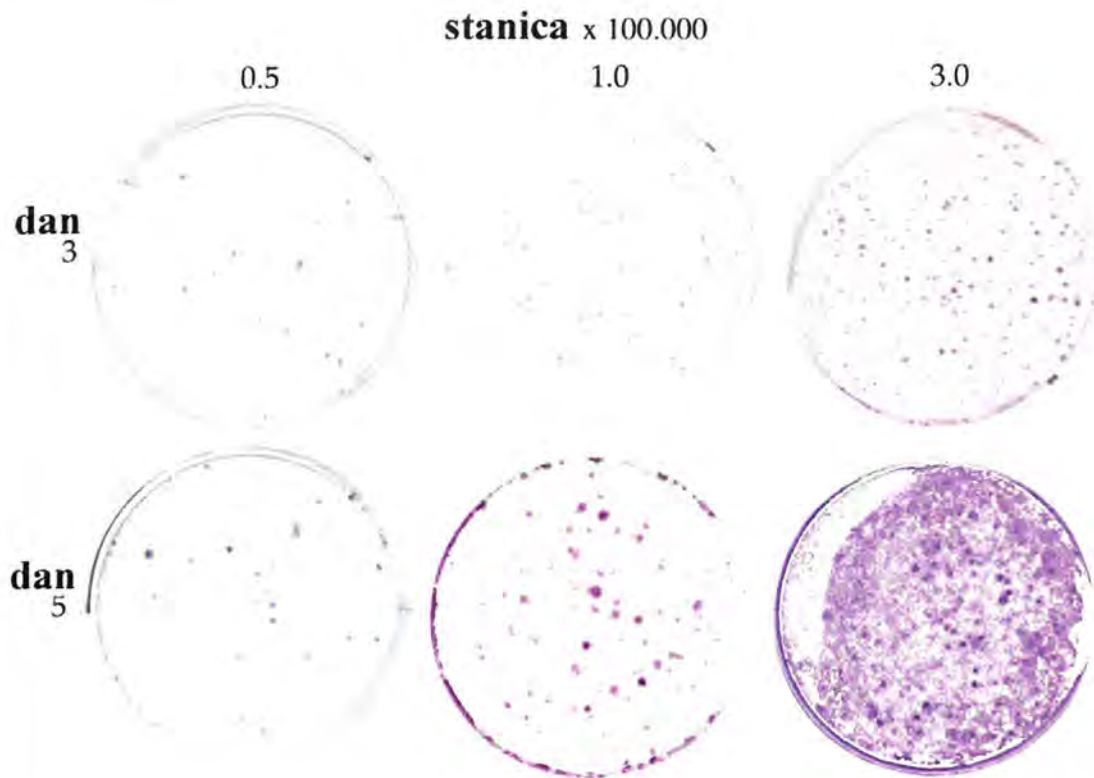
A kontrolne stanice izolirane iz netransgeničnih miševa, određuju negativnu populaciju. M1 oznaka određena je prema negativnoj kontroli te pokazuje da više od 99% stanica netransgeničnih životinja ne posjeduje izražaj transgena. B stanice izolirane iz transgeničnih miševa. Ista M1 oznaka je prenešena iz slike A na histogram transgeničnih stanica i određuje negativni dio populacije. M2 oznaka predstavlja stanice sa Colla1-GFP izražajem, te prikazuje da je u prikazanom uzorku u 75.61% svježe izoliranih stanica zubne pulpe uočen transgenični Colla1-GFP izražaj.

#### **4.5. Kultura stanica zubne pulpe**

S ciljem da se ustanovi sposobnost diferencijacije stanica zubne pulpe bez izvanstaničnog matriksa napravljene su suspenzije stanica te je promatrana sposobnost izoliranih stanica da stvaraju kolonije, pojačano sintetiziraju alkalnu fosfatazu, mineraliziraju, izražavaju Colla1-GFP i gene specifične za odontoblaste.

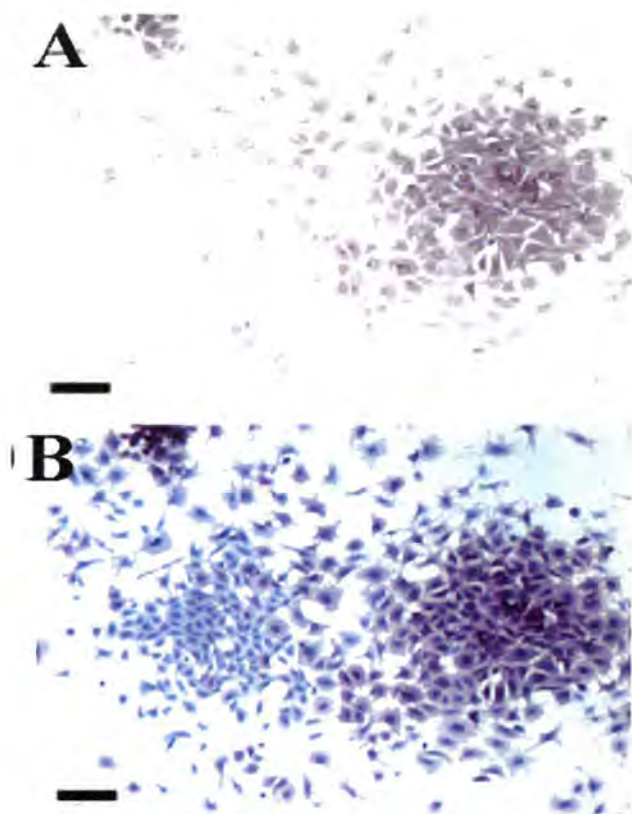
##### **4.5.1. Stanice zubne pulpe formiraju kolonije i posjeduju izražaj alkalne fosfataze**

Sposobnost stanica zubne pulpe za formiranje kolonija je određivana u kulturi stanica brojanjem kolonija u raznim vremenskim intervalima i u raznim zasađenim koncentracijama stanica. Kolonijom je smatrana klonogena nakupina od 20 i više stanica, a njihov broj se je odredio nakon fiksiranja i kristal-violet bojanja. Za usporedbu su paralelno kultivirane i stanice koštane srži te bojane i brojane na isti način. Broj kolonija je rastao s porastom gustoće sadenja (Slika 26). No, broj stvorenih kolonija stanica zubne pulpe bio značajno viši od stvorenih kolonija stanica koštane srži zasađenih na isti način (Slika 28).



**Slika 26. Kultura stanica zubne pulpe i stvaranje kolonija in vitro.** Slike predstavljaju reprezentativne 35mm petrijeve posude kultura stanica zasađenih u različitim koncentracijama, a fiksirane i bojane 3. i 5. dan nakon sađenja. Daljnje promatranje nije bilo moguće uslijed konfluiranja kolonija. Treba obratiti pozornost na ljubičaste nakupine koje su obojane stanice koje se vide kao pojedinačne ili u sklopu kolonija (broj stanica >20). Na slikama petrijevih posuda se vidi povećani broj kolonija kod povećane gustoće sađenja.

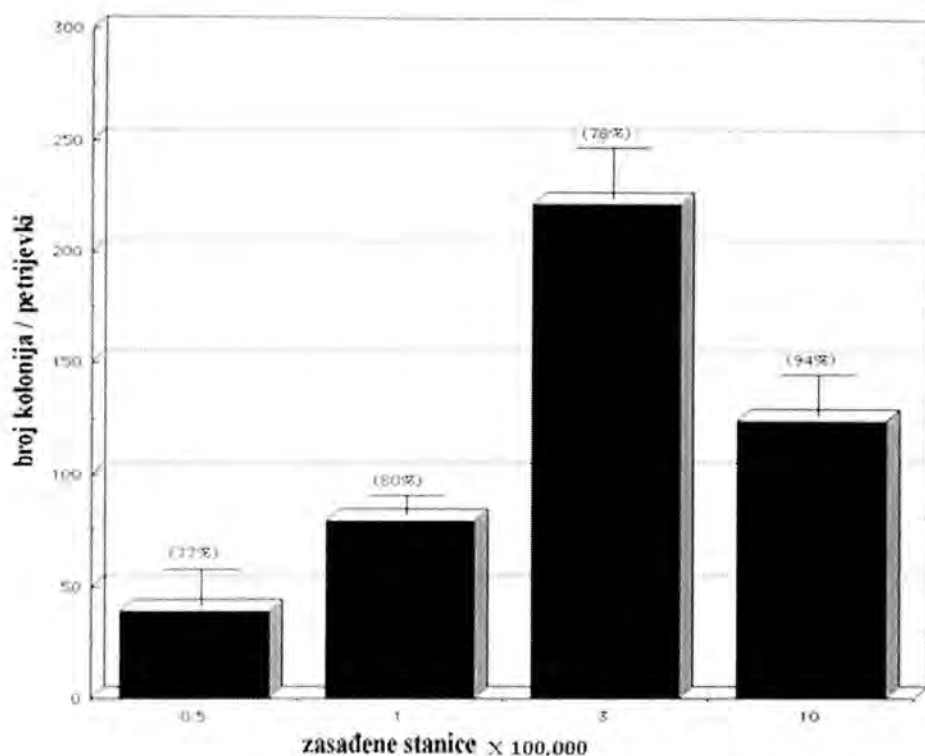
Pojačana sinteza alkalne fosfataze je značajka svih stanica koje sudjeluju u stvaranju mineraliziranih tkiva u tijelu, poput osteocita u kosti, cementoblasta u celularnom cementu i odontoblasta u dentinu. Stanice iz koronarnih dijelova zubne pulpe su nakon određenih razdoblja razdoblja kulture stanica fiksirane te obojane komercijalnim kitom za izražaj alkalne fosfataze u njima. Nakon brojanja kolonija s izražajem alkalne fosfataze kontrasto su pobojane i prebrojane i sve ostale kolonije dobivši time ukupan broj staničnih kolonija (Slika 27).



