

# Mehanizmi i oblici staničnog odgovora kod primjene regenerativnih materijala - parodontološki aspekti

---

**Kovačević, Frane**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:127:846518>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-12**



*Repository / Repozitorij:*

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





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Frane Kovačević

**MEHANIZMI I OBLICI STANIČNOG ODGOVORA  
KOD PRIMJENE REGENERATIVNIH MATERIJALA  
- PARODONTOLOŠKI ASPEKTI**

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Rad je ostvaren na Zavodu za parodontologiju Stomatološkoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Mentor rada: doc. dr. sc. Ivan Puhar, Zavod za parodontologiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Lektorica hrvatskog jezika: Ema Bakran, mag.

Lektor engleskog jezika: Tvrtko Ivanišević, prof.

Sastav Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

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

Rad sadrži: 50 stranica

1 tablica

CD

Osim ako nije drukčije navedeno, sve ilustracije (tablice, slike i dr.) u radu su izvorni doprinos autora diplomskog rada. Autor je odgovoran za pribavljanje dopuštenja za korištenje ilustracija koje nisu njegov izvorni doprinos, kao i za sve eventualne posljedice koje mogu nastati zbog nedopuštenog preuzimanja ilustracija odnosno propusta u navođenju njihovog podrijetla.

## **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem mojemu dragom mentoru doc. dr. sc. Ivanu Puharu na pomoći, podršci i strpljenju tijekom pisanja ovog diplomskog rada.

Velika hvala Mirei koja je bila uz mene i bezuvjetno pružala podršku na svakom koraku te hvala i svim mojim dragim kolegicama/kolegama i prijateljicama/prijateljima na pomoći tijekom studiranja.

Mojim roditeljima Ljiljani i Nikoli te sestri Matei posebno hvala na svemu.

## **Mehanizmi i oblici staničnog odgovora kod primjene regenerativnih materijala - parodontološki aspekti**

### **Sažetak**

Evolucijski procesi opremili su kralježnjake dvama važnim mehanizmima odgovornima za staničnu izmjenu i cijeljenje, mehanizam reparacije i mehanizam regeneracije. Posljedica fibroblastima posredovane reparacije tkiva je cijeljenje kolagenim ožiljkastim tkivom koje na staničnoj razini može uzrokovati pojavu fibroma. Regenerativni mehanizmi djeluju na molekularnoj razini u konstantnom procesu održavanja i popravka stanične i tkivne funkcionalnosti utječući na fiziologiju same stanice.

Regenerativni postupci u parodontološkoj terapiji imaju za cilj *restitutio ad integrum* svih sastavnica parodontnog kompleksa dominantno sačinjenog od parodontnog ligamenta, korijenskog cementa i alveolarne kosti. Jednostavnu ideju kompleksnog procesa regenerativne terapije možemo promotriti kao pokušaj klinički značajnog ubrzavanja tempa kojim tijelo u fiziološkim uvjetima nadomješta funkcionalne sastavnice.

Razvojem djelotvornih materijala i metoda trenutno se bavi multidisciplinarno područje tkivnog inženjeringa temeljeno na molekularnoj biologiji stanice. Cijeljenje je vremenski i prostorno osjetljiv proces baziran na međustaničnoj komunikaciji i interakciji stanica s ekstracelularnim matriksom. Stanična diferencijacija, rast i razvoj ovisni su o genskoj ekspresiji. Istraživanja upućuju na važnost odabira specifičnih stanica, bioaktivnih molekula i nosača koji imitiraju ekstracelularni matriks. Tehnološki napredak omogućio je istraživanje i razvijanje materijala s poželjnim biološkim svojstvima. Uspješnim se pokazalo korištenje proteinskih derivata i bioaktivnih molekula te se uz navedeno istražuju genska terapija i imunomodulacija, koje za cilj imaju postići željeni odgovor organizma bez posredstva lijekova.

**Ključne riječi:** parodontologija; biokompatibilnost; stanični odgovor; regenerativna parodontna terapija; tkivni inženjering

## **Mechanisms and forms of cellular response in utilization of regenerative materials - periodontal aspects**

### **Summary**

Evolutionary processes equipped the vertebrates with two important mechanisms responsible for cellular modification and healing, the repair mechanism and the regeneration mechanism. The consequence of tissue repair mediated by fibroblasts is the healing through collagen cicatricial tissue which can cause the appearance of fibroma at the cellular level. Regenerative mechanisms work at the molecular level in a constant process of maintenance and repair of cellular and tissue functionalities affecting the physiology of the cell itself.

The regenerative procedures in the periodontal therapy have the aim of *restitutio ad integrum* of all the components of the periodontal complex dominantly composed of the periodontal ligament, root cement and alveolar bone. The simple idea of a complex process of regenerative therapy can be seen as an attempt at a clinically significant acceleration of the pace at which the body in physiological conditions replaces its functional constituents.

The development of effective materials and methods is currently the domain of a multidisciplinary field of tissue engineering which is based on the molecular biology of the cell. Healing is a temporally and spatially sensitive process based on intercellular communication and cellular interaction with the extracellular matrix. Cell differentiation, growth and development are dependent on the gene expression. The research suggests the importance of selecting specific cells, bioactive molecules, and scaffolds that mimic the extracellular matrix. Technological advances have enabled research and development of materials with the desired biological properties. The use of protein derivatives and bioactive molecules has been demonstrated as successful, and together with the aforementioned gene therapy and immunomodulation is also being researched, with the aim of achieving the desired response of the body without the mediation of medications.

**Keywords:** periodontology; biocompatibility; cellular response; regenerative periodontal therapy; tissue engineering

## SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
2.	BIOKOMPATIBILNOST.....	3
3.	ČIMBENICI S UTJECAJEM NA ISHOD TERAPIJE.....	5
4.	STANIČNA I MOLEKULARNA OSNOVA CIJELJENJA I REGENERATIVNOG PROCESA PARODONTNE RANE.....	6
4.1.	Matične stanice.....	7
4.2.	Fibroblasti, osteoblasti, cementoblasti.....	8
4.3.	Signalne molekule.....	10
4.4.	Adhezijske molekule.....	11
4.5.	Ekstracelularni matriks.....	13
4.6.	Unutarstanični signalni mehanizmi i stanična komunikacija.....	14
5.	REAKCIJE ORGANIZMA NA REGENERATIVNI MATERIJALI I ISHODI LIJEČENJA.....	15
5.1.	Osnovni principi interakcije proteina s regenerativnim materijalima.....	17
5.2.	Stanična interakcija s proteinima na sučelju s regenerativnim materijalima.....	18
5.3.	Odgovor organizma na materijale dobivene tkivnim inženjeringom.....	19
5.4.	Ishodi cijeljenja parodontne rane i regeneracija.....	20
6.	IMUNOLOŠKI ASPEKTI PRIMJENE REGENERATIVNIH MATERIJALA.....	22
6.1.	Plastičnost i polarizacija makrofaga i limfocita.....	22
6.2.	Uloga dendritičkih stanica.....	22
6.3.	Reakcija na strano tijelo.....	23
6.4.	Fibrotički odgovor i posljedice fibroze.....	24
7.	STRATEGIJE REGENERATIVNE PARODONTOLOŠKE TERAPIJE.....	25
7.1.	Regenerativni postupci i materijali korišteni u kliničkoj praksi.....	26

8.	TKIVNI INŽENJERING.....	29
8.1.	Stanice.....	30
8.2.	Nosači i ekstracelularni matriks.....	32
8.3.	Signalne molekule.....	33
8.4.	Angiogeni čimbenici parodontnog cijeljenja.....	34
8.5.	Genska terapija.....	35
9.	RASPRAVA.....	36
10.	ZAKLJUČAK.....	40
11.	LITERATURA.....	42
12.	ŽIVOTOPIS.....	49



## Popis skraćenica

ADSC	adipozne matične stanice
APC	antigen prezentirajuće stanice
ASC	adultne matične stanice
BMP	morfo-genetski koštani protein
BMSC	matične stanice koštane srži
BSP	koštani sijaloprotein
CAP	cement vezujući protein
CGF	faktor rasta cementa
CSF	faktor poticanja kolonija
DAMP	molekularni obrasci oštećenja
DBM	demineralizirani koštani matriks
DC	dendritičke stanice
DFDSC	matične stanice dentalnog folikula
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DPSC	matične stanice dentalne pulpe
ECM	ekstracelularni matriks
EPO	eritropoetin
ESC	embrionalne matične stanice
ETA-1	faktor aktivacije limfocita 1
FBGC	multinuklearne orijaške stanice
FBR	reakcija stranog tijela
FGF	faktor rasta fibroblasta
HERS	Hertwigova epitelna ovojnica
IFN-g	interferon gamma
IGF	inzulinu sličan faktor rasta
KGF	faktor rasta keratinocita
MMP	matriksna metaloproteinaza
NGF	faktor rasta neurona
OCIF	faktor inhibicije osteoklastogeneze
OPG	osteoprotegerin
OPN	osteopontin

PAMP	molekularni obrasci patogena
PDGF	trombocitni faktor rasta
PDL	parodontni ligament
PDLF	fibroblasti parodontnog ligamenta
PDLSC	matične stanice izolirane iz parodontnog ligamenta
PEG	polietilen glikol
pHEMA	poli (2-hidroksietil metakrilat)
pPTFE	politetrafluoretilen
PRGF	plazma bogata čimbenicima rasta
PRR	receptor za prepoznavanje obrazaca patogena
RANK	receptor aktivator nuklearnog faktora kB
RANKL	ligand receptor aktivatora NF kB
RGD	arginin-glicin-aspartat
RNA	ribonukleinska kiselina
SCAP	matične stanice apikalne papile
SHED	matične stanice ekstrahiranih mlječnih zuba
SPP	fosfoprotein
TCP	polistiren za stanične kulture
TGF- $\beta$	transformacijski faktor rasta
TNF	faktor tumorske nekroze
TSP-1	trombospondin-1
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta

## **1. UVOD**

Cilj je parodontološke terapije povratiti potpunu anatomsku i funkcionalnu cjelovitost parodontnog ligamenta i potpornih struktura kao što su kost, cement i pripadajuća meka tkiva. Želja nam je zadovoljiti biološku i estetsku komponentu bolešću ili povredom promijenjenog tkiva. Istražuju se brojni kirurški protokoli i razvija se interdisciplinarno područje tkivnog inženjeringa zasnovano na razvojnoj biologiji i tehnikama funkcionalne restitucije izgubljenog tkiva pomoću stanica, biološki aktivnih tvari i nosača te, u posljednje vrijeme, upotrebom genske terapije i imunoterapije. Zanima nas podrijetlo i karakteristike stanica koje sudjeluju u procesu cijeljenja i regeneracije, mehanizam kojim se ti procesi odvijaju te faktori koji utječu na cjelokupan proces. Odgovor organizma započinje trenutno po implantaciji, odnosno, transplantaciji, i uključuje fiziološku reakciju organizma na povredu, borbu s infekcijom i imunološki odgovor organizma na implantirani materijal. Ishodi trenutno primjenjivanih kirurških tehnika i sredstava koje rezultiraju reparacijom i regeneracijom parodontnog tkiva nisu ni konzistentni ni predvidivi u svim slučajevima. Sastav te mehanička, kemijska i biokemijska svojstva biomaterijala, uz fizikalna svojstva i kemizam same površine, odlučujući su čimbenici ishoda terapije vezani uz materijal. Biološki materijal podrazumijeva transplantaciju, bilo da se radi o stanicama, tkivima ili organima, dok sintetski ili neki drugi neživi materijali poput aloplastičnih materijala ili ksenotransplantata podrazumijevaju da se radi o implantatima.

Cilj ovog preglednog rada je pružiti uvid u biološke procese regeneracije parodontnih struktura te opisati mehanizme djelovanja određenog broja pomoćnih sredstva i metoda koje se trenutno koriste ili su predmet istraživanja u regenerativnoj parodontološkoj terapiji s posebnim naglaskom na stanične i molekularne interakcije korištenih sredstava i organizma.

## 2. BIOKOMPATIBILNOST

Biokompatibilnost definiramo kao sposobnost primjenjenog materijala da potakne primjeren odgovor organizma na mjestu primjene (1). Definicija poput ove podrazumijeva ravnotežu između očekivane funkcije korištenog materijala u kontaktu s određenim tkivima organizma u određenom vremenskom trajanju, no ne razjašnjava mehanizme djelovanja korištenog materijala ni načine testiranja biokompatibilnosti, kao ni mjere koje valja poduzeti u svrhu napretka. Također moramo uzeti u obzir promjene koje se događaju s vremenom na razini materijala i na razini organizma te moguće posljedice tih promjena u oba smjera. Materijali mogu biti bilo prirodni bilo derivati prirodnih materijala, ili pak umjetni. Biomaterijali korišteni u regenerativnoj medicini definirani su kao prirodne ili sintetske tvari ili kombinacije tvari korištenih u svrhu reparacije ili regeneracije stanica, tkiva ili organa, isključujući lijekove (2).