**Slika 27. Brojanje klonogenih kolonija stanica** *A* bojanjem izražaja alkalne fosfataze vidljiva je kolonija stanica (broj stanica u skupini >20) smještena desno u vidnom polju. *B* Nespecifičnim kontrastnim kristal-violet bojenjem uočljiva je i kolonija nešto manjih stanica lijevo u vidnom polju. Mjerilo povećanja=300 $\mu$ m.

Broj kolonija je u svim zasađenim koncentracijama bilo moguće odrediti jedino nakon 3. dana jer je kod gustoće sadenja od  $3 \times 10^5$  nakon 5. dana došlo do spajanja kolonija i nije bilo moguće njihovo razgraničavanje i precizno brojanje. Bojanje izražaja alkalne fosfataze pokazalo je veći postotak izražaja (94%) kod kolonija stanica koštane srži, nego kod kolonija stanica zubne pulpe (prosječno 79%) premda je ukupno brojčano bilo više nastalih kolonija u kulturi stanica zubne pulpe (slika 28).



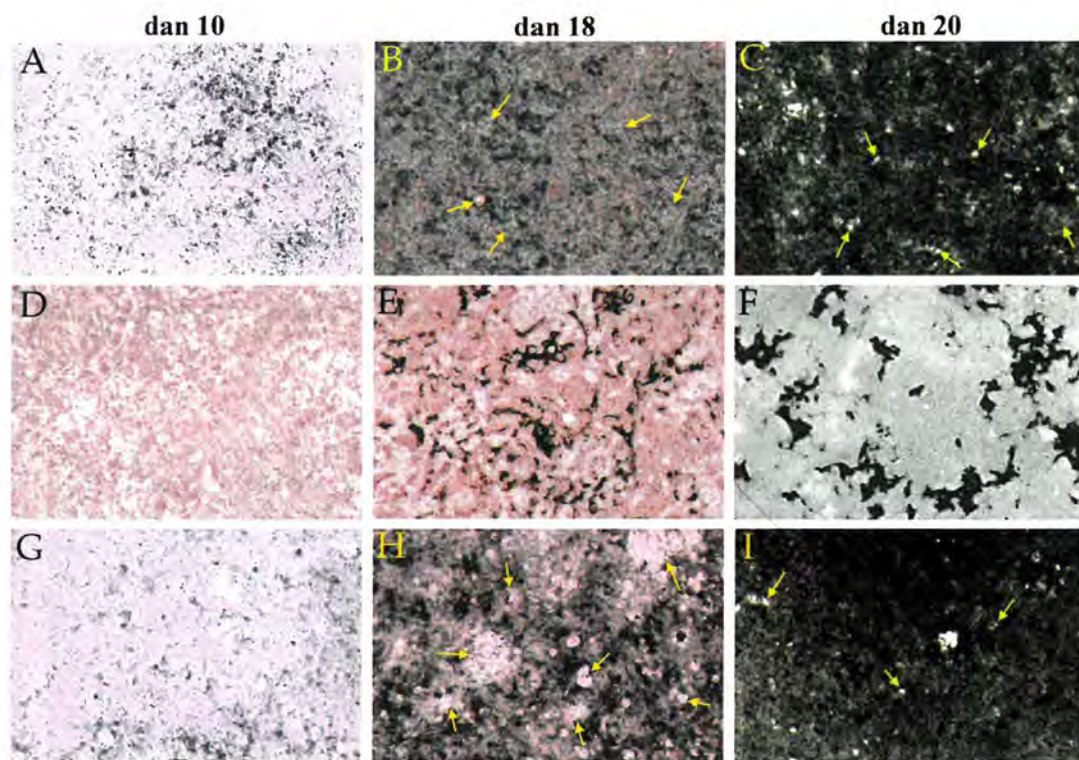


**Slika 28.** Histogram broja nastalih kolonija stanica zubne pulpe (stupac s lijeva na desno 1-3) i stanica koštane srži (stupac 4. s lijeva) nakon 3 dana kultivacije. Histogram pokazuje proporcionalan rast broja kolonija u odnosu na gustoću sađenja stanica zubne pulpe, ali uz približno konstantan postotak kolonija s pozitivnim izražajem alkalne fosfataze (77-80%) što je niže od postotka AP pozitivnih kolonija stanica koštane srži (94%). Značajna je razlika broja stvorenih kolonija stanica zubne pulpe (80 kolonija /  $10^5$  zasadenih stanica) u odnosu na stanice koštane srži (13 kolonija /  $10^5$  zasadenih stanica).

#### 4.5.2. Stvaranje minerala u *in vitro* uvjetima stanične kulture

Stvaranje izvanstaničnih minerala (dokazuje se standardnim Von Kossa bojanjem) je svojstvo stanica koje *in vivo* stvaraju kost i dentin, a u *in vitro* uvjetima kulture stanica obično počinju stvarati jezgre mineralizacije nakon postizanja konfluencije. Stanice zubne pulpe kultivirane su u dvojakim uvjetima i to: uvjetima za stanice koštane srži te u uvjetima za kalvarijske osteoblaste. Radi usporedbe usporedno su kultivirani i kalvarijski osteoblasti u uvjetima za kalvarijske osteoblaste. Sve kulture su postigle konfluenciju oko 7. dana. U kulturama stanica zubne pulpe prve jezgre mineralizacije u obliku čvorića bile su vidljive oko 10 dana nakon sađenja (Slika 29A i G; crna područja u petrijevkama). Čvorići su postepeno rasli veličinom i brojem. Mineralizirana područja su oko 14. dana u kulturi stanica zubne

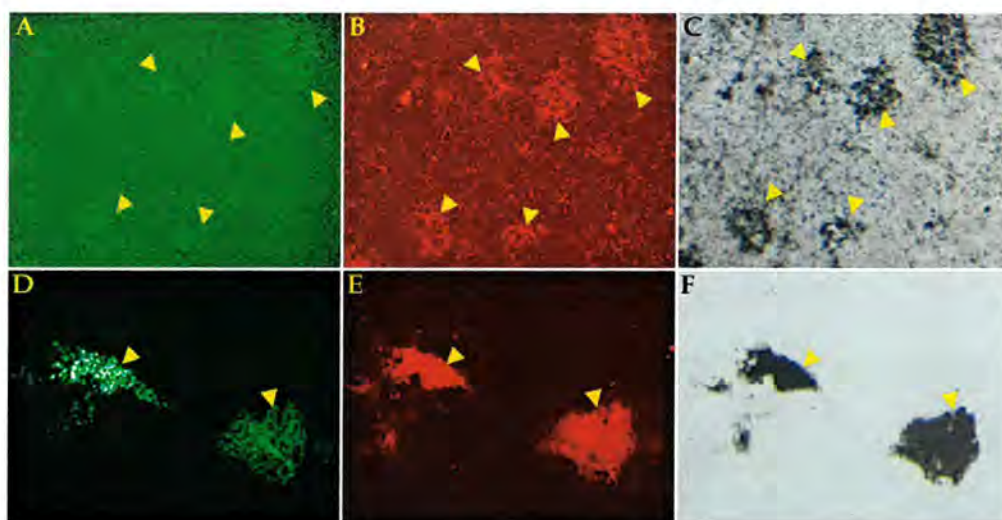
pulpe već bila gotovo svuda povezana s ograničenim nemineraliziranim područjima (označena strelicama u 29B i H). U kulturama kalvarijskih osteoblasta tek su se 14.-18 dan počele pojavljivati jezgre mineralizacije (29E). Tri tjedna nakon početka kulture stanica zubne pulpe (20 dana) mineralizirana područja su gotovo prekrila u potpunosti površinu Petrijevih posuda. Nemineralizirana područja su gotovo nestala, ali su i dalje prisutna (označena strelicama 29C i H). Kulture kalvarijskih osteoblasta su u istom vremenu sadržavale manje mineraliziranih područja, a nemineralizirana područja su i dalje zauzimala većinu površine dna Petrijevih posuda i nikada se nisu značajno smanjila ostavljajući izolirane i pojedinačne mineralizirane čvoriće (Slika 29F)



**Slika 29. Praćenje mineralizacije kulture stanica zubne pulpe (A-C i G-H) i kalvarijskih osteoblasta (D-F).** Uvjeti kultivacije za kalvarijske osteoblaste (A-F) i uvjeti za stanice koštane srži (G-I). Sadržaj minerala nakon kultivacija od 10 (A, D, G), 14 (B, E, H) i 20 dana (C, F, I). Crna obojana područja predstavljaju mineralizirana, a strelice nemineralizirana područja. Obratiti pozornost na značajno veću količinu minerala u kulturama stanica zubne pulpe (A-C i G-H) u oba uvjeta u odnosu na stanice kalvarijskih osteoblasta (D-F). Značajna razlika je i u vremenu pojavljivanja prvih mineraliziranih čvorića koji su prisutni već 10. dan u kulturama stanica zubne pulpe, dok se prvi mineralizirani čvorići javljaju kod kalvarijskih osteoblasta tek oko 18. dana.

Vežanje soli srebra za mineral neki autori smatraju nedovoljno specifičnim dokazom mineralizacije, pa je bilo potrebno mineralizaciju potvrditi uvodeći još jednu usporednu metodu. Ukoliko se Xylenol Orange (XO) ubrizga u žive pokusne životinje ugrađuje se u novostvorenu kost ili dentin vezanjem za kristale hidroksilapatita slično ugradnji tetraciklina u dentin ili kost (67). Boja je vidljiva pod fluorescentnim svjetlom određene valne duljine poput pruga na mjestima novostvorene kosti. Isti princip vezanja za minerale i detektiranja boje pod fluorescentnim svjetlom se može koristiti i u *in vitro* uvjetima.