Proces određivanja biokompatibilnosti uključuje nekoliko razina. Prva faza podrazumijeva prikupljanje informacija o određenom materijalu i definiranje njegovih svojstava u skladu sa strogo standardiziranim protokolima koji definiraju okolne uvjete, postupke testiranja i ostale korake u procesu dobivanja referentnih vrijednosti. Druga faza uključuje provođenje definiranih inicijalnih testova *in vitro*. Treća faza testiranja uključuje rad na životinjskim modelima. Klinički testovi na pacijentima provode se u četvrtoj, posljednjoj fazi testiranja (3). Ovisno o mikroarhitekturi, kemijski istovjetni materijali pokazuju različite ishode *in vitro* i *in vivo* testiranja. Dva implantirana materijala istoga sastava i različite mikroarhitekture uzrokuju različite bioreakcije. Cjelovita ploča umreženog poli (2-hidroksietil metakrilata-PHEMA) uzrokuje fibroznu avaskularnu izolaciju implantata nasuprot vaskularizirane tkivne integracije postignute primjenom istog polimera projektiranog s porama veličine 40 mikrona. Oba materijala smatramo biokompatibilnima. Stoga, ako biokompatibilnost promatramo kroz spektar djelovanja, tada bismo za utvrđivanje točne razine biokompatibilnosti u budućnosti morali razviti metode mjerenja i kvantificiranja M1 i M2 fenotipova makrofaga ( $M\Phi$ ) i njihova omjera, profiliranja citokina, stupnja prokrvljenosti područja na koje smo djelovali, odnosno, stupnja angiogeneze te drugih vrijednosti koje bismo mogli nazvati "biološkim parametrima"(4). U ovu svrhu predložena je formula:  $B=(A)\left(\frac{1}{C_T}\right)\left(\frac{1}{C_D}\right)(M\Phi)(M_2/M_1)(O)$ . Skalarna vrijednost biokompatibilnosti (B) u ovoj linearnoj jednadžbi jednaka je umnošku sljedećih vrijednosti: angiogeneza (A), debljina kapsule ( $C_T$ ), gustoća kolagena kapsule ( $C_D$ ), broja makrofaga ( $M\Phi$ ), omjera M2 i M1 polariziranih fenotipova makrofaga ( $M_2/M_1$ ) i ostalih tipova stanica (O) (5).

Čimbenici odgovorni za homeostazu implantiranog materijala i organizma odlika su samog materijala i specifičnosti odgovora pojedinog organizma te njihove interakcije. Biokompatibilnost

materijala osnovni je preduvjet njegove upotrebe u medicini. Njegova reaktivnost ovisi o samom porijeklu i načinu dobivanja te fizikalnim, kemijskim i biokemijskim svojstvima, kao i mjestu i načinu primjene, no nijedan nije potpuno inertan.

Organizacije poput FDA (eng. *Food and Drug Administration*), ISO (eng. *International Standardization Organization*), WHO (eng. *World Health Organization*), EU (Europska unija) i drugih intenzivno rade na evaluaciji medicinskih i dentalnih materijala. Standarde biokompatibilnosti medicinskih materijala propisuje organizacija za standardizaciju (ISO 10993 - Biološka evaluacija medicinskih uređaja, ISO 7405 - Evaluacija biokompatibilnosti medicinskih uređaja u stomatologiji, ISO 14971 - Procjena rizika) (6). *In vitro* testovi relativno su jeftini i brzo se provode. Moguće je provesti velik broj standardiziranih, reproducibilnih testova u svrhu utvrđivanja ispitivanih vrijednosti. Kontrolirani laboratorijski uvjeti izvrsni su za proučavanje ciljanih mehanizama i interakcija, međutim, upitna je relevantnost ovih testova *in vivo*. *In vivo* testovi koji potvrđuju tkivnu kompatibilnost su sljedeći: senzitivizacija, iritacija, intrakutana reaktivnost, sistemska toksičnost (akutna), subkronična toksičnost (subakutna), genotoksičnost, implantibilnost, hemokompatibilnost, kronična toksičnost, karcinogenost, reproduktivna i razvojna toksičnost, podložnost biodegradaciji i imunokompatibilnost. Pouzdanost testova prilikom istraživanja ovisi o metodama i korištenim materijalima te o načinu i veličini uzorkovanja. Potvrdu o reakciji organizma zasad najpouzdanije rutinski utvrđujemo histološkom analizom i toksikološkim testovima, testom curenja tvari (4).

Napredak regenerativne medicine zahtijeva proširivanje definicija biokompatibilnosti. Jedna od predloženih definicija opisuje biokompatibilnost kao odliku materijala da potakne lokalni odgovor organizma i sudjeluje u normalnom procesu cijeljenja, rekonstrukcije i integracije tkiva. Pojavljuje se i potreba za pojmom biotolerancije koju možemo definirati kao odliku materijala koji, bez obzira na vrijeme provedeno u organizmu, izaziva minimalan stupanj upalne reakcije ili koji je odvojen od kosti tankom fibroznom ovojnicom (4).

Bioaktivni materijali imaju sposobnost uspostavljanja kemijskih veza s tkivom. Za različite prirodne i biološki aktivne materijale, poput signalnih molekula, s obzirom na podrijetlo, funkciju i mehanizam djelovanja, predlaže se termin „biointegrirajući materijali” (2,7).

### 3. ČIMBENICI S UTJECAJEM NA ISHOD TERAPIJE

Reakcija organizma u prvom redu ovisi o zdravstvenom stanju pojedinca te o njegovoj sposobnosti poštivanja terapijskih protokola, zatim o lijekovima i o komorbiditetima koji utječu na cijeljenje. Urođeni i stečeni imunitet i specifični odgovor organizma na infekciju i upalu su obrambeni mehanizmi koje određuju genetski faktori. Štetne navike pacijenta, kao što je pušenje, također mogu interferirati s fiziološkim procesom cijeljenja. Lokalni čimbenici, poput prisustva stranog tijela ili traumi uzrokovanih neadekvatnim terapijskim postupcima ili drugom etiologijom, mogu ugroziti cijeljenje čineći organizam podložnim infekciji i neadekvatnoj vaskularizaciji, a posljedično i hipoksiji, što uzrokuje profibrotičke promjene i loš ishod terapije (8). Neadekvatna kontrola plaka i loša oralna higijena omogućuju perzistentni dotok mikroorganizama putem spojnog epitela, što za posljedicu ima infekciju i upalu. Spojni epitel s gingivnim vlaknima čini funkcionalnu jedinicu dentogingivnog kompleksa. Moramo uzeti u obzir utjecaj okluzalnih sila na parodontni kompleks tijekom terapije s obzirom na to da konstantna sila koja djeluje na parodont rezultira konstantnom pregradnjom koštanoga tkiva i remodelacijom potpornih struktura zuba. Pod smanjenim opterećenjem, parodontni ligament će atrofirati, dok smanjen opseg fiziološkog kretanja zuba, može dovesti do ankiloze korijena. Remodeliranje parodonta odvija se procesom ekstracelularne resorpcije i sekrecije ekstracelularnog matriksa. Na proces mogu utjecati i neurološki signali koje bilježe mehanoreceptori. Na terapiju također utječu sustavni faktori kao što su dijabetes, povišen indeks tjelesne mase, malnutricija te fiziološko smanjenje regenerativnog potencijala i imunološkog odgovora u starosti (4, 9). Tijek reakcije i rezolucije ovise o stupnju i brzini razgradnje korištenih regenerativnih materijala te o njihovim bioaktivnim svojstvima *in vivo*. Bioaktivni materijal uzrokuje reakciju organizma koja za posljedicu ima potporno djelovanje na sam materijal i njegovu očekivanu funkciju. Sastav (polipropilen, politetrafluoretilen, ekstracelularni matriks), mehanička svojstva (čvrstoća, tribološki faktori), fizikalna (električni potencijal), kemijska (pH vrijednost itd.), biokemijska i molekularna osobitost materijala i njegove površine neke su od osnovnih varijabli koje utječu na ishod terapije. Svi navedeni čimbenici podložni su promjenama, a s njima i interakcije. Bilo da je riječ o prirodnim bilo o sintetskim materijalima, metalu ili keramici, faktori koji utječu na ishod terapije su njihova sterilnost, antimikrobna svojstva, antigenost, imunogenost, razgradivost, njihov kemijski sastav te mikroarhitektura i dizajn konačnoga proizvoda (5, 9).

#### 4. STANIČNA I MOLEKULARNA OSNOVA CIJELJENJA I REGENERATIVNOG PROCESA PARODONTNE RANE

Regeneraciju definiramo kao proces reprodukcije ili rekonstrukcije ozlijeđenoga ili bolesnog tkiva s ciljem da se njegova arhitektura i funkcija u potpunosti vrate. Preduvjet tkivne regeneracije u terapiji odvija se uz prisustvo matičnih stanica, ekstracelularnog matriksa i odgovarajućih signalnih molekula posredstvom receptora (10). Svi navedeni čimbenici moraju biti prisutni pravovremeno i u odgovarajućoj količini. Iako su opći principi cijeljenja poznati na staničnoj i molekularnoj razini, klinički ishodi terapije nerijetko su nepredvidivi. Infekcija je glavni rizični čimbenik neuspjeha parodontne regeneracije pod uvjetom inače zdravog okruženja koje ne uključuje ostale rizične čimbenike (11).

Komponente potrebne za postizanje regenerativnog potencijala parodontnog tkiva uključuju specijalizirane stanice pod utjecajem adekvatnih signalnih puteva pri dostatnoj krvnoj opskrbi poduprte ekstracelularnim matriksom, koji osigurava potreban prostor i mehaničku potporu. Signalni putevi koji propagiraju i reguliraju ove procese zasad se uspješno proučavaju *in vitro*, no situacija s istraživanjima *in vivo* mnogo je kompleksnija i zahtijeva specifična znanja i nove metode istraživanja (12). Parodontno tkivo sačinjavaju gingiva, parodontni ligament (eng. *periodontal ligament* - PDL), cement i alveolarna kost. Stanice koje tvore ova tkiva su nediferencirane ektomezehimalne stanice, fibroblasti, osteoblasti, osteoklasti, cementoblasti, cementoklasti te ostaci Malassezeovih tjelešaca Hertwigove ovojnice (HERS), uz pripadne vaskularne i živčane elemente (13). Reakcije na podražaje ovise o embrionalnom porijeklu parodontnih tkiva (14). Povezani procesi u kojima se odvija tkivna regeneracija uključuju procese nastajanja i razgradnje vezivnoga tkiva, osteogeneze i cementogeneze. Procesom upravljaju stanice sposobne za poticanje rasta i diferencijacije, kao što su navedene matične stanice, fibroblasti, cementoblasti, prekursori osteoblasta, osteoblasti, osteoklasti, odontoblasti, te pripadne upalne stanice i signalne molekule. Uz navedeno veliku ulogu u procesu imaju vaskularni, živčani i limfni sustav (15). Sveobuhvatni popis uloga u ovom procesu iznimno je dug. Pribrojimo li k tome njihove interakcije, količina informacija postaje prevelika za jedan pregledni rad. U skladu s time, u daljnjem ću tekstu ukratko opisati neke od važnijih mehanizama regeneracije i prepoznate uloge pojedinih do sada proučavanih sastavnica ovog kompleksnog sustava.



#### 4.1. Matične stanice

Matične stanice su klonogene stanice sposobne za samoobnavljanje i diferencijaciju raznih linija stanica (16). Da bismo stanicu mogli definirati kao matičnu, ona mora zadovoljiti tri kriterija, a to su sposobnost samoobnavljanja, mogućnost stvaranja barem jedne istovjetne stanice kćeri i ostvarivanje karakteristika važnih za održavanje genetskog bazena (17). Važna karakteristika multipotentnih matičnih stanica u regenerativnoj medicini njihov je potencijal upotrebe bez imunosupresivne terapije. Embrionalne matične stanice našle su primjenu u medicini, no postoje etički problemi vezani uz njihovo korištenje (4).

Klasifikacija matičnih stanica ovisno o podrijetlu

- Embrionalne matične stanice (ESC) – totipotentne, pluripotentne  
Fetalne matične stanice – pluripotentne, multipotentne
- Adultne matične stanice (ASC) – pluripotentne, multipotentne, oligopotentne  
unipotentne

Klasifikacija matičnih stanica s obzirom na razvojni stadij

- Totipotentne matične stanice ranog su embrionalnog podrijetla.  
Između prvog i trećeg dana od oplodnje i proizvode sve stanice u tijelu, npr. stanice ranog embrija (1-3 dana).
- Pluripotentne matične stanice nalazimo u razvojnom stadiju blastociste.  
Mogu se diferencirati u bilo koji od tri zametna listića, u što se ubrajaju embrionalne i inducirane pluripotentne matične stanice te nepotpune pluripotentne matične stanice čija je moć diferencijacije ograničena, npr. neke stanice blastociste (5-14 dana).
- Multipotentne matične stanice su progenitorne stanice ograničene sposobnosti diferencijacije, no u iznimnim se okolnostima mogu diferencirati u nepovezane vrste stanica kao što to čine fetalne stanice pupčane vrpce ili adultne matične stanice.
- Oligopotentne stanice imaju sposobnost diferencijacije u svega nekoliko stanica, primjerice adultne limfoidne ili mijeloidne stanice.
- Unipotentne stanice imaju sposobnost samoobnavljanja, ali produciraju samo sebi istovjetne stanice poput mišićnih.

#### 4.2. Fibroblasti, osteoblasti, cementoblasti

Fibroblasti su dominantne stanice PDL. Mezenhimalnog su porijekla, stvaraju prekursore za sintezu ekstracelularnog matriksa. Odgovorni su za strukturalni integritet potpornih tkiva i čine stromu tkiva tvoreći ekstracelularni matriks i kolagena vlakna. Uloženi su u ekstracelularni matriks (eng. *extracellular matrix* - ECM) i dovode do ekspresije vimentina i fibroblast specifičnog proteina (eng. *fibroblast specific protein-1* - FSP1). Aktivirani fibroblasti luče medijatore odgovorne za remodelaciju potpornoga tkiva koji mogu inducirati proliferaciju signala u susjednim epitelnim stanicama. Neki od medijatora su matriksne metaloproteinaze (eng. *matrix metalloproteinases* - MMP) MMP2, MMP3 i MMP9, razni faktori rasta poput citokina (eng. *transforming growth factor  $\beta$*  - TGF $\beta$ ), inzulinu sličan faktor (eng. *insulin like growth factor* - IGF), faktor rasta živaca (eng. *nerve growth factor* - NGF) i faktor rasta keratinocita (eng. *keratinocyte growth factor* - KGF). Zabilježena heterogenost fibroblasta odnosi se na njihova fenotipska i fiziološka svojstva u različitim tkivima. Fibroblasti porijeklom iz gingive (GF) različiti su od fibroblasta parodontnog ligamenta (PDLF) te postoje dokazi imunolokalizacijskih istraživanja o podtipovima fibroblasta ovisnih o lokaciji unutar ovih skupina. Pokazuju različitost u rastu, građi, sastavu, procesu cijeljenja i karakteristikama koje iskazuju u parodontnoj bolesti i drugim procesima (18,19). Osim navedenih uloga, fibroblasti parodontnog ligamenta (PDLF) imaju brojne druge uloge poput odgovaranja na molekularne obrasce patogena (eng. *pathogen-associated molecular pattern* - PAMP) i stvaranja medijatora upale te moduliranja odgovora makrofaga na patogene u parodontnoj bolesti kao odgovor na mikroorganizme (20).

Osteoblasti su stromalne stanice podrijetlom od osteoprogenitornih stanica periosta i koštane srži odgovorne za formaciju, odlaganje i mineralizaciju koštanog tkiva. Sudjeluju u remodeliranju kosti uz osteoklaste (21), što je ključno za prilagodbu kosti na mehaničko opterećenje (22). Pojačana osteoblastična aktivnost najizraženija je za vrijeme mehaničkoga opterećenja. Osteoklasti su velike multinuklearne stanice zadužene za resorpciju kosti. Potiču od istih prekursorskih hematopoetskih matičnih stanica kao i monociti/makrofagi, limfociti i dendritičke stanice što ih čini bliže imunskim nego vezivnotkivnim stanicama (23).

Brojni faktori rasta i proteini poput obitelji koštanoga morfogenetskog proteina (eng. *bone morphogenic protein* - BMP) pokazuju sposobnost poticanja osteoprogenitornih stanica u preosteoblaste od kojih nastaju zreli osteoblasti. Najvažniji sustavi u formaciji i resorpciji kosti su sustavi receptora aktivatora nuklearnog faktora kappaB (RANK/RANKL sustav). RANKL (eng. *receptor activator of nuclear factor kappa B-ligand*) poznat i kao diferencijacijski faktor osteoklasta (eng. *osteoclast differentiation factor* - ODF) stimulira diferencijaciju osteoklasta, a luče ga osteoblasti i aktivirani T-limfociti. Sudjeluje u signalizaciji među koštanim stanicama i signalizaciji među imunocitima te povezuje

imunološki sustav s koštanim. RANKL pripada superobitelji tumorskog faktora nekroze (eng. *tumor necrosis factor* - TNF) i veže se za receptor RANK (eng. *receptor activator of nuclear factor kB*) na dendritičkim stanicama i prekursorima osteoklasta. Ključan sustav za diferencijaciju, proliferaciju, aktivaciju i preživljavanje osteoklasta je RANK sustav i njegovi ligandi *RANKL* i *osteoprotegerin* (OPG), poznat i kao inhibicijski faktor osteoklastogeneze (eng. *osteoclastogenesis inhibitory factor* - OCIF). OPG je visokospecifičan topljivi receptor za RANKL koji luče osteoblasti i dendritičke stanice. Onemogućuje vezanje RANKL-a za RANK čime koči aktivaciju i diferencijaciju osteoklasta. RANKL/OPG sustav regulira resorpciju kosti djelovanjem na osteoklastogenezu. RANK/RANKL/OPG sustav održava ravnotežu između formacije kosti uzrokovane aktivnošću osteoblasta i resorpcije uzrokovane osteoklastima (24).

Uz navedeni mehanizam još jedan važan citokin imunološkog sustava utječe na metabolizam kosti, interferon gama (IFN- $\gamma$ ) koji blokira diferencijaciju osteoklasta no može djelovati i antiresorptivno. Zasad se još ne znaju točni mehanizmi putem kojih ovaj citokin može djelovati u oba smjera (25). Luče ga aktivirani T-limfociti koji za vrijeme upale, kao što je slučaj kod parodontološke bolesti, pojačano luče IFN- $\gamma$  i RANKL (26, 27). Potrebno je dobro poznavati navedene molekule i njihove interakcije s obzirom na to da imaju ulogu u zdravlju i bolesti te nam je poznato da mijenjajući funkcije limfocita ili utječući na razinu određenih citokina možemo spriječiti resorpciju kosti u parodontnoj bolesti djelujući na ekspresiju RANKL (28).

Zreli cementoblasti imaju vitalnu ulogu u razvoju i regeneraciji parodonta, stvaranju cementa i indukciji Sharpeyjevih vlakana. Postoje dvije vrste cementa (celularni i acelularni) te dvije vrste vlakana (intrinzična i ekstrinzična). Neki od proteina prisutnih u ECM porijeklom od cementoblasta su ameloblastin i E-kadherin. U procesu cementogeneze sudjeluju koštani sijaloprotein (eng. *bone sialoprotein* - BSP), osteopontin (OPN), osteokalcin, osteonektin, fibronektin, tenascin, vitronektin, faktori rasta i enzimi. Pronađene molekule svojstvene cementu su cement-vezujući protein (eng. *cementum attachment protein* - CAP). Faktor rasta cementa (eng. *cementum growth factor* - CGF) danas poznat kao inzulinu sličan faktor rasta (eng. *insulin like growth factor* - IGF-1) ili somatomedin C. IGF-1 uz PDGF pospješuje popravak i proces formiranja kosti. Cement je vrlo sličan kosti, no nije ni vaskuliziran ni inerviran i nema struktura nalik Haversovim kanalima. Ne podliježe remodelaciji poput kosti. Određene bolesti i sindromi koji utječu na kost utječu i na cement. Neki su od njih, primjerice, hipercementoza u Pagetovoj bolesti, smanjena formacija cementa u hipopituitarizmu i defektan cement u slučaju kleidokranijalne displazije. Parodontna bolest utječe na sva potporna tkiva zuba uključujući i cement. U procesu regeneracije uz cementoblaste sudjeluju i fibroblasti PDL kojima su morfološki slični, a proizvode kolagena vlakna i odontoklasti (cementoklasti). Bitno je utvrditi jesu li cementoblasti specijalizirane stanice određenog fenotipa ili su u srži lokalno specifični osteoblasti (29-31).

### 4.3. Signalne molekule

Signalne molekule utječu na staničnu funkciju posredstvom lokalnih i sistemnih čimbenika. Dvije bitne skupine molekula (citokini) koje utječu na izmjenu staničnog fenotipa su faktori rasta i morfogeni koji uzrokuju diferencijaciju matičnih stanica kosti procesom osteoindukcije.

Pleiotropni učinci ovih stanica su: 1. mitogeno djelovanje (proliferativno), 2. kemotaksija (direktno stimuliraju migraciju stanica), 3. angiogeni učinci (stimuliraju vaskularnu formaciju) (32).

Citokini su glikoproteini male molekularne mase koji djeluju kao posrednici imunosnog sustava. Sudjeluju u upalnim reakcijama i cijeljenju. Djeluju kao medijatori i regulatori urođene i stečene imunosti te kao stimulatori hematopoeze. Dio su komunikacijskog aparata organizma uz hormone i neurotransmitere. Nisu pohranjeni, djeluju autokrino, parakrino i sistemski. Jedan citokin stimulira drugi, imaju visok afinitet za receptore i mijenjaju izražaj gena. Imaju pleiotropno, sinergističko i antagonističko djelovanje. Kemotaktični su i potiču staničnu aktivaciju, migraciju, diferencijaciju i proliferaciju. Stvaranje citokina potaknuto je antigen-specifičnom aktivacijom limfocita. U citokine se ubrajaju interleukini (IL 1-35), interferoni (IF tip 1,2,3), citokini (TNF  $\alpha$  i  $\beta$ ), morfogenetski proteini kosti (BMP), čimbenici poticanja kolonija (CSF), kemokini i drugi (TGF-  $\beta$ , LIF, MIF) (33). Aktiviraju gene djelujući preko specifičnih receptora na staničnoj membrani s posljedičnom promjenom fenotipa ili funkcije stanice. Promotori upale stimuliraju stanice PDL, fibroblaste, limfocite, monocite i makrofage na kaskadno otpuštanje citokina i kemokina (eng. *chemoattractive cytokines*) koji stvaraju citokinsku mrežu, dospijevaju u krv te stimuliraju okupljanje leukocita na mjestu upale (34).

- Citokini nespecifične imunosti su: TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12, IFN $\alpha$ , IFN  $\beta$  i drugi.

- Ostali nespecifični su: IL-10 stvaraju ga makrofazi i TH stanice, koži stvaranje IL-12 i TNF $\alpha$  te izražaj MHC II (imunosupresijski), IL-15 odgovara na virusnu infekciju i potiče proliferaciju NK stanica.

- Citokini specifične imunosti: IL-2, IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$  i drugi.

Hematopoetski citokini su G-CSF, GM-CSF. Luče ih T-stanice, makrofagi, endotelne stanice inficiranog tkiva. IL-7 stvaraju stromalne stanice koštane srži. Stimulira proliferaciju pre-T i pre-B stanica. IL-3 (multi CSF) stimulira sve progenitor stanice, a stvaraju ga pomagački T limfociti.

- Imunosupresijski citokini: TGF- $\beta$ , IL-10, IL-4, IL-13.

Luče ih T-CD4<sup>+</sup> i makrofazi, a potiskuju TH1 i makrofage (35).

Faktori rasta su molekule koje mogu utjecati na stanice lokalno i sistemski uzrokujući promjene u njezinu rastu, diferencijaciji, cijeljenju i proliferaciji. Neki od faktora rasta koji se spominju u parodontologiji su eritropoetin (EPO), stimulirajući faktori kolonija (eng. *colony stimulating factor* - CSF), trombocitni faktor rasta (eng. *platelet derived growth factor* - PDGF), transformirajući faktori rasta (TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ), vaskularni endotelni faktor rasta (eng. *vascular endothelial growth factor* - VEGF), PDL-CTX (eng. *periodontal ligament derived growth factor*), FGF, IGF, TNF- $\alpha$  BMP-2, -4, -7, -12, KGF (eng. *keratinocyte growth factor*) te interleukini, citokini i Wnt (eng. *wingless/integrated*) signalni put. Neki od klinički često primjenjivanih autolognih trombocitnih pripravaka koji sadrže faktore rasta su trombocitima bogata plazma (eng. *platelet rich plasma* - PRP), trombocitima bogat fibrin (eng. *platelet rich fibrin* - PRF) i plazma bogata čimbenicima rasta (eng. *plasma rich in growth factors* - PRGF). U svrhu iskorištavanja maksimalnog potencijala signalnih molekula *in vivo*, ugrađuju se u nosače čime se pokušava osigurati kinetika pravodobnog otpuštanja u adekvatnoj koncentraciji, što se može postići za vrijeme proizvodnog procesa samih nosača ili naknadno. Molekule ugrađene u nosač tijekom proizvodnog procesa otpuštaju se procesom difuzije koja ovisi o veličini pora i kinetici resorpcije materijala (12).

#### 4.4. Adhezijske molekule

Serumski proteini poput fibrinogena, fibronektina i vitronektina poboljšavaju adheziju stanica na površine u *in vitro* studijama. Obnašaju i funkcije migracije, rasta i diferencijacije. Stanice mogu utjecati na vlastitu adhezivnost na površine jer imaju sposobnost lučenja adhezijskih proteina kao što je fibronektin. Fibronektin je serumski glikoprotein smješten u ekstracelularnom matriksu embrionalnih i adultnih stanica, prisutan u gingivi i PDL. Posreduje adheziju, pokretljivost i propagaciju fibroblasta vezujući se za stanične receptore, pretežno integrine. Ima važnu ulogu u staničnoj adheziji, rastu i diferencijaciji. Važan je čimbenik cijeljenja gdje uz pomoć faktora XII vezuje fibrin i sudjeluje u stvaranju ugruška. Pruža prikladnu podlogu za migraciju stanica tijekom stvaranja granulacijskog tkiva te sudjeluje u remodeliranju i resintetiziranju matriksa vezivnog tkiva (36). Adhezivna svojstva vezivanja za površine duguje konformacijskim promjenama pri samom kontaktu s površinom, čime omogućuje otkrivanje kriptičnih epitopa kao mjesta vezivanja integrina. Antiadhezivni protein fibronektinom posredovane adhezije je tanescin-C. U procesu cijeljenja za vrijeme formiranja granulacijskoga tkiva fibronektin osigurava supstrat za migraciju i rast stanica (37). U parodontnoj bolesti primijećeno je razdvajanje ECM uzrokovano proteolitičkim enzimima, gingipainima koji predstavljaju glavni virulencijski faktor parodontopatogene bakterije *Porphyromonas gingivalis*. Zabilježeno djelovanje ovog proteina je destrukcija parodontnog tkiva apoptotičkim djelovanjem i razgradnjom ECM parodontnog tkiva. Točan

mehanizam djelovanja još se istražuje no dokazana je klinički značajna razgradnja tanescina-C i fibronektina u procesu koji uzrokuje apokiozu i posljedično gubitak stanica PDL u parodontnoj bolesti (38). Laminin je glikoprotein ekstracelularnog matriksa. Čini aktivni dio bazalne lamine utječući na staničnu diferencijaciju, adheziju i migraciju. Nalazimo ga u velikom broju tkiva.