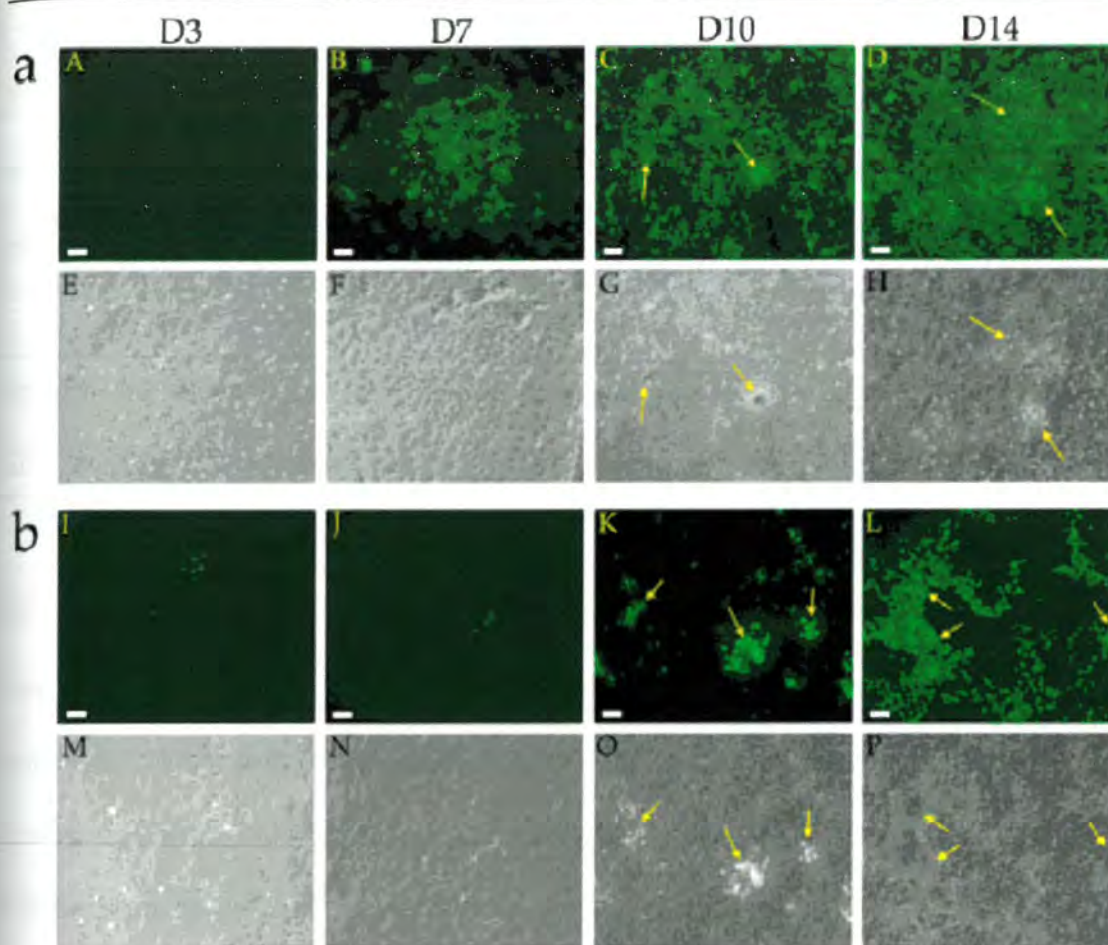
Promatranjem kulture stanica pod svjetlom valne duljine koja pobuđuje GFP i druge valne duljine koja pobuđuje XO ustanovljeno je podudaranje čvorića koji su imali Colla1-GFP izražaj i njihov mineralni sadržaj. Ista područja su pokazala i Von Kossa metodom bojenja visoki sadržaj minerala na identičnim područjima (slika 30B i C, te 30E i F). Kulture stanica zubne pulpe sadržavale su veće količine minerala u odnosu na stanice kalvarijskih osteoblasta i stanica koštane srži što je bilo vidljivo jačim intenzitetom i većom rasprostranjenošću crvene boje kod XO bojenja (Slike 30B i E) i Von Kossa bojanjem (Slike 30C i F).



**Slika 30. Korelacija Colla1-GFP izražaja i minerala u višeslojnim čvorićima detektiranim pomopću Xylenol Orange (XO) (B i E) i VonKossa (C i F) bojenja. Treba obratiti pažnju na podudarnost područja visokog Colla1-GFP izražaja (A i D) s nakupinama boje za minerale u B, C, E, i F.**

### 4.5.3. Genski biljezi diferencijacije su izraženi u kulturi stanica

U ovim primarnim kulturama stanica zubne pulpe prve stanice koje su se priljubile za dno petrijevih posuda bile su većinom vretenaste i nalik na fibroblaste i brzo su proliferirale. Pojedine vretenaste stanice imale su slab, ali prisutan Colla1-GFP izražaj, već 3. dan nakon nasađivanja (Slika 31A). Stanice su postepeno stvarale klonogene skupine (kolonije), a zatim je uslijedilo njihovo postepeno spajanje, sve dok nisu oko 7. dana prekrile cijelo dno petrijevki (stupanj konfluencije). Fazu proliferacije je slijedilo stvaranje višeslojnih pojedinačnih čvorića. Ovi čvorići su sadržavali većinom kuboidne stanice sa snažnim Colla1-GFP izražajem. Mineralizacija ovih čvorića je započela, kao prethodno navedeno, oko 10. dana. Pojavom mineraliziranih područja intenzitet Colla1-GFP izražaja se pojačavao, ali nije bio limitiran samo na čvoriće kao kod stanica kalvarijskih osteoblasta, već je bio prisutan u gotovo cijeloj površini petrijevki. Premda su po VonKossa bojanju i nakon 20 dana postojala područja bez minerala, u fluorescentnom osvjetljenju je cijela površina sa stanicama izražavala Colla1-GFP u višem ili nižem intenzitetu. Stanice su bile gotovo sve kuboidnog oblika (Slika 31A-D). Ukoliko stanice kalvarijskih osteoblasta nisu bile u bliskom kontaktu, nisu izražavale niti niske razine Colla1-GFP (Slika 31I). Kad su se počeli stvarati mineralizirani čvorići (oko 14. dana) intenzitet Colla1-GFP se pojačao, ali je bio ograničen samo na čvoriće. Oko čvorića su se nalazila područja sa stanicama, ali bez Colla1-GFP izražaja i bez minerala (Slika 31L).



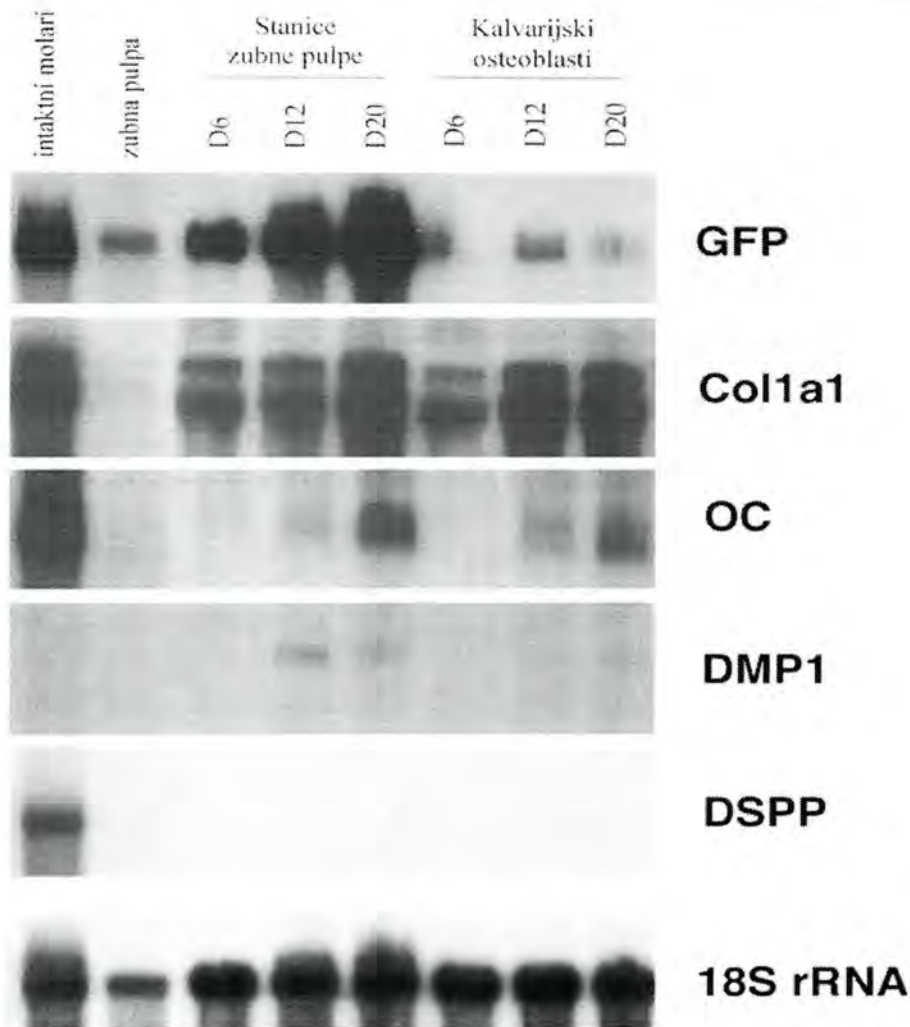
**Slika 31. Praćenje dinamike kulture stanica zubne pulpe (A-H) i stanica kalvarijskih osteoblasta (I-P) i njihovog izražaja *Colla1-GFP* transgena pod fluorescentnim osvjetljenjem (A-D i I-L). Strelice ukazuju na višeslojne čvoriće. Intenzitet *Colla1-GFP* izražaja raste s vremenom kultivacije u obje vrste stanica, ali je samo kod stanica zubne pulpe je nakon 14. dana *Colla1-GFP* prisutan na gotovo cijeloj površini petrijevki.**

S ciljem dokazivanja opažene diferencijacije staničnih kultura bilo je potrebno dokazati prisutnost biljega diferencijacije. Da bi se to postiglo izolirana je ukupna gRNK iz sestrinskih staničnih kultura. Dobivena gRNK je testirana metodom Northern blot hibridizacije na dentinske i koštane biljege. Za pozitivne kontrole korišteni su intaktni molari stari 5 dana koji su sadržavali diferencirane odontoblaste (kao prethodno histološki prikazano, Slike 19E-H).

Intaktni molari, koji su služili kao pozitivna kontrola, izražavali su visoke razine transgeničnog biljega (*Colla1-GFP*), endogenog kolagena tip I (*Colla1*), osteokalcina (*OC*) i dentin sijalofosfoproteina (*DSPP*), dok je izražaj dentin matriks proteina (*Dmp1*) bio prisutan, ali nizak (slika 32, prvi stupac s lijeva).

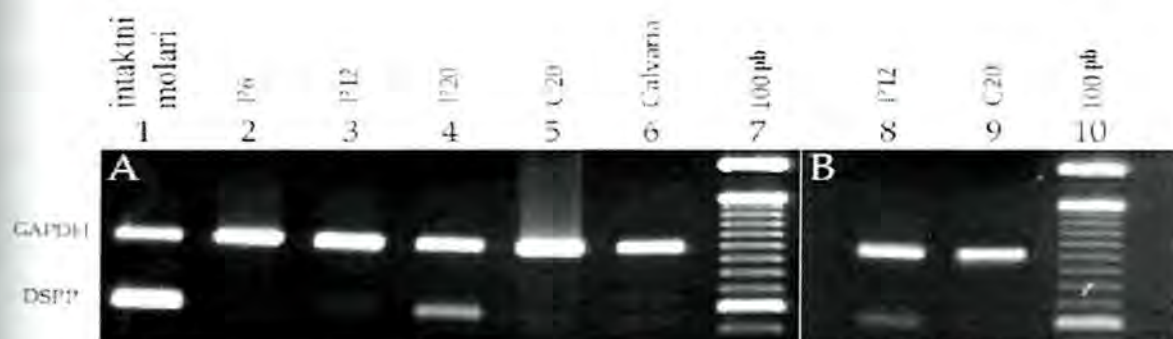
Izolirane pulpe, iz kojih su razgradnjom međustaničnog matriksa dobivene pojedinačne stanice za kulturu stanica, izražavale su niske razine *Colla1-GFP* i *Colla1*, ali nisu izražavale *DSPP*, *Dmp1* niti *OC* (slika 32, drugi stupac s lijeva).

U stanicama zubne pulpe (slika 32 treći, četvrti i peti stupac s lijeva) izražaj *Colla1-GFP* je bio kroz funkciju vremena provedenog u staničnoj kulturi u porastu. U usporedbi sa stanicama kalvarijskih osteoblasta (slika 32 šesti, sedmi i osmi stupac s lijeva), stanice zubne pulpe su, u identičnim vremenskim točkama, izražavale više razine *Colla1-GFP* transgena. Endogeni *Colla1* i *OC* su podjednake razine izražaja kako u stanicama zubne pulpe tako i u kalvarijskim osteoblastima. Vremenom provedenom u kulturi njihova jačina izražaja se podjednako pojačavala kako u stanicama zubne pulpe tako i u kalvarijskim osteoblastima. Izražaj *Dmp1* je ustanovljen u kulturama stanica zubne pulpe i kalvarijskih osteoblasta na dan 12 i dan 20. Izmjereni izražaj *Dmp1* je vremenom opadao i bio u stanicama zubne pulpe niži na dan 20 nego na dan 12, dok se u kalvarijskih osteoblasta s funkcijom vremena kultivacije pojačavao. Na ovoj razini osjetljivosti *DSPP* izražaj nije otkriven niti u jednoj od mjerenih točaka ni kultura stanica zubne pulpe, niti kalvarijskih osteoblasta.



**Slika 32. Northern Blot analiza biljega diferencijacije kulture stanica zubne pulpe i kalvarijskih osteoblasta iz transgeničnih miševa.** Svaki stupac sadržava 10 $\mu$ g ukupne RNA izolirane iz: 5 dana starih intaktnih molara(1), zubne pulpe(2), kulture stanica zubne pulpe(3-5) i kulture kalvarijskih osteoblasta (6-8) na dane 6, 12 i 20. Membrana je hibridizirana probama za GFP, Colla1, OC, Dmp1, DSPP i 18S rRNA. **Intaktni molari** (stupac 1) izražavaju visoke razine Colla1-GFP, Colla1, OC i DSPP te niske razine Dmp1. **Izolirane zubne pulpe** (stupac 2) izražavaju niske razine Colla1-GFP te izuzetno niske razine Colla1. Izražaj OC, Dmp1 ni DSPP nije registriran. U **kulturi stanica** (stupci 3-8) izražaj **Colla1-GFP** je detektiran već 6. dan u kulturi stanica zubne pulpe, dok u kulturi kalvarijskih osteoblasta tada još nije prisutan. Nastavkom kulture (dan 12 i 20) izražaj Colla1-GFP se pojačava u obje kulture stanica s razlikom da su razine izražaja u stanica zubne pulpe izrazito više. Izražaj **Colla1** je prisutan u kulturi stanica zubne pulpe i kalvarijskih osteoblasta 6. dan te se nastavkom kulture usporedno pojačava u obje vrste kultura stanica. Izražaj **OC** nije prisutan niti u jednoj vrsti kulture stanica 6. dan, ali se u obje vrste kultura stanica pojačava nastavkom kulture (12 i 20 dan). **Dmp1** izražaj je prisutan 12 dan u obje vrste kulture stanica, ali u kulturi stanica zubne pulpe slabi 20. dan, dok se u kulturi kalvarijskih osteoblasta pojačava 20. dan. DSPP izražaj na ovoj razini detekcije nije uočen niti u jednoj vrsti kultura stanica u niti jednoj promatranoj vremenskoj točki.

S ciljem otkrivanja niskih razina DSPP izražaja u kulturi stanica zubne pulpe, izolirana ukupna RNA iz kultura stanica je prepisana *reverznom transkriptazom* u komplementarnu DNA (cDNA) koja je potom umnožena lančanom reakcijom polimeraze (*eng.* Polymerase Chain Reaction, PCR). Umnažanje je izvršeno specifičnim početnicama za DSPP te GAPDH. U svim uzorcima je potvrđen integritet izolirane RNA prisustvom vrpce od 900 pb specifične za GAPDH cDNA (slike 33A i B). Produkt specifičan za DSPP od 556 pb je dobiven nakon 30 ciklusa (slika 33A) u uzorcima izoliranim iz intaktnih molara i iz kulture stanica zubne pulpe nakon 20 dana. U ostalim uzorcima nakon 30 ciklusa umnažanja nije detektiran DSPP cDNA. DSPP cDNA je dokazana nakon 35 ciklusa umnažanja (slika 33B) u stanicama zubne pulpe kultiviranim 12 dana, dok u kalvarijskim osteoblastima nije detektiran niti nakon 20 dana kultivacije (slika 33B). Umnažanje samo izolirane RNA, bez reverzne transkriptaze, nije otkrilo GAPDH ili DSPP izražaj i time isključilo genomsku kontaminaciju (podatak nije prikazan).



**Slika 33. Izražaj DSPP u kulturi stanica zubne pulpe i kalvarijskih osteoblasta analiziran RT-PCR om.** Stupci 1-6 predstavljaju produkte umnažanja nakon 30 ciklusa. Stupac 7 je standardizirana ljestva od 100pb. Stupci 8 i 9 su produkti umnažanja nakon 35 ciklusa. Nakon 30 ciklusa umnažanja dobiven je očekivani produkt DSPP-a od 556 pb u intaktnim molarima (stupac 1). DSPP produkt je također detektiran u 20 dana staroj kulturi stanica zubne pulpe (stupac 4). Umnažanjem tijekom 35 ciklusa dobiven je DSPP produkt i u 12 dana staroj kulturi stanica zubne pulpe (stupac 8). U ostalim uzorcima nije detektiran DSPP izražaj (Stupci 2, 3, 5, 6 i 9). GAPDH produkt od 900 pb je ustanovljen u svim uzorcima što je potvrda integriteta izolirane RNA.



## 5 RASPRAVA

## Histološka ispitivanja:

Histološkim ispitivanjima ustanovili smo da je izražaj Colla1-GFP tijekom razvoja čeljusti ograničen na funkcionalne i zrele odontoblaste, te osteoblaste i osteocite okolnog koštanog potpornog tkiva. Podaci pokazuju korelaciju između izražaja Colla1-GFP i *DSPP* kod odontoblasta te *Dmp1* kod osteocita.

Raspodjela (fenotip) izražaja Colla1-GFP kod razvoja zuba pokazuje da on nije prisutan u zubnim tkivima rane faze razvoja, kao niti kasnije u preodontoblastima niti u polarizirajućim odontoblastima. Colla1-GFP je najranije izražen u funkcionalnim odontoblastima čim počnu lučiti predentin, a njegov intenzitet je izrazito jak u odontoblastima koji su u dodiru s predentinom koji se već počeo mineralizirati i pokriven je slojem dentina. Ovaj visoki intenzitet Colla1-GFP izražaja je prisutan kroz cijeli promatrani vijek aktivnih odontoblasta.