Osteopontin (OPN) poznat je i kao koštani sijaloprotein I (BSP-1 ili BNSP), rani aktivator T-limfocita (ETA-1) i fosfoprotein 1 (SPP-1). Pronalazimo ga u kosti i drugim tkivima. Ima biološku ulogu u biomineralizaciji, remodeliranju kosti i zadaćama imunskog sustava. Uz BSP obavlja funkciju remodelacije kosti i očuvanja parodontnog ligamenta. Kolagen parodontnog ligamenta uglavnom čini kolagena vlakna tipa I, zatim tip III i tip V. Mikrofibrilarni kolagen tipa IV nalazimo u bazalnoj membrani na koju se vezuju fibrili kolagena tipa VII. Vrijeme potpune zamjene starog kolagena novim manje je nego kod bilo kojeg drugog tkiva. Dva je puta brže nego u gingivi i do petnaest puta brže nego u koži. Cement u većem dijelu sadrži kolagen tip I i tip III kao i alveolarna kost (36-38).

Sintetske materijale možemo konstruirati tako da budu u interakciji sa stanicama kao prirodni ECM. Jedan od načina kako omogućiti mjesta vezivanja integrina za nosač je dodavanjem probranih proteina matriksa. Najpoznatiji mali receptor u tu svrhu je integrin vezujući arginin-glicin-aspartat (RGD) sekvenca koju nalazimo u gotovo svim proteinima matriksa. Primjerice, specifični  $\alpha 5\beta 1$  integrinski receptor, među ostalima, zahtjeva i RGD za vezivanje stanica s fibronektinom. Trećina integrina vezuje RGD što generira silu dovoljnu za pokretanje stanica i samim time pojavu staničnog signala (38, 39). Stanice koje se odvoje od ECM podliježu apokiozi, staničnoj smrti uzrokovanoj odvajanjem stanica od ECM. Projektiranjem nosača na ovaj i druge načine možemo pomoći preživljavanje stanica (39,40).

#### 4.5 Ekstracelularni matriks

Ekstracelularni matriks struktura je nalik gelu koja obično sadrži proteine specifične za pojedino tkivo, osigurava strukturalni integritet tkiva te služi kao stanični i molekularni nosač u terapiji. ECM parodonta sačinjavaju glikozaminoglikani poput hijaluronske kiseline i cijela paleta različitih faktora rasta koji mu jamče bioaktivnost. Glikoproteini poput fibronektina, osteonektina, tanescina i laminina. Proteoglikani kao što su dekorin, versikan, biglikan te u posljednje vrijeme i kod nas proučavani sindekani. Ekstracelularni matriks sadrži informacije potrebne za regulaciju staničnog rasta, razvoja, diferencijacije, cijeljenja tkiva, homeostaze ali i patofizioloških procesa (32). Osnovne sastavnice su uvijek prisutne u većoj ili manjoj mjeri, no razlike su ipak tkivno-specifične, što čini tkiva različitih fizikalnih i biokemijskih osobina. U kasnom stadiju embrionalnog razvoja, u vrijeme morfogeneze, procesi formiranja tkiva i organa staničnom migracijom i preraspodjelom ovise o međustaničnoj interakciji koliko i o interakciji stanica s matriksom. Ortopedski kirurg Marshal R. Urist primijetio je da demineralizirani koštani matriks (eng. *demineralized bone matrix* - DBM), koštano tkivo pročišćeno od stanica i minerala sastavljeno samo od ekstracelularnog matriksa, potiče formaciju kosti na transplantiranom mjestu (41). Uslijedilo je otkriće morfogenetskog proteina kosti (BMP), faktora rasta s mnogobrojnim fiziološkim ulogama u formaciji kosti i hrskavice.

Proteoglikani su velika skupina molekula koje čine ECM i u njemu imaju brojne uloge. Zaduženi su za tkivnu otpornost i filtriranje. Određeni proteoglikani vezuju se s ostalim molekulama ECM i faktorima rasta, dok drugi imaju funkciju receptora matriksa na staničnoj površini. Otkriveno je i nekoliko tipova kolagena čija su uloga, osim strukturalnog integriteta, ovisno o specifičnim sekvencama koje posjeduju, fleksibilnost i sposobnost interakcije s ostalim molekulama i stanicama matriksa. Adhezivni glikoproteini ubrajaju se u porodicu fibronektina i laminina od kojih pojedini izomorfni oblici kontroliraju migraciju, prijanjanje i proizvodnu aktivnost stanice (4, 32, 37).

Integrini su velika skupina receptora o čijoj aktivnosti ovisi međustanična komunikacija te komunikacija stanica s ECM. Predstavljaju jedan od načina sidrenja stanica za ekstracelularni matriks. Dio su receptorskog kompleksa između ECM i aktinskog citoskeleta. Dostupni su brojni radovi koji detaljno opisuju njihove biološke aspekte. Ligandi integrina su fibronektin, laminin, fibrinogen i drugi. Informacije iz ekstracelularnog prostora putem citoplazmatskih domena dopijevaju u citoskelet stanice što rezultira sintezom proteina. Ekspresiju samih integrina kontroliraju ECM i faktori rasta, posebice TGF $\beta$  (4, 32, 37).

#### 4.6. Unutarstanični signalni mehanizmi i stanična komunikacija

Faktori rasta, citokini i ostali kemijski medijatori ispoljavaju svoju zadaću posredstvom receptora. Ovisno o strukturi receptora, signalne puteve možemo podijeliti u dvije skupine. Prvu skupinu čine receptori koji vezuju monomerne ligande: jukstakrini Notch te parakrini Wnt i Hedgehog putevi. Druga skupina uključuje parakrine receptore koji vezuju dimere: receptori tirozin kinaze (RTK), JAK/STAT i TGF $\beta$  (42). Uz navedene puteve postoje, dakako, i drugi. Signal najčešće reagira s receptorom na površini stanice. Informacija vezanog liganda na receptor prevodi se u drugi kemijski oblik, a informacija prenesena kemijskim spojevima prevodi se u fiziološki odgovor (transdukcija signala). Prije nego što dođe do transdukcije signala u fiziološki odgovor, signal se u većini slučajeva amplificira. Svaki korak procesa signalizacije regulira se povratnom spregom. Preživljavanje stanica ovisi o međustaničnoj komunikaciji i prilagodbi na okolne uvjete detekcijom signala iz neposredne blizine ili udaljenih dijelova organizma. Jedan od oblika stanične komunikacije s kojim smo upoznati u parodontologiji je i tzv. *quorum sensing* koji bakterijama omogućava koordinaciju i razmjenu informacija unutar biofilma. Receptori su proteinske molekule obično smještene na staničnoj površini. Omogućuju staničnu i izvanstaničnu komunikaciju posredstvom signala iz neposredne blizine i udaljenih dijelova organizma. Kontroliraju membranske kanale te reguliraju stanično vezivanje, rast, diferencijaciju i smrt. Čine to vezanjem za ligande. Ligandi, često peptidi, mogu biti i ostale male molekule poput hormona, lijekova, neurotransmitera toksina ili dijelova bakterija i virusa. Vezivanjem liganda za receptor aktivira se ili inhibira specifični biokemijski odgovor. Uz spomenute integrinske receptore, detaljno se istražuju i neintegrinski receptori poput receptora laminina, sindekana, glikoproteina i drugih. Receptori poput Fc receptora, citokinskih receptora ili receptora faktora rasta, pokreću mehanizam staničnog odgovora u suglasju s imunološkim sustavom. Matične stanice, T- i B- stanice, NK stanice kao i monociti također sadrže receptore. Receptori faktora rasta su Wnt, Tie, ephrin (Eph), PDGF, receptor za vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF), neurotrofinski receptori, receptori fibroblasta, receptori inzulinu sličnog faktora rasta (IGF) i drugi. Svaki citokin ima odgovarajući receptor na staničnoj površini koji mijenja stanični ciklus i funkciju stanice, uzrokujući promjene transkripcijskih faktora i genske ekspresije. Poznajemo pet tipova citokinskih receptora: 1. porodica hematopoetina, 2. interferonska porodica, 3. porodica receptora za TNF, 4. porodica s receptorom sličnim globulinima, 5. kemokinski receptori. Stanica luči medijatore kao i same citokine izmjenjujući broj receptora za druge molekule na samoj površini, ili pak uzrokuje supresiju vlastite aktivnosti povratnom inhibicijom (4, 32, 36, 43, 44).



## 5. REAKCIJE ORGANIZMA NA REGENERATIVNI MATERIJAL I ISHODI LIJEČENJA

Oralno tkivo slijedi proces cijeljenja vrlo sličan epitelnome cijeljenju. Razlike u samome procesu nisu dovoljno istražene i postoji potreba za njihovom klasifikacijom u oralnom segmentu. Upalna faza započinje 4-6 dana nakon ozljede. Do migracije epitelnih stanica dolazi u prva 24 sata. Proliferacijska faza nastupa 4-14 dana nakon ozljede i uključuje epitelizaciju, angiogenezu, formaciju granulacijskog tkiva i odlaganje kolagena. Granulacijsko tkivo podrijetlom od PDL ili tkiva prekrivenog keratiniziranim epitelom ima potencijal indukcije keratinizacije no duboko tkivo nepca nema isti potencijal za razliku od tkiva neposredno prekrivenog epitelom. Maturacijska faza i remodelacija započinje u prosjeku 8 dana nakon povrede. Postoperativno epitelno cijeljenje parodontne rane završava nakon 7-14 dana. Strukturalni integritet tkiva između denudiranog korijena i tkiva dostiže maturacijsku fazu u prosjeku 14 dana nakon operacije. Formacija biološke širine i oko transmukoznog implantata zahtjeva 6-8 tjedana cijeljenja. Periimplantatno meko tkivo nalikuje ožiljkastom tkivu s obzirom na orijentaciju vlakana i prisutne vaskulature. Periimplantatni spojni epitel može biti duži ako je sama implantacija bila provedena postekstrakcijski, za razliku od implantacije na postekstrakcijski oporavljeno područje. Cijeljenje nakon neregenerativne parodontološke terapije rezultira parodontnom reparacijom odnosno formacijom dugog spojnog epitela, bez stvaranja cementa s pripadajućim insercijama kolagenih vlakana i vezivnog tkiva (8). Dostupni su radovi koji detaljno obrađuju postoperativno cijeljenje parodontne rane nakon primjene različitih kirurških i nekirurških postupaka (45).

Odgovor organizma na jatrogenu povredu tkiva započinje u procesu zahvata i nastavlja se reakcijom na materijal. Materijal dolazi u kontakt s krvi, izvanstaničnom tekućinom i proteinima plazme. Kao rezultat Vromanovog efekta, stanice organizma reagiraju s površinom materijala posredstvom proteina. Pojavu možemo okarakterizirati kao dinamičan proces kompetitivne izmjene proteina čiji redoslijed vezanja je predeterminiran i čijom agregacijom nastaje višeslojna proteinska tvorba na površini materijala. Adsorpcija proteina na površinu materijala započinje unutar prve sekunde kontakta. Proteini adheriraju na površinu slijedom od manjih prema većima, albumini, globulini, fibrinogen, fibronektin, kininogen (HMWK ili HK) i faktor XII (2). Formiranje slojeva odvija se unutar prvih deset sekundi, nakon čega proteini denaturiraju te već unutar trideset sekundi dolazi do pričvršćivanja stanica i stimuliranja okolnog tkiva. Novonastali proteinski sloj tijekom hemostaze i stvaranja krvnog ugruška sudjeluje u stvaranju privremenog ekstracelularnog matriksa koji moderira interakciju tkiva s materijalom. Nekoliko minuta nakon implantacije najbrojnije su stanice neutrofilni čiji odgovor dostiže vrhunac od 48 do 72 sata nakon implantacije i predstavlja urođeni imunološki odgovor organizma. Osim privlačenja i aktivacije ostatka imunskog odgovora neutrofilni iniciraju formaciju granulacijskog tkiva i u slučaju razgradivih

biomaterijala, luče enzime kao što su kolagenaza ili serinska proteaza, koji pokreću njihovu biodegradaciju i remodelaciju tkiva. Neutrofile zamjenjuju monociti koji se diferenciraju u makrofage. Tip i opseg reakcije ovisi o vrsti upotrijebljenoga materijala i stanju organizma (46, 85).

Resorbirajući materijali (neumreženi biološki nosači, poliglaktin itd.) bivaju infiltrirani stanicama zahvaljujući poticaju privremenog matriksa, dok kod neresorbirajućih materijala (polipropilen, titan itd.) stanice adheriraju na novonastali proteinski sloj i koriste ga kao sučelje za izmjenu informacija s materijalom (47). Resorptivni materijali smješteni u zdravo i dobro prokrvljeno područje razgrađuju se u roku od nekoliko tjedana (48) te potiču odgovor M2 fenotipa makrofaga odgovornih za remodelaciju i funkcionalno obnavljanje tkiva. Neki tipovi sintetskih materijala potiču upalni odgovor organizma potaknut M1 fenotipom makrofaga, što rezultira reakcijom stranog tijela, kroničnom upalom i stvaranjem ožiljkastog tkiva. Neresorptivni materijali obično dovode do reakcije stranog tijela (eng. *foreign body reaction* - FBR) procesom „frustrirane fagocitoze” i otpuštanja citokina promoviraju upalu, formiranje seroma i u konačnici enkapsulaciju fibroznom ovojnicom (4).

Fibrozna ovojnica utječe na difuziju molekula te uz smanjenu prokrvljenost otežava odgovor organizma na infekciju. U posljednje vrijeme prepoznaje se potencijal ekstracelularnog matriksa i drugih materijala koji mogu imati za ishod cijeljenje bez fibroznog ožiljka uz vaskularizaciju. Riječ je o materijalima čija površina sadrži projektirane biomimetičke receptore i odlikuje se protuobraštajnim odnosno antiadhezivnim karakteristikama (eng. *nonfouling materials*). Poroznost je predodređena proizvodnim procesom i projektirana sa specifičnom namjenom (49).