Korelacija izražaja transgeničnog Colla1-GFP i endogenog  $\alpha 1(I)$  kolagena za vrijeme diferencijacije odontoblasta potvrđuju (osim u pulpi) prijašnja istraživanja s Colla1CAT životinjama. Kod Colla1CAT životinja je za vizualizaciju rezultata korišteno imunološko bojanje te je moguće ili da ona nisu bila dovoljno osjetljiva ili da su istraživači pogriješili previdjevši slabi izražaj u pulpi i odbacili kao pozadinsko nespecifično obojenje (57). U ovom istraživanju je ustanovljen slab, ali prisutan izražaj Colla1-GFP u pojedinim stanicama zubne pulpe koji je potvrđen kasnije i analizom protočne citometrije.

Prilikom usporedbe izražaja Colla1-GFP s izražajem *DSPP* i *Dmp1* ustanovljeno je da Colla1-GFP prilikom diferencijacije odontoblasta prati izražaj *DSPP* u njima.

Ovim pokusima je ustanovljeno da je Colla1-GFP izražaj prisutan i u koštanim razvojnim stanicama: osteoblastima i osteocitima te je u korelaciji s izražajem *Dmp1* u osteocitima. Prethodna istraživanja su također pokazala ograničeni izražaj *Dmp1* u mladim osteocitima (66, 68), što je i ovim istraživanjem potvrđeno.

Ovaj fenotip Colla1-GFP i njegova specifičnost izražaja u funkcionalnim i zrelim odontoblastima te osteoblastima i osteocitima ukazuje na mogućnost praćenju diferencijacije odontoblasta. Stoga, ovi podaci opravdavaju korištenje ovih životinja u svrhu pronalaženja, pobuđivanja, vođenja i istovremenog promatranja progenitorskih stanica zubne pulpe i kosti.

#### Diferencijacijski potencijal komadića zubne pulpe

Dugo vremena je u literaturi poznata sposobnost pulpo-dentinskog kompleksa da odgovori na razne vrste patoloških stanja i ozljeda pomoću lokaliziranog ubrzanog odlaganja dentinskog matriksa. Postmitotični odontoblasti su zaslužni za lučenje primarnog i sekundarnog dentina. Oni u slučaju blagih ozljeda, na mjestima tih ozljeda ili iritacija, počinju u većim količinama sintetizirati i ubrzano lučiti reakcijski dentinski matriks tubularne građe sličan fiziološki izlučenom dentinu (37, 69). Pretpostavlja se da se prilikom tih blagih ozljeda oslobađaju medijatori poput TGF $\beta$  i njihovi pripadajući proteoglikani IGF-I i II, signalne molekule članova BMP i FGF obitelji, slično kao i za vrijeme fiziološke dentinogeneze, te dovode do pojačanog lučenja produkata odontoblasta i stvaranja reaktivnog dentina (27, 37). Pretpostavlja se da se ovi faktori i medijatori nalaze ukopani u dentinskom matriksu te da se otpuštaju prilikom demineralizacije (karijes i sl. patološki procesi) (27, 37).

U drugim patološkim slučajevima, gdje dolazi do smrti i uništenja odontoblasta, ozlijeđeni dentin se zamjenjuje reparativnim dentinom kojeg luče novodiferencirane stanice, poput odontoblasta (27, 38, 70). Smatra se da lučenje reparativnog dentina *in vivo* rezultira stvaranjem tubularnog dentina, koji pokazuje znakove diskontinuiteta, te ponekad i manjka tubula, a sve s ciljem smanjivanja dentinske propusnosti. Prema tome reparativni dentin predstavlja složeniji niz bioloških procesa. On ovisi o mnogim faktorima, kao raspoloživosti progenitorskih stanica te prisutnosti odgovarajućih molekularnih glasnika za indukciju diferencijacije nove generacije odontoblasta.

Mehanizmi i slijed događaja koji reguliraju proces reakcijske dentinogeneze su bili predmetom mnogih istraživanja koji su koristili različite *in vivo* i *in vitro* (19, 27, 37). Ova istraživanja su rezultirala važnim, ali indirektnim podacima o dentinogenom potencijalu stanica zubne pulpe. Premda iz raspoloživih podataka proizlazi da su novodiferencirane stanice poput odontoblasta koje odlažu reparativni dentin podrijetlom iz zubne pulpe, njihovo točno podrijetlo i prekursori te signalni putevi koji dovode do diferencijacije novih odontoblasta, nisu jednoznačno identificirani. Nedostaci prethodnih istraživanja su brojni i uključuju nepostojanje točne identifikacije progenitorskih stanica te manjkavo karakteriziranje fenotipa ovih novonastalih stanica iz stanica zubne pulpe.

Korišteni koronarni dijelovi zubne pulpe transgeničnih Colla1-GFP miševa očišćeni su od odontoblasta. Dijelovi su transplantirani pod bubrežnu kapsulu gdje su se iz njih izdiferencirale stanice poput odontoblasta. Fenotip izdiferenciranih stanica je okarakteriziran korištenjem izražaja Colla1-GFP, *DSPP* i *Dmp1* te morfoloških karakteristika stanica i strukture stvorenog tkiva. Dobiveni rezultati potvrđuju da se pojedine stanice iz koronarnih dijelova zubne pulpe bez odontoblasta mogu izdiferencirati u stanice koje su sposobne lučiti tubularni reparatorni dentin. Prikazane izdužene i polarizirane stanice su u bliskom odnosu sa svojim izlučenim tkivom te posjeduju snažan Colla1 i *DSPP* izražaj. Stanice sa snažnim *DSPP* izražajem iskazuju i dobro razvijene stanične nastavke koji se pružaju u tubularnu strukturu izlučenog tkiva.

Stvaranje atubularne osteotipične strukture tkiva iz izoliranih koronarnih komadića zubne pulpe je vidljivo u rezultatima ovog istraživanja. Premda ovo tkivo morfološki sličí mladom koštanom tkivu na što ukazuje činjenica da one ne posjeduju odontoblastne produljetke, izražaj Colla1 i *DSPP*-a u zarobljenim stanicama ukazuje na njihov odontoblastni fenotip.

Sposobnost pojedinih stanica izoliranih iz postnatalne zubne pulpe da se izdiferenciraju u nove stanice poput odontoblasta i luče reparatorni dentin, nalaže da se u zubnoj pulpi nalazi populacija matičnih stanica sličnih embrionalnim matičnim stanicama.

Diferencijacija ovih stanica u fiziološkim uvjetima rasta i razvoja ovisi o induktivnim signalima iz bazalne membrane te bez nje po nekim autorima nije moguća (17). Međutim, druga istraživanja su došla do rezultata da je diferencijacija stanica sličnih odontoblastima koje će lučiti tubularni matriks, moguća nakon transplantacije pulpnog tkiva unutar fiziološkog okruženja zuba bez bazalne membrane (71) ili nakon rekombinacije pulpnog tkiva s epitelnim korijenskim tračkom (72). Izolirano pulpno tkivo ukoliko se implantira na druga mjesta poput: bubreg ili prednja očna komorica, stvara osteotipične strukture, ali ne i reparativni dentin (71, 73-76).

Pulpno tkivo transplantirano ispod bubrežne kapsule je i bez dentalnog epitela i bez egzogenih signala sposobno izdiferencirati stanice koje će lučiti kako osteotipični, tako i reparativni dentinski matriks. Ovi rezultati nalažu mogućnost da se na reparativnu dentinogenezu stanice zubne pulpe mogu pobuditi induktivnim signalima koji potiču iz međustanične tvari samog tkiva i/ili iz signala osteotipičnog atubularnog matriksa. Ova mogućnost uloge osteotipičnog matriksa za vrijeme reparativne dentinogeneze nalaže sličnost s ulogom bazalne membrane za vrijeme fiziološke dentinogeneze *in vivo*.

Dobiveni rezultati nalažu da stvaranju reparativnog dentina prethodi stvaranje atubularnog osteotipičnog matriksa (poznat u literaturi i kao *fibrodentin*), što je i u skladu s obavljenim rezultatima u literaturi (27, 77). Prethodna istraživanja navode da je, iako nespecifično, odlaganje atubularnog osteotipičnog matriksa ključno u inicijaciji reparativne dentinogeneze (27, 77). Iz navedenog je moguće zaključiti da je osteotipični matriks izvor potrebnih indukcijskih molekulskih signala.

Ovi pokusi transplantacije dijelova pulpe pokazuju da su pulpne stanice sposobne diferencirati se osim u odontoblaste isto tako u određenim uvjetima i osteogenog potencijala. Zubne pulpe dokazuju visoku razinu Coll1a1-GFP i *Dmp1* izražaja u stanicama nalik na osteocite koje su uložene u izlučeni matriks, te odsustvo *DSPP* izražaja u istima. Ovaj osteogeni potencijal zubne pulpe je u skladu s objavljenim radovima osteogenog potencijala zubne vrećice (78) i odrasle pulpe (73, 76).

Prisutnost ograničenog broja stanica koje ne izražavaju Coll1a1-GFP, a nalaze se kao osteociti uložene u stvorenom tkivu, ukazuje na doprinos stanica domaćina u stvaranju ovog koštanog tkiva. Za razliku od stanica poput osteocita, polarizirane i cilindrične stanice poput odontoblasta su u uvijek izražavale Coll1a1-GFP, što ukazuje da su stanice zaslužne za lučenje reparativnog dentina podrijetlom iz transplantiranih komadića pulpe transgeničnih životinja. Ova opažanja nalažu činjenicu da stanice sa svojim izvanstaničnim matriksom, u sklopu transplantiranih djelića pulpe, posjeduju osteoinduktivna svojstva koja mogu pobuditi i regrutirati stanice domaćina na stvaranje koštanog tkiva.

Višestruki razvojni potencijal zubne pulpe iz rezultata ovog istraživanja je u skladu s do sada objavljenim radovima na različitim životinjskim modelima (70, 75, 79) i nalaže da zubna pulpa miševa sadrži, poput humane zubne (48, 80), tkivne zametne stanice rezerve.

Iz dobivenih rezultata je jasno da postnatalna zubna pulpa miševa sadrži stanice prekursore koje su se sposobne diferencirati u stanice poput odontoblasta i lučiti reparativni dentinski matriks. Iz transplantacijskih pokusa nije jasno da li tu sposobnost posjeduju sve stanice zubne pulpe ili samo ograničena subpopulacija stanica. Zubna pulpa je dobro prokrvljeno specifično vezivno tkivo. Staničnu komponentu čine većinom fibroblasti i druga po zastupljenosti vrstu stanica, odontoblasti. Uz ove dvije najzastupljenije skupine stanica nalazimo i tkivne makrofage, endotelne stanice, stanice u sklopu stijenki arteriola i venula, te limfocite (1). Odontoblasti su cilindrične stanice, smještene u jedinstvenom sloju na periferiji

pulpe. Fibroblasti su najbrojnije stanice zubne pulpe i smještene većinom u zoni bogatoj stanicama koronarnog dijela zubne pulpe (1). Smatra se da uz ove poznate vrste stanica postoje u pulpi i skupina nediferenciranih mezenhimalnih stanica koje stvaraju vezivno tkivo zubne pulpe, ali ujedno starenjem količina staničnih elemenata u zubnoj pulpi opada (1, 26, 27). Opažene niske razine Colla1-GFP izražaja u pojedinim stanicama zubne pupe kod promatranih transgeničnih miševa otvaraju mogućnosti za detaljnije proučavanje raznovrsnosti unutar populacije stanica zubne pulpe. Zbimo dobiveni rezultati dokazuju da se stanice iz koronarnog dijela zubne pulpe miša mogu diferencirati u stanice poput odontoblasta i lučiti izvanstanični matriks prožet tubulima te osteotipičan dentinski matriks. Ovim pokusima je pokazana sposobnost da se iz dijelova zubne pulpe određene stanice specijaliziraju kako u koštane stanice, koje luče tkivo nalik na koštano tkivo u kojima zaostaju osteociti, tako i u hondrocite koji luče hrskavicu.

#### Kultivacija stanica zubne pulpe *in vitro*:

Posljednjih godina je objavljeno nekoliko radova koji zeleno fluorescerirajući protein (GFP) koriste za praćenje stupnja diferencijacije osteoblasta koristeći promotorsku aktivaciju promotorskih fragmenata Colla1, ugrađenu ispred kodirajućeg niza GFP proteina (59, 68, 81, 82). Histološkim tehnikama *in vivo* je ustanovljen vremenski slijed aktivacije transgena ovisno o stupnju diferencijacije osteoblasta, a isti je potvrđen i *in vitro* pokusima (59, 68). U primarnim kulturama stanica koštane srži i kalvarijskih osteoblasta ustanovljeno je: da je Colla1-GFP jedan od ranih biljega diferencijacije osteoblasta. Kod kalvarijskih stanica Colla1-GFP izražaj se javlja tek kod pojave mineraliziranih čvorića i pojačava njihovim rastom, dok u okolnim stanicam nije izražen.

Histološkim promatranjem ustanovljeno je da se Colla1-GFP javlja u odontoblastima u mladim odontoblastima koji počinju svoju sekretornu funkciju te se pojačava s njihovim

sazrijevanjem. U *in vitro* istraživanju je ustanovljeno da se stanice dobivene uz zubnih pulpi mogu uzgajati i da tvore klonogene skupine. Određene skupine izražavaju povišene razine alkalne fosfataze (AP) značajne za mineralizirana tkiva, dok postoje i skupine koji ne izražavaju AP. Kod promatranja *Colla1*-GFP izražaja *in vitro* ustanovljeno je da je on izražen već kod preko 75% svježe izoliranih stanica zubne pulpe. Izražaj je na početku kulture stanica relativno slab, ali se s diferencijacijom stanica i pojavom mineraliziranih čvorića pojačava. Ova prisutnost u ovako visokom postotku izoliranih stanica zubne pulpe se razlikuje od rezultata kalvarijskih osteoblasta izoliranih istom metodom (59). Ove dvije vrste stanica drukčije izražavaju transgenični GFP, ali pokazuju sličnost u izražaju endogenog *Colla1* te drugim biljezima mineralizacije kao *OC* i *Dmpl*. *Colla1*, *OC* i *Dmpl* su biljezi mineralizacije koštanih stanica te kod njih nije ustanovljena razlika. *DSPP* se smatra dentin-specifičnim biljegom diferencijacije odontoblasta što je i potvrđeno prethodno navedenim histološkim promatranjem izražaja *in situ* hibridizacijskom analizom. Na razini osjetljivosti Northern blot hibridizacije nije ustanovljena razlika u kulturama stanica zubne pulpe i kalvarijskih osteoblasta jer su obje vrste bile negativne. Ovaj rezultat govori u prilog osteogenog potencijala stanica zubne pulpe. Razlika kulturi stanica zubne pulpe i kalvarijskih osteoblasta je ustanovljena puno osjetljivijom RT-PCR metodom. Ova analiza je ustanovila *DSPP* izražaj u stanicama zubne pulpe kultivirane 20 dana s 30 ciklusa, a s 35 ciklusa i u uzorcima kultiviranim 12 dana. Kultura stanica pripravljena od kalvarijskih osteoblasta nije pokazivala *DSPP* izražaj nakon 30, a niti nakon 35 ciklusa PCR-a. Korištenjem ove metode ustanovljen je odontoblastni fenotip stanica zubne pulpe.

Velika razlika u udjelu stanica osteoblastnog, u odnosu na odontoblastni fenotip, koji je ustanovljen tek vrlo osjetljivom RT-PCR metodom, govori u prilog sposobnosti stanica zubne pulpe, lišenih izvanstaničnog matriksa, da se diferenciraju u odontoblaste. Kod korištenih *in vitro* uvjeta je do pojave odontoblastnog fenotipa došlo tek nakon 12 te 20 dana

kultivacije, što je i do tri puta sporije nego kod transplantacijskih pokusa gdje je do njega došlo već nakon 7 do 10 dana.

Razlog za ove razlike u brzini diferencijacije se vjerojatno krije u nedostatku induksijskih signala koji su pohranjeni u izvanstaničnom matriksu stanica zubne pulpe, ali i u vjerovatno nesavršenosti korištenih uvjeta.

Daljnja istraživanja su potrebna da se pojača i ubrza indukcija odontoblastnog fenotipa kod kulture stanica zubne pulpe.



## 6. ZAKLJUČCI:

- Korišteni transgenični pOBCol2.3GFP miševi su se pokazali pogodnima za praćenje stupnjeva diferencijacije odontoblasta korištenjem Col1a1-GFP izražaja kao biljega početka diferenciranja odontoblasta.
- Koronarni dijelovi postnatalne zubne pulpe miša zadržavaju postnatalno progenitorske stanice koje su se sposobne diferencirati u odontoblaste sa svim njihovim morfološkim i funkcionalnim značajkama.
- Diferencijacija progenitorskih stanica zubne pulpe u odontoblaste je moguća ukoliko se komadići pulpnog tkiva transplantiraju u pogodno okruženje kao korišteno mjesto ispod bubrežne kapsule domaćina.
- Diferencijacija progenitorskih stanica zubne pulpe u odontoblaste je moguća i u korištenim *in vitro*, a ne samo u *in vivo* uvjetima.
- Izanstanični matriks stanicama ubrzava diferencijaciju progenitorskih stanica zubne pulpe u odontoblaste, a bez kojeg one pokazuju dvojni fenotip odontoblastni i osteoblastni.

**7. LITERATURA:**

1. Cate T. Dentin-pulp complex. U: A. Row and T. Cate, ur. Oral histology, development, structure and function. Mosby: St. Louis (MI). 1998; str. 512-530.
2. Sharpe PT. Fish scale development: Hair today, teeth and scales yesterday? *Curr Biol.* 2001; 11: R751-2.
3. Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci.* 2003; 116: 1647-8.
4. Nadiri A, Kuchler-Bopp S, Haikel Y, Lesot H. Immunolocalization of BMP-2/-4, FGF-4, and WNT10b in the developing mouse first lower molar. *J Histochem Cytochem.* 2004; 52: 103-12.
5. Kettunen P, Loes S, Furmanek T, Fjeld K, Kvinnsland IH, Behar O, Yagi T, Fujisawa H, Vainio S, Taniguchi M, Luukko K. Coordination of trigeminal axon navigation and patterning with tooth organ formation: epithelial-mesenchymal interactions, and epithelial Wnt4 and Tgfbeta1 regulate semaphorin 3a expression in the dental mesenchyme. *Development.* 2005; 132: 323-34. Epub 2004 Dec 16.
6. Maas R and Bei M. The genetic control of early tooth development. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997; 8: 4-39.
7. Tucker AS and Sharpe PT. Molecular genetics of tooth morphogenesis and patterning: the right shape in the right place. *J Dent Res.* 1999; 78: 826-34.
8. Thesleff I and Mikkola M. The role of growth factors in tooth development. *Int Rev Cytol.* 2002; 217: 93-135.
9. Aberg T, Wozney J, Thesleff I. Expression patterns of bone morphogenetic proteins (Bmps) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. *Dev Dyn.* 1997; 210: 383-96.