## 5.1. Osnovni principi interakcije proteina s regenerativnim materijalima

Čimbenici koji utječu na interakciju proteinskih molekula s biomaterijalima su mnogobrojni i kompleksni. Uključuju kemijski sastav i svojstva proteina kao što su veličina, koeficijent difuzije i afinitet vezivanja za površinu. Osobitosti biomaterijala također su brojne i uključuju topografiju, naboj i močivost površine. Mehanizmi interakcije s materijalom, premda različiti s obzirom na tkivo i materijal, zasnivaju se na nekim zajedničkim principima. Adsorpcija se primarno zasniva na nekovalentnim vezama između proteina i biomaterijala, redistribuciji naboja i konformacijskim promjenama proteina, što vidimo na primjeru afiniteta fibrinogena i trombocita, hidrofobnosti, sastavu i topografiji materijala (4, 49).

Termodinamiku vezivanja proteina za različite hidrofobne i hidrofilne površine detaljno opisuju Wilson i suradnici (48). Vezivanjem molekula smanjuje se kemijska energija, a s termodinamičke točke gledišta svi materijali teže niskoenergetskom stanju. Vezivanjem proteina na površinu smanjuje se njegova površinska napetost. Jedan od načina ispitivanja podložnosti površine na adsorpciju proteinima jest mjerenje razlike u energiji površine prije i nakon vezivanja proteina. Promjena slobodne energije u procesu proteinske adsorpcije ( $\Delta G_{ads}$ ) izražena je formulom:  $\Delta G_{ads} = \gamma_{SP} + \gamma_{WW} - (\gamma_{SW} + \gamma_{PW})$ . Energiju površinske napetosti na spoju dvaju sustava u jednadžbi predstavljaju vrijednosti: površina - proteini ( $\gamma_{SP}$ ), voda - voda ( $\gamma_{WW}$ ) površina - voda ( $\gamma_{SW}$ ), proteini - voda ( $\gamma_{PW}$ ), pod uvjetom da je  $\gamma_{WW}$  jednaka nuli. Da bi smanjili adsorpciju proteina na površinu materijala, poželjno je da vrijednost  $\Delta G_{ads}$  bude čim veća (49). Smatra se da je, u odnosu na hidrofobnu površinu, hidrofilna površina pogodnija za adheziju stanica i njihovu aktivnost. Dobar hidrofilni antiadherirajući materijal poput polietilen glikola (PEG) pokazuje dovoljno nisku količinu slobodne energije na spoju s vodom što znači nisku  $\gamma_{SW}$  vrijednost. Međutim, zbog interakcije naboja i konformacijskih promjena proteina adsorpcija je moguća i na hidrofobnim površinama gdje ulogu imaju energetske promjene koje zadovoljavaju uvjete za adheziju. Interakciju ovih naboja i elektrostatsku pozadinu adsorpcije dodatno kompliciraju različite izoelektrične točke proteina, pH okoline, interakcija s ionima te jake vodikove veze koje formiraju molekule vode. Mijenjanjem naboja površine primijetila se promjena u omjeru fibronektina naspram vitronektina te posljedično afinitet vitronektina za pozitivno i fibronektina za negativno nabijenu površinu. Kemizam, hidrofilnost i naboj imaju značajniju ulogu u adsorpciji proteina od topografije površine materijala (51).

## 5.2. Stanična interakcija s proteinima na sučelju s regenerativnim materijalima

Neposredno nakon implantacije, materijal biva prekriven proteinima iz krvi i intersticijskih tekućina. Svojstva materijala kao što su kemizam i topografija površine također utječu na stanični odgovor. Posredstvom tih proteina stanice stupaju u kontakt s regenerativnim materijalima i mogu prepoznati strane površine. Brzina adhezije proteina na materijale veća je od brzine migracije stanica. Adhezija stanica na površinu i njihov odgovor na novi okoliš više ovisi o proteinima nego o svojstvima materijala. Proteini čine strano tijelo biološki prepoznatljivim stanicama čiji odgovor na sam materijal zatim pretvaraju u biološke signale. Poznavanje ovog mehanizma omogućuje manipulaciju staničnog odgovora (4).

Tri glavne faze stanične interakcije s materijalom su: stanična adhezija, promjene stanične morfologije i motiliteta te moduliranje stanične funkcije. Važnost međudnosa stanica s proteinima očituje se sistemskim odgovorom organizma i reakcijom stranog tijela. Multiproteinski oligomerni sustav (inflammosom-citokini, interleukini, kaspaze itd.) nastaje kao odgovor na stanični stres pa mu je i sastav ovisan o podražaju, a odgovoran je za aktivaciju upalnog odgovora. Ima sposobnost utjecaja na faze akutne i kronične upale nastale na spoju tkiva s materijalom. Stanice primarno vežu proteine, točnije, kratke sljedove peptida (ligandi) posredstvom receptora u staničnoj membrani (integrini). Odvoje li se od ECM stanice podliježu apoptozi, staničnoj smrti uzrokovanoj odvajanjem od ECM. Sekvenca Arg-Gly-Asp (RGD) prisutna u fibronektinu, lamininu, vitronektinu i kolagenu koristi se za facilitaciju stanične adhezije posredstvom višestrukih integrina (37). Pored nje, istražuju se i sinergističke peptidne domene *Pro-His-Ser-Arg-Asn* (PHSRN) te heparin-vezujuća sekvenca PRRARV u studijama fibronektinom posredovane adhezije makrofaga i formacije FBGC (39). Stanice u *in vitro* kulturama gdje se najčešće koristi polistiren (eng. *tissue culture* polystyrene - TCP) vezuju se za podlogu posredstvom fibronektina i vitronektina. Ove i druge polimere istražuje znanost o polimernim biomaterijalima (40). Integrini sudjeluju u unutarstaničnim signalnim putevima, stoga obnašaju različite funkcije u tijelu kao što je organizacija citoskeleta, migracija, apoptoza, diferencijacija i stanična proliferacija. Stanice su vrlo adaptibilne i posjeduju sposobnost lučenja proteina kao što je fibronektin, čime utječu na vlastitu adhezivnu sposobnost prije i nakon vezivanja za površinu. Aktivacijom višestrukih signalnih puteva stanice prolaze kroz procese poput remodelacije citoskeleta što u slučaju endotelnih stanica uključuje aktivaciju puta beta transformirajućeg faktora rasta (TGF- $\beta$ ) i posljedično aktivaciju proteina trombospondina-1 (TSP-1). Dokazano je da u svrhu vezivanja stanice mogu upravljati s određenim brojem integrinskih receptora s obzirom na dostupne ligande na površini biomaterijala. Pokazne studije specifičnih proteina u gore navedenim interakcijama još se moraju potvrditi *in vivo* testiranjima. Neutrofili i endotelne stanice imaju veliku ulogu u tom procesu, no trojstvo odgovorno za FBR i posljedičnu fibrozu implantiranog sadržaja čine fibroblasti, makrofazi i trombociti (49).

### 5.3. Odgovor organizma na materijale dobivene tkivnim inženjeringom

Normalan proces cijeljenja odvija se u tri faze: hemostaza i cijeljenje, proliferacija i granulacija te remodeliranje tkiva koje vodi rezoluciji. Mnogobrojni faktori tijekom terapije mogu poremetiti ovaj osjetljiv proces. Izraženo postoperativno krvarenje usporava cijeljenje utječući na formiranje granulacijskog tkiva. Pretjerana toplina može dovesti do koštane nekroze. Ishemija i hipoksija dovode do smanjene deplecije stanica, infekcije i profibrotičkih promjena. Popis uzroka i njihovih manifestacija je iznimno dug i bitan (8). Prirodno dobiveni materijali načinjeni su od komponenti ekstracelularnog matriksa, stoga ne izazivaju imunološki odgovor pacijenta ako su decelulizirani. Biokompatibilnost prirodnih materijala je na neki način poboljšana, dok je kod sintetskih ovisna o korištenom materijalu i odgovoru organizma. Bitno je naglasiti važnost biološke razgradnje, odnosno, biodegradaciju prirodnih materijala i dobivenih produkata te reakcije zbog koje su svi ovi materijali inherentno bioaktivni. Prirodni materijali zadržavaju željenu arhitekturu te imaju poboljšana bioaktivna svojstva. Mikroarhitektura sintetskih materijala nije istovjetna biološkim no tome teže. Bioaktivnost ovisi o vrsti materijala no imamo bolju kontrolu nad biokemijskim komponentama kao i karakteristikama poroznosti i biodegradacije. Bez obzira na manju sposobnost kontrole prirodnih materijala oni pokazuju značajniju sposobnost revaskularizacije ciljanog područja zbog zadržanog mikrovaskulalnog crteža. Prednost sintetskih materijala trenutno je dostupnost i brza proizvodnja te činjenica da su manje skloni kontaminaciji i uzrokovanju infekcije. Odgovor organizma na prirodne materijale ovisi o izvoru materijala i metodama obrade te sastavu i prisutnosti liganada što nam govori u prilog tkivne specifičnosti. Antigenost i imunogenost dva su najčešća aspekta imunološkoga odgovora na biomaterijale. Svi imunogeni materijali su ujedno i antigeni no suprotno ne vrijedi. Prema tome postoje i materijali koji jesu antigeni ali nisu imunogeni i nazivamo ih haptanima. Najčešće su to metalni ioni. Najbolje proučavani su nikel i berilij koji uzrokuju kontaktni dermatitis. Vežu MHC-II komplekse za specifične  $\alpha\beta$  T-stanične receptore. Istražuju se i takozvane kvantne nanočestice (eng. *quantum dots*) koje sadrže metalnu jezgru. Posredstvom kvantnih nanočestica kadmija, cinka ili zlata možemo modulirati imunološki odgovor. Čestice mogu izmaknuti imunološkom prepoznavanju, mogu ga inhibirati ili pojačati (52, 53, 80). Izbjegavanje upalnog odgovora organizma također se postiže projektiranjem spomenutih antiadsorpcijskih biomaterijala i samoorganizirajućih mono slojeva (SAM). Preveniranje proteinske adhezije zahvalniji je proces od degradiranja već vezanih proteina (49). Antigenost možemo opisati kao sposobnost neke tvari odnosno antigena da na neki način stupa u kontakt s T- ili B-staničnim receptorima. Dio antigena koji stupa u kontakt s B-staničnim receptorom naziva se epitop ili antitijelo ili imunoglobulin, takozvana antigena determinanta. Proteinski antigeni, također epitopi, prvo se vezuju za glavni sustav kompleksa tkivne podudarnosti (eng. *major histocompatibility complex* - MHC), a potom ih T-stanični receptori prepoznaju

pomoću određenih sljedova aminokiselina, epitopa. Imunosni sustav prvo aktivira urođeni, a potom stečeni imunološki odgovor reakcijom na imunogene, tvari koje provociraju reakciju. Urođeni imunološki odgovor kod odbacivanja transplantata aktiviraju različiti faktori koji su vezani uz upalu ili upalu potiču (DAMP) ili koji su izlučeni tijekom mehaničkih ili ishemijskih ozljeda (54). Inflamosom, multiproteinski kompleks, regulirajući ekspresiju miRNA (eng. *micro ribonucleic acid* - miRNA) potiče lučenje medijatora koji potom reguliraju citokine i interferone tipa 1 (IFN-1). Kod stečenog imunološkog odgovora u reakciji odbacivanja transplantata stanični odgovor posredovan T-stanicama, detektira nenormalne MHC dok humoralni odgovor B- stanica i protutijela prepoznaje tvari u krvnom i limfnom cirkulacijskom sustavu. Prirodni materijali iako biokompatibilni mogu biti i imunogeni. Gotovo se 60% prirodnih materijala razgradi u prva četiri tjedna, dok za ostatak treba u prosjeku još tri mjeseca. Adaptivni odgovor organizma na biomaterijale posredovan je u prvom redu makrofazima, a potom i limfocitima. Molekule uključene u proces su dakako citokini, interleukini, TNF $\alpha$ , CCR, CD i mnoge druge. Poznavanjem mehanizama djelovanja makrofaga, limfocita te njihovih posrednika ulazimo u područje posredne prilagodbe odgovora organizma putem materijala. Izbjegavamo upotrebu imunosupresivnih lijekova jer riskiramo infekciju, toksične sistemske nuspojave, a postoji i opasnost od stvaranja nepoćudnih tvorbi. Moduliranje imunološkog odgovora bez imunosupresivnih lijekova trenutno istražuju dva pristupa: redukcija antigenog i imunogenog djelovanja tkiva donora i moduliranje imunološkog sustava (4).

#### **5.4. Ishodi cijeljenja parodontne rane i regeneracija**

Cijeljenje parodontne rane odvija se u specifičnom otvorenom sustavu koji je izložen infekciji zbog neprekidnog prisustva bakterija. Regeneracija uključuje površinu korijena, parodontni ligament, cement, epitelno, gingivno i koštano tkivo te pripadajuće vaskularno tkivo, živčano tkivo i limfni sustav s kojima mora povratiti funkcionalnu svezu, *restitutio ad integrum*. Proces se odvija pod stalnim opterećenjem okluzalnih sila koje negativno utječu na željeni ishod. Ovisno o uvjetima i stupnju zahvaćenosti tkiva parodontnom bolešću, proces cijeljenja prirodnim putem često završava reparacijom ili ožiljkastim tkivom (55).

Povredom tkiva dolazi do krvarenja i stvaranja ugruška koji štiti izloženo tkivo i služi kao privremeni matriks sačinjen od proteina plazme. Cijeljenje teče u tri faze. Upalna faza započinje uputama faktora rasta prisutnih u privremenom matriksu, procesom čišćenja rane koju izvršavaju neutrofilni, a potom monociti. Prva tri dana upalne stanice procesom fagocitoze odstranjuju uzročnike upale. Granulacijska faza upale započinje približno četvrtog dana, dekontaminacijom upalnog područja makrofazima koji luče bioaktivne molekule i potiču stvaranje granulacijskog tkiva. Stanice adheriraju međusobno i na tkivo.