10. Ornitz DM and Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2001; 2: REVIEWS3005. Epub 2001 Mar 9.
11. Kettunen P and Thesleff I. Expression and function of FGFs-4, -8, and -9 suggest functional redundancy and repetitive use as epithelial signals during tooth morphogenesis. *Dev Dyn.* 1998; 211: 256-68.
12. Kettunen P, Laurikkala J, Itaranta P, Vainio S, Itoh N, Thesleff I. Associations of FGF-3 and FGF-10 with signaling networks regulating tooth morphogenesis. *Dev Dyn.* 2000; 219: 322-32.
13. Kratochwil K, Galceran J, Tontsch S, Roth W, Grosschedl R. FGF4, a direct target of LEF1 and Wnt signaling, can rescue the arrest of tooth organogenesis in *Lef1(-/-)* mice. *Genes Dev.* 2002; 16: 3173-85.
14. Jernvall J and Thesleff I. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev* 2000; 92: 19-29.
15. Peters H and Balling R. Teeth. Where and how to make them. *Trends Genet.* 1999; 15: 59-65.
16. Thesleff I, Vainio S, Salmivirta M, Jalkanen M. Syndecan and tenascin: induction during early tooth morphogenesis and possible interactions. *Cell Differ Dev.* 1990; 32: 383-9.
17. Ruch JV, Lesot H, Begue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol.* 1995; 39: 51-68.
18. Magloire H, Romeas A, Melin M, Couble ML, Bleicher F, Farges JC. Molecular regulation of odontoblast activity under dentin injury. *Adv Dent Res.* 2001; 15: 46-50.
19. Linde A and Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4: 679-728.

20. Butler WT. Dentin matrix proteins and dentinogenesis. *Connect Tissue Res* 1995; 33: 59-65.
21. Butler WT. Dentin matrix proteins. *Eur J Oral Sci* 1998; 106: 204-10.
22. Bleicher F, Couble ML, Farges JC, Couble P, Magloire H. Sequential expression of matrix protein genes in developing rat teeth. *Matrix Biol.* 1999; 18: 133-43.
23. Bleicher F, Couble ML, Buchaille R, Farges JC, Magloire H. New genes involved in odontoblast differentiation. *Adv Dent Res.* 2001; 15: 30-3.
24. Rutherford B and Fitzgerald M. A new biological approach to vital pulp therapy. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995; 6: 218-29.
25. Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med* 1996; 7: 104-33.
26. Rutherford B. Dentin regeneration. *Adv Dent Res* 1995; 9: 14.
27. Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent* 2000; 28: 77-92.
28. MacDougall M, Simmons D, Luan X, Nydegger J, Feng J, Gu TT. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. Dentin phosphoprotein DNA sequence determination. *J Biol Chem* 1997; 272: 835-42.
29. D'Souza RN, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Ohshima T, Kulkarni AB, MacDougall M. Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1 (Dmp1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 2040-9.
30. About I, Bottero MJ, de Denato P, Camps J, Franquin JC, Mitsiadis TA. Human dentin production in vitro. *Exp Cell Res.* 2000; 258: 33-41.

31. 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; 66: 129-38.
32. Mizuno M, Miyamoto T, Wada K, Watatani S, Zhang GX. Type I collagen regulated dentin matrix protein-1 (Dmp-1) and osteocalcin (OCN) gene expression of rat dental pulp cells. *J Cell Biochem.* 2003; 88: 1112-9.
33. Genovese C, Rowe D, Kream B. Construction of DNA sequences complementary to rat alpha 1 and alpha 2 collagen mRNA and their use in studying the regulation of type I collagen synthesis by 1,25-dihydroxyvitamin D. *Biochemistry* 1984; 23: 6210-6.
34. Pavlin D, Lichtler AC, Bedalov A, Kream BE, Harrison JR, Thomas HF, Gronowicz GA, Clark SH, Woody CO, Rowe DW. Differential utilization of regulatory domains within the alpha 1(I) collagen promoter in osseous and fibroblastic cells. *J Cell Biol* 1992; 116: 227-36.
35. Krebsbach PH, Harrison JR, Lichtler AC, Woody CO, Rowe DW, Kream BE. Transgenic expression of COL1A1-chloramphenicol acetyltransferase fusion genes in bone: differential utilization of promoter elements in vivo and in cultured cells. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 5168-74.
36. Bogdanovic Z, Bedalov A, Krebsbach PH, Pavlin D, Woody CO, Clark SH, Thomas HF, Rowe DW, Kream BE, Lichtler AC. Upstream regulatory elements necessary for expression of the rat COL1A1 promoter in transgenic mice. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 285-92.
37. Smith AJ, Murray PE, Sloan AJ, Matthews JB, Zhao S. Trans-dentinal stimulation of tertiary dentinogenesis. *Adv Dent Res.* 2001; 15: 51-4.

38. Tziafas D, Veis A, Alvanou A. Inability of calcium hydroxide to induce reparative dentinogenesis at non-peripheral sites of dog dental pulp. *Eur J Oral Sci.* 1996; 104: 623-6.
39. Ruch JV. Odontoblast commitment and differentiation. *Biochem Cell Biol.* 1998; 76: 923-38.
40. Lovell-Badge R. The future for stem cell research. *Nature* 2001; 414: 88-91.
41. Chai Y and Slavkin HC. Prospects for tooth regeneration in the 21st century: A perspective. *Microsc Res Tech* 2003; 60: 469-79.
42. Ishiwata I, Tokeida Y, Iguchi M, Ishiwata C, Kiguchi K, Yasumoto S, Sato K, Tachibana T, Hashimoto H, Ishikawa H. New approach for the establishment of mouse early embryonic stem cells and induction of their differentiation. *Hum Cell* 2001; 14: 283-91.
43. Rizzino A. Embryonic stem cells provide a powerful and versatile model system. *Vitam Horm* 2002; 64: 1-42.
44. Orkin SH and Zon LI. Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. *Nat Immunol* 2002; 3: 323-8.
45. Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 13726-31.
46. Bianco P and Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature* 2001; 414: 118-21.
47. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001; 19: 180-92.

48. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 13625-30.
49. Bordignon C and Roncarolo MG. Therapeutic applications for hematopoietic stem cell gene transfer. *Nat Immunol* 2002; 3: 318-21.
50. Vacanti CA and Vacanti JP. The science of tissue engineering. *Orthop Clin North Am* 2000; 31: 351-6.
51. Terada S, Sato M, Sevy A, Vacanti JP. Tissue engineering in the twenty-first century. *Yonsei Med J* 2000; 41: 685-91.
52. Simpson K, Hogaboam CM, Kunkel SL, Harrison DJ, Bone-Larson C, Lukacs NW. Stem cell factor attenuates liver damage in a murine model of acetaminophen-induced hepatic injury. *Lab Invest* 2003; 83: 199-206.
53. Gao J, Dennis JE, Solchaga LA, Awadallah AS, Goldberg VM, Caplan AI. Tissue-engineered fabrication of an osteochondral composite graft using rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2001; 7: 363-71.
54. Caplan AI and Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 2001; 7: 259-64.
55. Robey PG. Stem cells near the century mark. *J Clin Invest* 2000; 105: 1489-91.
56. Fitzgerald M, Chiego DJ, Jr., Heys DR. Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Arch Oral Biol.* 1990; 35: 707-15.
57. Thomas HF, Feldman JA, Bedalov A, Woody CO, Clark SH, Mack K, Lichtler AC. Identification of regulatory elements necessary for the expression of the COL1A1 promoter in murine odontoblasts. *Connect Tissue Res.* 1995; 33: 81-5.

58. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 1994; 263: 802-5.
59. Kalajzic I, Kalajzic Z, Kaliterna M, Gronowicz G, Clark SH, Lichtler AC, Rowe D. Use of type I collagen green fluorescent protein transgenes to identify subpopulations of cells at different stages of the osteoblast lineage. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 15-25.
60. Sheerman DC and Hrapchak BB, *Theory and practice of histotechnology*. 2nd ed. 1980, Columbus OH: Battelle Press.
61. Mina M, Wang YH, Ivanisevic AM, Upholt WB, Rodgers B. Region- and stage-specific effects of FGFs and BMPs in chick mandibular morphogenesis. *Dev Dyn* 2002; 223: 333-52.
62. Brody J, Young P, Cunha G. Renal Capsule Grafting. <http://mammary.nih.gov/tools/mousework/Cunha001/index.html> 1998.
63. Celeste AJ, Rosen V, Buecker JL, Kriz R, Wang EA, Wozney JM. Isolation of the human gene for bone gla protein utilizing mouse and rat cDNA clones. *Embo J* 1986; 5: 1885-90.
64. Begue-Kirn C, Krebsbach PH, Bartlett JD, Butler WT. Dentin sialoprotein, dentin phosphoprotein, enamelysin and ameloblastin: tooth-specific molecules that are distinctively expressed during murine dental differentiation. *Eur J Oral Sci*. 1998; 106: 963-70.
65. Kamiya N and Takagi M. Differential expression of dentin matrix protein 1, type I collagen and osteocalcin genes in rat developing mandibular bone. *Histochem J*. 2001; 33: 545-52.



66. Toyosawa S, Shintani S, Fujiwara T, Ooshima T, Sato A, Ijuhin N, Komori T. Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 2001; 16: 2017-26.
67. Zussman WV. Tetracycline-induced fluorescence in dentin and enamel matrix. *Lab Invest.* 1966; 15: 589-96.
68. Kalajzic I, Braut A, Guo D, Jiang X, Kronenberg MS, Mina M, Harris MA, Harris SE, Rowe DW. Dentin matrix protein 1 expression during osteoblastic differentiation, generation of an osteocyte GFP-transgene. *Bone.* 2004; 35: 74-82.
69. Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Begue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol.* 1995; 39: 273-80.
70. Tziafas D, Alvanou A, Panagiotakopoulos N, Smith AJ, Lesot H, Komnenou A, Ruch JV. Induction of odontoblast-like cell differentiation in dog dental pulps after in vivo implantation of dentine matrix components. *Arch Oral Biol.* 1995; 40: 883-93.
71. Inoue T and Shimono M. Repair dentinogenesis following transplantation into normal and germ-free animals. *Proc Finn Dent Soc.* 1992; 88: 183-94.
72. Thomas HF and Kollar EJ. Differentiation of odontoblasts in grafted recombinants of murine epithelial root sheath and dental mesenchyme. *Arch Oral Biol.* 1989; 34: 27-35.
73. Zussman WV. Osteogenic activity of odontoblasts in transplanted tooth pulps. *J Dent Res.* 1966; 45: 144-51.
74. Luostarinen V and Ronning O. Differences in the osteoinductive potential of transplanted isogenic dental structures of the rat. *Acta Anat (Basel).* 1977; 99: 76-83.
75. Yamamura T. Differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with reference to pulpal wound healing. *J Dent Res.* 1985; 64: 530-40.