Sedmoga dana nastavlja se granulacija tkiva i započinje cijeljenje formiranjem prvih vlakana kolagena što uzrokuje kontrakciju tkiva. Proces granulacije nastavlja se do posljednje faze, maturacije. Faza sazrijevanja odlikuje se stvaranjem matriksa, koji je bogat kolagenim vlaknima, za što su zaslužni fibroblasti koji izmjenom funkcije postaju miofibroblasti i luče alfa aktin glatkog mišićja. Endotelne stanice potiču angiogenezu. Regeneracija ili reparacija ozlijeđenoga tkiva ovisi o dostupnosti potrebnih tipova stanica i faktora koji utječu na cijeljenje. Dugi spojni epitel pojavljuje se vrlo brzo nakon instrumentacije površine korijena u procesu reparacije. Formiraju ga keratinociti koji migriraju iz područja sulkusa na mjesto cijeljenja, stoga je najbitnije spriječiti proliferaciju stanica gingive kako bi se omogućilo cijeljenje kosti. Cijeljenje koštanim tkivom odvija se bez pojave cementa, parodontnog ligamenta i ekstrinzičnih vlakana te je moguća ankiloza korijena. Regeneracija parodontnog tkiva sa svim pripadajućim tvorbama sastoji se od funkcionalne restitucije uglavnom celularnog cementa korijena, Sharpeyjevih i oksitalanskih vlakana parodontnog ligamenta, koštanoga tkiva i gingive (9).

Zbog lakšeg odabira postupaka i materijala spomenutih u ovom tekstu, imena materijala koji se koriste za rekonstrukciju alveolarne kosti i regeneraciju parodontnog tkiva nalaze se u tablici regenerativnih materijala (tablica 1.).

Tablica 1. Regenerativni materijali

<b>Rekonstrukcija alveolarne kosti</b>	<b>Regeneracija parodontnog tkiva</b>
1. Autologni koštani transplantati	1. Neresorptivne okluzalne membrane
Intraoralni transplantat	Politetrafluoretilen (ePTFE)
2. Alogeni koštani transplantat	2. Resorptivne okluzalne membrane
Zamrznuta spužvasta ilijačna kost	Atrisorb/Atrigel
Dekalcificirani suho smrznuti	Poliglikolna kiselina /polilaktična kiselina
transplantat kosti (DFDBA)	3. Faktori rasta i regeneracija
3. Ksenogeni koštani transplantat	Derivati caklinskog matriksa (EMD)
Mineralni goveđi matriks	Faktor rasta trombocita (PDGF)
Koraljni skelet	Morfofenetski koštani proteini (BMP)
4. Aloplastični materijali	Faktor rasta fibroblasta-2 (FGF-2)
Hidroksiapatit	Plazma bogata trombocitima (PRP)
$\beta$ -Trikalcij fosfat	Plazma bogata čimbenicima rasta (PRGF)
Bioaktivno staklo	4. Stanična terapija
Polimeri	Autologne matične stanice
5. Polimeri i kolagene spužve	5. Genska terapija
Kolagen	

## **6. IMUNOLOŠKI ASPEKTI PRIMJENE REGENERATIVNIH MATERIJALA**

### **6.1. Plastičnost i polarizacija makrofaga i limfocita**

Makrofazi spadaju u stanične komponente urođene imunosti. Osim imunološkog djelovanja sudjeluju u metaboličkim funkcijama i remodelaciji tkiva. Plastičnost makrofaga očituje se promjenjivim fenotipom stanica mononuklearnog fagocitnog sustava u suglasju s podražajima iz okoliša. Podražaji koji dovode do promjene su produkti mikroba, limfocita ili raspadnih produkata stanice. Pod utjecajem specifičnih receptora, liganda ili interleukina polariziraju se klasični M1 makrofazi vezani uz upalne procese ili alternativni M2 makrofazi koji više doprinose u procesu cijeljenja pomažući angiogenezu, remodelaciju tkiva, supresiju Th1 adaptivne imunosti i druge procese. Slično makrofazima moguće je postići polarizaciju T-limfocita od kojih se Th-1 fenotip vezuje uz dobre ishode implantacije za razliku od Th-2 fenotipa koji povezujemo s klasičnim odbacivanjem transplantata. Relevantna spoznaja vezana uz plastičnost makrofaga je mogućnost reprogramiranja makrofaga pomoću eksternih signala što za posljedicu može imati smanjivanje broja imunosupresivnih M2 u korist M1 imunostimulativnih makrofaga te tako imamo mogućnost modulirati imunološki odgovor za potrebe terapije. Pred nama je zadatak razvijanja načina manipulacije makrofaga u svrhu izbjegavanja štetnog nekontroliranog upalnog učinka makrofaga i promoviranja funkcionalne obnove tkiva (4).

### **6.2. Uloga dendritičkih stanica**

Makrofazi i dendritičke stanice uz ostale stanice imunološkog sustava postoperativno naseljavaju mjesto implantacije. Dendritičke stanice (eng. *dendritic cell* - DC) imaju jedinstvenu sposobnost stimuliranja T- i B-stanica *in vitro* i *in vivo* zbog čega ih se naziva antigen-prezentirajućim stanicama (eng. *antigen-presenting cell* - APC). Prepoznata uloga DC stanica je supresija kroničnih proinflammatory reakcija na implantate i aktivacija proinflammatory T i B stanica imunološkog sustava. U prisutnosti biomaterijala kao antigena, tumačenjem kemijskih signala površine materijala nastaju zrele dendritičke stanice (mDC). Topografija stanične površine i tekstura te adsorbirani proteini na površini biomaterijala uzrokuju formiranje tolerogenih dendritičkih stanica (tDC). Uloga DC stanica u procesu reakcije na strano tijelo još se istražuje. Mehanizam kojim prepoznaju biomaterijal još je pod istragom no jedna od hipoteza jest da biomaterijali aktiviraju receptore i signalne puteve bitne za prepoznavanje patogena (eng. *pattern recognition receptor* - PRR) (4).



### 6.3. Reakcija na strano tijelo

Stomatološki zahvati često zahtijevaju upotrebu materijala koje neovisno o sastavu, iz perspektive organizma možemo smatrati stranim tijelom (lat. *corpus alienum*). Djelići gutaperke, granule hidroksiapatita, amalgamske tetovaže, pa i krhotine zuba, mogu dovesti do smetnji u cijeljenju i latentne infekcije (8). Reakcija stranog tijela (eng. *foreign body response* - FBR) na biomaterijale prepoznatljiva je po makrofazima, multinuklearnim orijaškim stanicama (eng. *foreign body giant cells* - FBGC) i komponentama granulacijskog tkiva za razliku od kronične upale kojom dominiraju monociti, makrofazi i limfociti te se vezuje za infekciju ili toksičnost. Implantirani biomaterijal u trenutku implantacije dolazi u kontakt s proteinima tkivnih tekućina i krvi te podliježe adsorpciji nespecifičnim molekulama koje mogu inducirati daljnju adheziju stanica u procesu koji dovesti do otpuštanja citokina i upalnog odgovora organizma. Implantacija sintetskih biomaterijala koji nemaju *in vitro* mjerljivo toksično curenje tvari *in vivo* svejedno uzrokuju blagu upalu. Upala prolazi u periodu od dva do tri tjedna međutim fibrozna kapsula koja okružuje novo implantirani materijal ostaje doživotno, uključujući pridružene joj makrofage i FBGCs. Reakcija koja nastaje nakon dodatna tri tjedna, uglavnom je okarakterizirana kao mirna i bez lokalnih ili sistemskih učinaka. Takvu reakciju nazivamo reakcijom stranog tijela. Mirna FBR bez komplikacija u kojoj tanka neadherirajuća kapsula obavija implantat, danas se smatra temeljem biokompatibilnosti (56).

Tvornički materijali poput implantiranih silikona ili politetrafluoretilena (ePTFE) uvijek na površini imaju prisutne makrofage i FBGC. Topografija površine materijala, uz potencijalno prisutne kontaminacijske čestice, diktira sastav FBR (57). Mikrosfere i čestice ili pak tkanine i porozni materijali imaju grube i velike površine naspram volumena stoga na njima nalazimo velik broj makrofaga i FBGC. Implantirane čestice veće od makrofaga pokreću proces frustrirane fagocitoze i posljedične kronične. Materijal s glatkom površinom imat će izraženiju fibroznu reakciju (58). FBR može opstati na površini implantata dok god je u tkivu jer kapsula obavija implantat izolirajući FBR od lokalnoga tkiva. Premda i FBGC može opstati dokle god je implantat na mjestu, nije posve jasno da li njegove komponente ostaju aktivne otpuštajući lizosomalne sastavnice. Modul elastičnosti implantata, trenje, kompresija i iritacija tkiva također su jedan od čimbenika koji utječu na FBR. Dugotrajne reakcije koje mogu nastati kao posljedica komunikacije sa susjednim proteinima i stanicama se istražuju (4).

#### **6.4. Fibrotički odgovor i posljedice fibroze**

Prisjetimo li se da je fibroza neravnoteža između proizvodnje i razgradnje ekstracelularnog matriksa, sasvim je jasna potreba za razumijevanjem bioloških procesa na staničnoj razini. Proces stvaranja fibrotičkoga tkiva sličan je cijeljenju rane osim što naposljetku ne dolazi do remodeliranja i rezolucije. Različiti modaliteti upale mogu dovesti do stvaranja profibrotičkih molekula koje dovode do enkapsulacije biomaterijala, osim ako se koriste biomaterijali infiltrirani stanicama parenhima. Dodatni čimbenici koji nastaju uz infekciju, a promoviraju ih i sami biomaterijali uzrokuju nastanak molekulskih obrazaca patogena (PAMP) i molekulskih obrazaca oštećenja (DAMP) te promjenu pH sredine korištenjem kiselih materijala. Hipoksija i mehanički podražaji imaju snažan utjecaj na razvoj fibroze. Raznovrsne stanice imaju ulogu u fibrozi, počevši od granulocita, makrofaga i limfocita preko monocitnog sustava do miofibroblasta. Prepoznati su i brojni kemokini koji sudjeluju u procesu no uloga im je još uvijek nerazjašnjena. Morfogeni molekularni putevi poput Wnt i Notch sustava te Hedgehog liganda uključenih u diferencijaciju miofibroblasta također su dio procesa. Od citokina najvažniju ulogu ima TGF- $\beta$ . Matriksne metaloproteinaze (MMP) sudjeluju u razgradnji različitih proteina ekstracelularnog matriksa te su aktivne u svim fazama cijeljenja. Miofibroblasti se smatraju vodećim uzročnikom fibroze, doprinose remodelaciji kolagena granulacijskog tkiva u kolagen fibrotičnog tkiva (59).

Mnogi geni vezani uz fibrozu pokazuju promijenjene u metilaciji i ekspresiji gena enzima. Zabilježen je i slučaj epigenetski promijenjene diferencijacije miofibroblasta kao posljedice biofizičkog utjecaja materijala (60).

Fibrozna čahura može uzrokovati nepredvidljive rezultate terapija i neuspjeh zbog promjena koje uzrokuje na razini difuzije signalnih molekula i stanične komunikacije te retencije mikroorganizama i stvaranja povoljnog mjesta za infekciju. Razvoj materijala s niskom vrijednosti proteinske adsorpcije i lijekova sa antifibrotičkim učinkom ima široku uporabnu vrijednost (42).

## 7. STRATEGIJE REGENERATIVNE PARODONTOLOŠKE TERAPIJE

Melcherov koncept „kompartimentalizacije” iz 1976. godine i histološke analize studija parodontne regeneracije govore u prilog pojavi tkivnog pričvrsta na površini korijena naseljenog stanicama zdravog parodontnog ligamenta (61). Posljednjih godina predloženi su brojni načini regeneracije oštećenog parodontnog tkiva kao posljedice parodontne bolesti ili gingivnih recesija. Stanice epitela tijekom cijeljenja najbrže proliferiraju te nastaje dugi spojni epitel. Polaganjem membrane na površinu tretiranog korijena osiguravamo prostor i vrijeme za stanice koje se sporije regeneriraju te omogućavamo stvaranje cementa, parodontnog ligamenta i kosti koristeći autogene, aloplastične i druge materijale. Ova metoda naziva se vođenom regeneracijom tkiva. Postojeće strategije liječenja parodontnih defekata su, osim upravo navedene, terapija rekombinantnim proteinima te metode koje koriste biodegradirajuće materijale i osteoinduktivne supstance. Trenutno su u fazi intenzivnog istraživanja metode tkivnog inženjeringa koje obuhvaćaju manipulaciju stanicama, signalnim molekulama i tkivnim nosačima te genetskim materijalom, kao i epigenetskim čimbenicima. U posljednje vrijeme kombiniraju se kirurške metode s upotrebom bioaktivnih molekula kao što su metode koje koriste proteinski pristup koristeći derivate caklinskog matriksa (EMD) i krvne derivate (PRP, PRF, PRGF). U upotrebi su još i koštani morfogenetski proteini (BMP) i faktori rasta fibroblasta (FGF), no istražuju se i drugi poput periostina (8). Metoda koja zahtjeva korištenje rekombinantnih proteina uglavnom koristi rekombinantni PDGF (rhPDGF) s trikalcij-fosfatom (TCP) i rekombinantne koštane morfogenetske proteine (rhBMP) sa spužvom kolagena tipa I. Osim navedenih metoda u fazi istraživanja su stanična terapija i genska terapija. Stanična terapija zasniva se na *in vivo* i *in vitro* manipulaciji širokog spektra stanica s ciljem ozdravljenja bolešću ili povredom zahvaćenog područja. Genska terapija je vrlo zahtjevna, no rješava problem nedovoljne količine potrebnog proteina na mjestu primjene zbog njegove brze razgradnje. Temelji se na unošenju kodiranih proteinskih komponenti u stanicu koja ima sposobnost ekspresije ciljanog proteina. Imunoterapija je nefarmakološka terapija koja koristi neke od navedenih materijala i metoda za izbjegavanje antigenog i imunogenog odgovora organizma s ciljem postizanja željene reakcije organizma u odnosu na korišteni materijal (4).

Cilj parodontološke regenerativne terapije je formacija funkcionalnog parodontnog ligamenta s insercijama vlakana u novostvoreni cement i alveolarnu kost (4).

## 7.1. Regenerativni postupci i materijali korišteni u kliničkoj praksi

Središnji princip regenerativne terapije jest reparacija i regeneracija cementa, parodontnog ligamenta i alveolarne kosti. Nekoliko je metoda i materijala koje nam stoje na raspolaganju. Regeneraciju kosti pomoću otvorenog ili zatvorenog poliranja korijena bez upotrebe dodatnih sredstava (eng. *Open Flap Debridement* - OFD). Postoji li potreba, koristi se kost ili njeni nadomjestci uz upotrebu tehnike vođene regeneracije kosti (eng. *Guided Bone Regeneration* - GBR). Postupkom vođene regeneracije tkiva (eng. *Guided Tissue Regeneration* - GTR) postizemo regeneraciju parodontnih struktura korištenjem membrana u svrhu osiguravanje prostora za regeneraciju parodontnog i koštanog tkiva jer se navedene strukture regeneriraju sporije od stanica epitela. Različitim metodama pokušavamo spriječiti stvaranje dugog spojnog epitela i dozvoliti, pa čak i potaknuti, regeneraciju kosti i parodontnog tkiva aktivnim biomaterijalima. Potaknuti tkivo na regeneraciju možemo i korištenjem bioaktivnih tvari kao što su: faktori rasta i diferencijacije ili proteini caklinskog matriksa. Navedene metode i materijale možemo koristiti zasebno ili u kombinaciji. Najčešće korišteni materijali u kliničkoj praksi su koštani nadomjestci i koštani transplantati, okluzivne membrane i bioaktivni agensi. Cilj terapije koštanim transplantatima je, među ostalim, restauracija visine alveolarne kosti. Koristi se u kombinaciji s GTR i ostalim tehnikama. Pridodamo li tome da je svrha koštanih transplantata u konačnici regeneracija parodontnog ligamenta, zadatak postaje iznimno izazovan, a prisutan je i problem infekcije i nestandardiziranih kirurških tehnika pri korištenju ovih materijala. Negativna strana je ograničena količina raspoložive autologne kosti, točnije, mjesta s kojega se uzima, te brojne komplikacije koje mogu nastati u procesu. Ksenotransplantati i aloplastični materijali podložni su obrastanju fibroznom kapsulom te nisu osteoinduktivni, već su samo osteokonduktivni (4, 40, 42, 47).

Koštane nadomjestke s obzirom na podrijetlo i sastav možemo podijeliti na:

1. autogene, 2. alogene, 3. ksenogene i 4. aloplastične (4).

S obzirom na biološku funkciju u organizmu koštani nadomjestci mogu biti :

1. osteogeni, 2. osteoinduktivni, 3. osteokonduktivni (4).

Autogeni, oralno uzeti kortikalni koštani transplantati su najdjelotvorniji. Mnogi kliničari autogene intraoralno uzete transplantate smatraju zlatnim standardom. Mogući mehanizmi kojim sudjeluju u regeneraciji kosti je osteogeneza i osteoindukcija. Autograft pomiješan s krvlju ima bolje rezultate od samog čišćenja OFD. Ekstraoralno uzeti transplantati nisu pogodni za svakodnevnu upotrebu te mogu imati za ishod ankilozu i resorpciju korijena. Upotreba im je ograničena (4, 47).

Alogeni transplantati podrijetlom su od genetski nejednakih pripadnika iste vrste. To su: smrznuta spužvasta ili jačna kost, mineralizirani transplantat suho smrznute kosti (eng. *freeze-dried bone allograft* - FDBA) te dekalificirani suho smrznuti transplantat (eng. *demineralized freeze-dried bone* - DFDBA).

Pravilna priprema ovih transplantata uključuje njihovo izlaganje radijaciji i kemikalijama kako bi se smanjila mogućnost prenošenja zaraze i antigena. Histološka analiza pokazuje pojavu tkivnog pričvrška i stvaranje kosti. Materijali se, mogu koristiti zasebno ili u kombinaciji npr. lamelarni koštani alograft kao membrana u kombinaciji sa DFDBA te pokazuje obećavajuće rezultate. Osteogeni potencijal ostvaruju posredstvom morfogenih koštanih proteina (4, 47).

Ksenogeni transplantati životinjskog su i biljnog podrijetla. Posjeduju osteokonduktivna svojstva te su sigurni za upotrebu. U upotrebi su transplantati podrijetlom od goveda (npr. BioOss®) kao najčešće je korišten preparat ksenotransplantata ovoga tipa kod nas te koraljni skelet pripremljen kao resorptivni kalcij-karbonat ili neresorptivni hidroksiapatit (47).

Aloplastični materijali su sintetski materijali, sigurni za korištenje, bez rizika od prenošenja bolesti i vrlo su dostupni. Upotrebu opravdavaju osteokonduktivnim mehanizmom djelovanja no pretežno ih koristimo za zbrinjavanje defekata jer cementogeno djelovanje nije još dokazano. Pacijenta se ne mora izlagati drugoj neugodnoj operaciji pri uzimanju transplantata. U praksi se koriste polimeri, trikalcij-fosfat (TCP) odnosno beta trikalcij-fosfat ( $\beta$ -TCP), hidroksiapatit i bioaktivna stakla. Mnogi su materijali napravljeni od kalcijevih soli u upotrebi kao visoko biokompatibilni materijali kao što su kalcij-sulfat, kalcij-karbonat, kalcijev-fosfat i bioaktivna stakla. Hidroksiapatit je biokompatibilan, bioaktivan i osteokonduktivan. Dolazi u obliku resorptivnih i neresorptivnih keramičkih čestica. Histološka analiza pokazuje vezivom obrasle čestice i slabu formaciju kosti bez stvaranja pričvrška uz stvaranje spojnog epitela većim dijelom korijena. Beta trikalcij rezultira minimalnim formiranjem kosti, ali ne regeneracijom. Polimeri su se pokazali biokompatibilnim no uglavnom služe za popunjavanje defekata. Bioaktivna stakla, utvrđeno histološkom analizom, najčešće dovode do cijeljenja dugim spojnim epitelom i ograničenim stvaranjem kosti. Do resorpcije dolazi ovisno o sastavu korištenoga stakla. Mehanizam djelovanja ovih alkaličnih materijala ispoljava se u kontaktu sa tjelesnim tekućinama pri čemu nastaje dvosloj silicij gela i kalcij-fosfata koji potiču adsorpciju proteina. Osteoblasti luče ECM kao odgovor na proteine i potiču stvaranje kosti (4, 47). Osteogeni transplantati formiraju novu kost posredstvom pluripotentnih matičnih stanica. Osteoinduktivnost je sposobnost materijala da potiče rast kosti inducirajući pretvorbu nezrelih stanica u preosteoblaste i osteoblaste te posljedičan rast kosti. Osteokonduktivnost je odlika materijala da podržava razvoj kosti, i premda sam u tom rastu ne sudjeluje, služi kao nosač. Nedostaci prirodnih transplantata potaknuli su razvoj sintetskih materijala. Prednost nad prirodnim izvorima transplantata nalazi se u izostanku imunosnog odgovora. Razvoj osteoinduktivnih materijala počinje s otkrićem morfogenetskog koštanog proteina. Iako mehanizam djelovanja nije u potpunosti razjašnjen poznato je da su ovi materijali *in vivo* superiorni pred neosteinduktivnim materijalima u moduliranju okolnoga tkiva i stvaranju kosti. Pokušaji primjene osteoinduktivnih tvari u

tehnici GTR imaju problem nedovoljne količine tvari na tankim membranama. Postoji potreba za novim membranama projektiranim za ovu upotrebu.

U praksi koristimo resorptivne i neresorptivne sintetske membrane te prirodne membrane koje još nazivamo i biorazgradivim membranama. Minimalni kriteriji koje membrane moraju zadovoljiti su biokompatibilnost i klinička jednostavnost manipulacije. Moraju zadržati oblik dovoljno dugo dok stanice parodontnog ligamenta i kosti ne ispune tkivni defekt te se integriraju s tkivom. Zadovoljavajuća razina okluzivnosti na staničnoj razini omogućuje prolazak molekulama ali ne i stanicama. Resorbirajuće membrane ponekad nisu dovoljno krute i sklone su urušavanju. Ne funkcioniraju u svim slučajevima odnosno ishod je nepredvidiv. Negativni aspekti su primijećeni kod upotrebe neresorbirajućih membrana podložnih naseljavanju mikroorganizama i infekciji te zahtijevaju dodatni operativni postupak otklanjanja. Rijetko se koriste u regenerativnoj kirurgiji no zato su zlatni standard u GBR. Polilaktične, poliglikolne i poliglaktinske kisele membrane su sintetske membrane. U tijelu se razgrađuju procesom hidrolize, a daljnji produkti Krebsovim ciklusom do vode i ugljikova (IV) oksida. Zbog niskog pH inhibiraju osteogenezu te se pokazalo da mogu perzistirati u organizmu i do šest godina te u tom periodu izazvati FBR. Prirodne membrane načinjene su od kolagena goveđeg ili svinjskog podrijetla. Resorbiraju ih makrofazi i polimorfonuklearni leukociti posredstvom enzima. Kolagena membrana je sastavljena od kolagena tipa I te se već duže vrijeme koristi u kliničkoj praksi. Nekoliko je istraživanja pokazalo da imaju pozitivan učinak na regeneraciju parodontnog tkiva. Pružaju slabu potporu, a regenerativni potencijal je ograničen. Membrane od oksidirane celuloze načinjene su od resorbirajućeg hemostatičnog pokrova te imaju poticajan odgovor kad se koriste u GTR metodi. Zbog kiselosti uzrokuju zakašnjelo cijeljenje kosti. Postoji i imedijatna Atrisorb/Atrigel membrana koja se može pripremiti u ordinaciji miješanjem praškastog polilaktida koji proces stvaranja membrane završava u tekućem mediju tkivne tekućine ili fiziološke otopine. Ova membrana koristi se u kombinaciji s koštanim ili aloplastičnim materijalom za popunjavanje koštanih defekata (37, 40, 42). S obzirom da na interakciju stanica s materijalom utječu proteini vezani na površinu biomaterijala, površinska svojstva pogodna za adheziju nespecifičnih proteina također su pogodna za vezivanje bakterija. Uz navedeno, visoka koncentracija aktiviranih komplementa te njihov doticaj s površinom biomaterijala dokazano doprinose upalnom odgovoru organizma. Potreba za materijalom niske vrijednosti proteinske adsorpcije dovela je do razvoja nove skupine antiadsorpcijskih biomaterijala. Među najkorištenijima je polietilen glikol (PEG) koji spada u neionske hidrofilne materijale. Ostale dvije skupine često korištenih materijala su zwitterionski (samoorganizirajući monoslojevi - SAM, i drugi) te amfifilni (SAM i drugi) (49).

## 8. TKIVNI INŽENJERING

Tkivni inženjering predstavlja obećavajuće multidisciplinarno područje utemeljeno na biomedicinskim dokazima. Bavi se razvojem novih materijala i metoda u svrhu restauracije, regeneracije i održavanja zdravlja organizma i njegovih dijelova. Parodontološki aspekt tkivnog inženjeringa bavi se restauracijom i regeneracijom parodontnog ligamenta, cementa i alveolarne kosti uslijed narušene funkcije zbog bolesti ili traume. Istraživanja su fokusirana na ekstracelularni matriks, stanice i signalne molekule te na mehanizme koji upravljaju regulatornim procesima navedenih komponenti što u posljednje vrijeme uključuje i gensku terapiju te imunoterapiju (12). Uvjeti za uspješnu regeneraciju parodontnog tkiva metodama tkivnog inženjeringa su u prvom redu dostupnost dovoljnog broja stanica koje će sudjelovati u stvaranju novog tkiva uz odgovarajući nosač ili ekstracelularni matriks koji ima sposobnost zadržavanja stanica. Kako bi stanica dobila upute o formiranju određenoga tkiva potrebna je osim dovoljne količine signalnih molekula na mjestu primjene i njihova pravodobna aktivacija. Stanice koje se koriste u ovom procesu mogu biti autologne, podrijetlom od pacijenta, alogene, stanice donora i ksenogene, stanice životinjskog porijekla (32, 37, 40).

Glavne razlike prirodnih i sintetskih materijala dobivenih tkivnim inženjeringom zasnivaju se na zadovoljavanju uvjeta biokompatibilnosti i predvidivosti ishoda terapije koji se ne bi trebao ni po čemu razlikovati od prirodnog procesa regeneracije.

Pregledom literature zasnovane na regeneraciji parodonta tehnikama tkivnog inženjeringa, možemo uz stanovitu dozu opreza, zbog preklapanja unutar područja, izvesti podjelu na temelju *in vivo* i *in vitro* pristupa te terapije bazirane na stanicama.

- *In vivo* pristup podrazumijeva *in situ* regeneraciju tkiva korištenjem stanica i molekula sa sintetskim nosačima ili ekstracelularnim matriksom, potičući sam organizam na djelovanje.
- *In vitro* pripremljene stanice i tkiva u kombinaciji s aktivnim molekulama, genima, peptidima, polisaharidima i liofiliziranim staničnim frakcijama implantiraju se u organizam.
- Stanična terapija bazira se na izolaciji i kultiviranju stanica koje potječu od donora ili samog pacijenta. Apliciraju se ubrizgavanjem u obliku suspenzije ili mogu biti transplantirane kao adherirane stanične kulture u slojevima.