76. Takei K, Inoue T, Shimono M, Yamamura T. An experimental study of dentinogenesis in autografted dental pulp in rats. *Bull Tokyo Dent Coll.* 1988; 29: 9-19.
77. Smith AJ and Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001; 12: 425-37.
78. Yoshikawa DK and Kollar EJ. Recombination experiments on the odontogenic roles of mouse dental papilla and dental sac tissues in ocular grafts. *Arch Oral Biol.* 1981; 26: 303-7.
79. Nakashima M. Dentin induction by implants of autolyzed antigen-extracted allogeneic dentin on amputated pulps of dogs. *Endod Dent Traumatol.* 1989; 5: 279-86.
80. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002; 81: 531-5.
81. Jiang X, Kalajzic Z, Maye P, Braut A, Bellizzi J, Mina M, Rowe DW. Histological analysis of GFP expression in murine bone. *J Histochem Cytochem.* 2005; 53: 593-602.
82. Bilic-Curcic I, Kronenberg M, Jiang X, Bellizzi J, Mina M, Marijanovic I, Gardiner EM, Rowe DW. Visualizing levels of osteoblast differentiation by a two-color promoter-GFP strategy: Type I collagen-GFPcyan and osteocalcin-GFPtpz. *Genesis.* 2005; 43: 87-98.

## ŽIVOTOPIS

### DATUM I MJESTO ROĐENJA

21. srpnja 1973. u Rijeci.

### ZAPOSLENJE

Katedra za bolesti zuba - Studij stomatologije

Medicinski fakultet - Sveučilište u Rijeci

Krešimirova 40 -51000 Rijeka - HRVATSKA

Telefon: 051-34 56 35 ; Fax: 051- 34 56 30

e-pošta: [alenb@medri.hr](mailto:alenb@medri.hr)



### ŠKOLOVANJE

Osnovna škola: OŠ“Vladimir Gortan”.

Srednja škola: “Centar za kadrove u obrazovanju i kulturi – matematički smjer”.

1991. – 1996. Studij stomatologije Medicinskog fakulteta u Rijeci.

1998. Položen stručni ispit za doktora stomatologije.

1997. – 1999. Poslijediplomski studij “Biomedicina” pri Medicinskom fakultetu u Rijeci.

2000. – 2003. Znanstveno usavršavanje na Uconn Health Center, Department of Pediatric Dentistry, Farmington, CT, SAD.

2003. – 2006. Specijalistički staž iz stručnog polja “Endodoncije i restorativne stomatologije” na Stomatološkom fakultetu u Zagrebu.

## **STRUČNE I AKADEMSKE TITULE:**

30. prosinca 1996. doktor stomatologije (Sveučilište u Rijeci; Medicinski fakultet; Studij Stomatologije).
26. srpnja 2001. magistar znanosti (Magistarska radnja: "Progresija bakterijske infekcije iz korijenskog kanala u okolna tkiva na modelu psećih zuba"; Rijeka, 2001.).

## **NAGRADE:**

2005. Nagrada Medicinskog fakulteta u Rijeci za "Najboljeg mladog znanstvenika" u kliničkom području.

## **NASTAVNA DJELATNOST:**

1991. –1996 . Student - Demonstrator na: Zavodu za Fiziku
1991. – 1995. Student - Demonstrator na: Zavodu za Histologiju i Embriologiju
1997. – 2000 . Seminari i vježbe na dodiplomskoj nastavi predmeta Dentalna patologija pri Katedri za Bolesti Zuba, Medicinskog fakulteta u Rijeci kao mlađi asistent
2003. – 2006. Seminari i vježbe na dodiplomskoj nastavi predmeta Dentalna patologija pri Katedri za bolesti zuba, Medicinskog fakulteta u Rijeci kao asistent

## PUBLIKACIJE:

## KVALIFIKACIJSKI RADOVI:

**Braut A.** Progresija bakterijske infekcije iz korijenskog kanala u okolna tkiva na modelu psećih zuba, 2001. (magistarski rad)

## ZNANSTVENI RADOVI:

1. **Braut A**, Kalajzic I, Kalajzic Z, Rowe DW, Kollar EJ, and Mina M. Colla1-GFP transgene expression in developing incisors. *Connect. Tissue Res.* 2002. Vol 43. 216-9.
2. Kalajzic Z, Liu P, Kalajzic I, Du Z, **Braut A**, Mina M, Canalis E and Rowe DW. Analysis of Osteocalcin and Collagen GFP Transgenes. *Bone.* 2002. 16;554-61.
3. **Braut A**, Kollar EJ, Mina M. Analysis of the odontogenic potential of dental pulp *in vivo* using a Colla1-2.3-GFP transgene. *Int.J.Dev.Biol.* 2003. May;47(4):281-92.
4. Mina M. And **Braut A**. New insight into progenitor/stem cells in dental pulp using Colla1-GFP transgenes. *Cells Tissues Organs.* 2004. 176(1-3):120-33.
5. Kalajzic I, **Braut A**, Guo D, Jiang X, Kronenberg MS, Mina M, Harris MA, Harris SE, Rowe DW. Dentin matrix protein 1 expression during osteoblastic differentiation, generation of an osteocyte GFP-transgene. *Bone.* 2004. Jul;35(1):74-82.
6. Liu F, Woitge HW, **Braut A**, Kronenberg MS, Lichtler AC, Mina M, Kream BE. Expression and activity of osteoblast-targeted Cre recombinase transgenes in murine skeletal tissues. *Int J Dev Biol.* 2004. Sep;48(7):645-53.
7. Liu W, Sun X, **Braut A**, Mishina Y, Behringer RR, Mina M, Martin JF. Distinct functions for Bmp signaling in lip and palate fusion in mice. *Development.* 2005 Mar;132(6):1453-61.
8. Jiang X, Kalajzic Z, Maye P, **Braut A**, Bellizzi J, Mina M, Rowe DW. Histological analysis of GFP expression in murine bone. *J Histochem Cytochem.* 2005 May;53(5):593-602.
9. Bralic M, Muhvic-Urek M, Stemberga V, Golemac M, Jurkovic S, Borcic J, **Braut A**, Tomac J. Cell death and cell proliferation in mouse submandibular gland during early post-irradiation phase. *Acta Med Okayama.* 2005 Aug;59(4):153-9.

## KONGRESNA PRIOPĆENJA:

1. Šjardi A, Tamarut T, **Braut A**. Establishing the vertical dimension with composite materials and ceramic inserts in wide cavities in posterior teeth. Academy of operative dentistry ES, Munich 1999. Euro Condenser Vol.2 Issue No.1.1999.
2. Kovačević M, Tamarut T, Bešlić S, Sladović F, **Braut A**, Šjardi A, Mihelić D. Electronic Detection of the Foramen Apicale before and after Experimentally Induced Pulpitis and Apical Periodontitis. IX European Endodontics Congress, Zagreb, 1999, Abstract book (page 1).
3. Kovačević M, Tamarut T, Sladović F, Bešlić S, **Braut A**, Šjardi A, Zoričić S, Vukelić I, Tus Z. A Method for Preparation of Undecalcified Bone for Histological and Immunohistochemical Analysis of Apical Periodontitis. IX European Endodontics Congress, Zagreb, 1999, Abstract book (page 9).
4. Bešlić S, Kovačević M, Tamarut T, Sladović F, **Braut A**, Šjardi A, Vukelić I, Vičić R "Activity of the Acid-Phosphatase in Experimentally Induced Apical Periodontitis". IX European Endodontics Congress, Zagreb, 1999, Abstract book (page 8).
5. **A. Braut**, I. Kalajzic, Z. Kalajzic D.W. Rowe, E.J. Kollar, and M. Mina. "Transgenic Mice Expressing the Coll1a1-tagged Green Fluorescent Protein in Odontoblasts". TMD, Connective Tissue Research 2001; Abstract book
6. Z. Kalajzic, P. Liu, I. Kalajzic, Z. Du, **A. Braut**, E. Canalis, R, Derynck, M. Mina and D. Rowe. "Analysis of an Osteocalcin GFP Reporter Transgene in Transgenic Mice", JBMR 2001, 16, Suppl 1, S368.
7. **A. Braut**, I. Kalajzic, Z. Kalajzic, E.J. Kollar, D.W. Rowe, M. Mina. "Expression of the Coll1a1 Promoter/Green fluorescent protein transgenes during odontoblast differentiation", JBMR 2001, 16, Suppl 1, S442.
8. **A. Braut**, E.J. Kollar and M. Mina. "Differentiation potentials of dental pulp in Coll1a1GFP expressing mice". J Dent Res 2002., 81, Spec issue A 1089.
9. NI Abramson, **A. Braut**, B. Rodgers and M. Mina. "Patterns of Coll1a1GFP, DSPP and DMP-1 expression during odontogenesis". J Dent Res 2002., 81, Spec issue A 2167.
10. **A. Braut**, Z. Kalajzic, E. J. Kollar, M. Mina "Roles of extracellular matrix molecules in differentiation of odontoblast-like cells from dental pulps of pOBCol2.3GFP transgenic mice". J Dent Res 2003, A0055.
11. **A. Braut**, M. Kovacevic, T. Tamarut, S. Beslic, S. Zoricic " Histopathological findings of the apical periodontal tissue in direct correlation with the findings in the dental pulp" IFEA Sixth Endodontic World Congress, Brisbane, 2004, Abstract book.