## 8.1. Stanice

Regenerativna parodontologija prepoznaje potencijal tkivno specifičnih stanica i matičnih stanica već nekoliko desetljeća, no još uvijek postoji mnogo tehničkih izazova. Tkivno specifične matične stanice nazivamo još i adultnim mezenhimalnim/somatskim matičnim stanicama (eng. *mesenchymal stem cells* – MSC), adultnim matičnim stanicama (eng. *adult stem cells* – ASC) ili postnatalnim matičnim stanicama dok pod izrazom matične stanice podrazumijevamo embrionalne matične stanice (eng. *embryonic stem cells* – ESC). Korištenje pluripotentnih ESC nailazi na biološke probleme tkivne podudarnosti i imunogenosti te na problematična etička pitanja. Istraživanja su stoga usmjerena ka postnatalnim matičnim stanicama izoliranim iz koštane srži, pupčane vrpce, adipoznog tkiva i ostalih organskih sustava. Samoobnavljanje tkivno specifičnih matičnih stanica ovisi o mitogenima i mehanizmima koji reguliraju stanični ciklus poput p16<sup>Ink4a</sup>-RB i p19<sup>Arf</sup>-p53 puteva uključenih u aktivaciju i inaktivaciju procesa tranzicije G1-S faze staničnog ciklusa. Dugoročni potencijal samoobnovljivosti tkivno specifičnih matičnih stanica ovisi o mehanizmima koji održavaju integritet genoma. Popravak DNA, održavanje stabilnosti telomera te antioksidativna zaštita organizma samo su neki od djelatnih mehanizama. Tkivno specifične matične stanice pod utjecajem kemotaksije i signalnih molekula luče faktore rasta i nadomještaju izgubljene stanice te potiču neovaskularizaciju. Ravnoteža između samoobnavljanja stanica i zadržavanja integriteta genoma osjetljiv je proces. Uključuje tumorsupresore, protoonkogene i brojne epigenetske faktore te može dovesti do pojave genomske nestabilnosti i onkoloških bolesti (62). Stanice koje su se dokazale u terapiji su samo autologne ASC. Alogene i ksenogene matične stanice za sada nose veliki rizik za korištenje zbog potencijalno snažnog imunogenog odgovora. S obzirom da je tehnički vrlo zahtjevno izolirati specifične stanice tkiva, matične stanice su se pokazale praktičnijima. Zbog svih razloga zbog kojih je upotreba ESC kontroverzna, velik broj istraživača proučava ASC i inducirane pluripotentne matične stanice (eng. *induced pluripotent stem cells* - iPS) (63).

Shinya Yamanaka (64) i John B. Gurdon (65) u 2012. godini osvojili su Nobelovu nagradu za medicinu. Dokazali su, svaki na svome primjeru, način na koji je moguće reprogramirati zrele, diferencirane stanice u pluripotentne matične stanice koje se mogu dalje diferencirati u različite tipove stanica. Proces se odvija uz brojne faktore reprogramacije, a neke od glavnih razlika i karakteristika početnih stanica i dobivenih ES/iPS prikazat ćemo na sljedećem primjeru (66).



Somatske stanice:	ES/iPS:
ograničena proliferacija	samoobnovljive
ekspresija specifičnih markera somatskih stanica	pluripotentne
tkivno specifična stanična morfologija	ES stanična morfologija
metilirani geni pluripotencije	demetilirani geni pluripotencije
inaktiviran X-kromosom	X-kromosom reaktiviran
aktivirana G1 podfaza	gubitak G1 podfaze

Inducirane pluripotentne stanice danas se mogu proizvesti od zrelih nediferenciranih stanica bolesnog pacijenta i tako omogućuju novi pristup u proučavanju mehanizama razvoja bolesti pa tako i bolesti parodontološke etiologije. Predstavljaju alternativu korištenju multipotentnim ASC. Dva su moguća pristupa u korištenju iPS stanica. Transplantiranjem *ex vivo* obrađenih iPS natrag u pacijenta ili konvertiranjem zdravih stanice *in vivo* i potom dozvoljavajući njihovo djelovanje *in situ* (66). Trenutno nisu spremne za kliničku upotrebu i zahtijevaju dodatna ispitivanja utjecaja okolišnih, biokemijskih i kemijskih signala kao i određivanje kritične količine stanica potrebnih za regenerativni proces tijekom terapije. Potrebno je osmisliti jeftinije metode kultivacije stanica. Jedina alternativa za sada su stanice izolirane postekstrakcijski iz alveole koja bi mogla poslužiti kao *in vivo* bioreaktor (67).

Stanice zubnog podrijetla su stanice izolirane iz parodontnog ligamenta (eng. *periodontal ligament derived stem cells* – PDLSC) i sadrže fibroblastične, cementoblastične i osteoblastične progenitorne elemente. Pokazalo se da ove stanice mogu spriječiti ankilozu i resorpciju korijena te potencijalno proizvesti parodontni ligament s insercijama vlakana u kost i zub. Ishod je ipak nepredvidiv jer se pojavljuju strukture nalik cementu u rasponu od djelomične pokrivenosti korijena do potpunog izostanka. Nedostatak ovog pristupa je mala količina dostupnog materijala i komplicirana laboratorijska procedura. Bez obzira, PDLSC će vjerojatno naći primjenu u budućnosti. Matične stanice izolirane iz dentalne pulpe (eng. *dental pulp derived stem cells* – DPSC) uz PDLSC spadaju u skupinu stanica izoliranih iz zuba. Sadrže heterogenu populaciju stanica uključujući fibroblaste, živčane, vaskularne i nediferencirane stanice zubne pulpe. Trenutni dokazi ne idu u prilog ovim stanicama ako je u pitanju regeneracija parodontnog ligamenta. Stanice dentalnog folikula (eng. *dental follicle derived stem cells* – DFDSC) ektomezenhimalnog su podrijetla. Pokazuju sposobnost osteogene, hondrogene i adipogene, diferencijacije. Predstavljaju alternativu korištenju stanicama izoliranim iz dentalne pulpe, iako ne toliko efikasnu. Matične stanice prikupljene iz ekstrahiranih mliječnih zubi (eng. *stem cells from exfoliated deciduous human teeth* – SHED) i apikalne papile (eng. *stem cells from apical papilla* – SCAP) u fazi su istraživanja i nisu spremne za kliničku upotrebu. SCAP predstavljaju izvor odontoblasta zaduženih za formaciju korijenskog dentina. Stanice podrijetlom iz zubne alveole mogu se izolirati *ad hoc*

preoperativno iz koštanog tkiva na ramusu mandibule. Provedene životinjske studije pokazuju značajne rezultate (68,69).

Matične stanice koje ne potječu od zubi su skeletalne matične stanice i adipozne matične stanice koje su iako obećavajuće, zbog inkonzistentnih rezultata, u fazi istraživanja. Adipozne matične stanice (eng. *adipose derived stem cells* – ADSC) su multipotentne stanice čije lako i bezbolno prikupljanje u dovoljnoj količini nosi određene prednosti iz tehničkog aspekta. Lipoaspiracijom prikupljena stromalna vaskularna frakcija (eng. *stromal vascular fraction* – SVF) uz adipocite sadrži preadipocite, MSC, endotelne progenitorne stanice, T i B stanice, mastocite, makrofage i pericite. Životinjski modeli pružaju obećavajuće rezultate, međutim, mehanizam koji bi ih usmjerio k regeneraciji parodonta još uvijek se istražuje (70). Skeletne matične stanice (eng. *skeletal stem cells* – SSC) privukle su pozornost istraživača zbog regenerativnog potencijala. *In vivo* imaju kapacitet diferencijacije u osteoblaste, adipocite i hondroblaste. Uz navedene istražuju se stanice koštane srži (eng. *bone marrow stem cells* - BMSC) (68, 69) i cementoblasti (71). Matične stanice koštane srži BMSC uz MSC svrstavaju se među najproučavanije. Usprkos heterogenosti BMSC posjeduju visok stupanj diferencijacije u različita tkiva. Osim navedenih izvora matičnih stanica istražuju se matične stanice porijeklom iz periosta, oralne mukoze i žlijezda slinovnica. Trenutno se istražuje i imunomodulacijska sposobnost matičnih stanica prilikom transplantacijskih zahvata na upalom zahvaćenom području (68, 69).

## 8.2. Nosači i ekstracelularni matriks

Ekstracelularni matriks (ECM) je kompleksna trodimenzionalna tvorba s mnogim zadaćama i funkcijama. Svojom arhitekturom pruža strukturalni integritet tkiva, pružajući stanicama podlogu na koju mogu adherirati. Sintetizira se i deponira pretežno kao odgovor na signalne molekule i mehaničke podražaje u međuovisnosti sa stanicama. Spoznaje o zadaćama ovog kompleksnog sustava dovele su do stvaranja umjetnih materijala nalik ECM koji se koriste pri regeneraciji tkiva i nazivamo ih nosačima (eng. *scaffold*) ili kalupima. Većina nosača spada u čvrste ili krute, fibrozne i gel nosače. Nosači se izrađuju od prirodnih i umjetnih materijala koji svojim prostornim i mehaničkim kvalitetama te biološkom aktivnošću sudjeluju u staničnim funkcijama imitirajući njen prirodni okoliš. Tako stvaramo uvjete u svrhu poticanja rasta i diferencijacije stanica. Nosači mogu sadržavati biološki aktivne molekule poput citokina i faktora rasta, primjerice BMP. Drugi način može biti stanična ili genska terapije te tako nosač postaje *in vivo* bioreaktor. Najčešće korišteni prirodni materijali su keramike poput osteokonduktivnog hidroksiapatita (HA) i trikalcij fosfata (CaP) te prirodni polimeri načinjeni od hijaluronske kiseline, alginata, kolagena i albumina. Inorganski nosači korišteni za alveolarne koštane defekte koji imaju izvrsna svojstva su

hidroksiapatit (HA) i kalcijev fosfat (CaP). Sastavom su vrlo slični kosti te imaju sposobnost stvaranja materijala koji nalikuje na apatit ili karbonatni hidroksiapatit. Omogućuju stvaranje dobre sveze između kosti i CaP promocijom ekspresije i funkcija stanica. Kalcijev fosfat je moguće koristiti u kombinaciji s BMP čime postaje osteoinduktivan. Možemo ih miješati s polimerima kako bismo dobili hibridni materijal koji je nešto mekši. Sintetski polimeri su poliesteri poput poliglikolne i polilaktične kiseline te njihove kombinacije. Takozvani pluroni načinjeni su od kopolimera polietilen oksida i polipropilen oksida. Nadalje koriste se polifosfatani i nano kalcij sulfat. Kompozitni nosači pokazali su se boljima u testiranju. Primjerice kompozitni nosač beta-trikalcij-fosfata i chitosana pokazao se bolji od samog chitosana jer je pokazao veću proliferaciju stanica parodontnog ligamenta pa čak i ekspresiju koštanog sijaloproteina i cement vezujućeg proteina (63, 71).

Smjernice za razvoj nosača jasne su jer su zahtjevi koje postavljamo pred materijal jasno definirani. Problemi počivaju u tehničkoj izvedbi i cijeni proizvoda. U tehničke kriterije razvoja sintetskih materijala spada optimalna poroznost s adekvatnom površinom i mehaničkom čvrstoćom. Mikropore moraju biti povezane kako bi omogućili migraciju stanica. Potrebno je moći kontrolirati kinetiku apsorpcije i resorptivnosti obzirom da je cilj njegova zamjena prirodnim tkivom. Novu skupina biomaterijala korištenih u regenerativne svrhe čine samoorganizirajući biomolekularni sustavi čija svojstva su inspirirana prirodnim materijalima, ali sami ne moraju nužno biti biološkog podrijetla. Primjer jednog takvog materijala je hidrogel, načinjen od prirodnog ili sintetskog viskoznog polimera građenog od umjetnih ili prirodnih hidrofilnih molekula koje stvaraju hidrogel međusobnim kovalentnim i ionskim vezama te fizičkim umrežavanjem. Potencijalno ga je moguće ubrizgati u sam parodont. Pokazao se kao izvrstan materijal u regenerativnim postupcima gdje je došlo do induciranja cementogeneze i diferencijacije stanica parodontnog ligamenta (63,71).

### **8.3. Signalne molekule**

Velika pozornost istraživanja usmjerena je u signalne puteve bitne u procesu cijeljenja i tkivne regeneracije. Najčešće korištene i najviše proučavane signalne molekule u svrhu regenerativne parodontne terapije navedene su u daljnjem tekstu.

Plazma bogata trombocitima (PRP) autoloni je koncentrat trombocita plazme. PRP sadrži mnoge faktore rasta, a među njima i faktor rasta podrijetlom iz trombocita (eng. *platelet-derived growth factor* - PDGF) i TGF $\beta$ . PDGF je prirodni hormon koji se pojavljuje u vrijeme cijeljenja rana, poznajemo pet izomorfni oblika. Ciljana funkcija ove molekule jest poticanje fibroblastične i osteoblastične stanične aktivnosti te stvaranje ekstracelularnog matriksa. Primarno ga u procesu cijeljenja izlučuju trombociti, a

potom i makrofazi. Transformacijski faktori rasta (eng. *transforming growth factor* - TGF) skupina su polipeptida čija glavna funkcija je regulacija stanične replikacije i diferencijacije. Unutar ove skupine postoje multipli izomorfi koji dijele zadaću sintetiziranja i održavanja ekstracelularnog matriksa te djeluju kemotaktički na fibroblaste i cementoblaste. Promoviraju akumulaciju fibroblasta i fibrozu u procesu cijeljenja. Postoje indicije da mogu direktno stimulirati sintezu DNA (42, 47).

Inzulinu sličan faktor rasta (IGF) promotor je kemotaksije kojeg luče trombociti i otpušta se za vrijeme stvaranja ugruška. Rezultira novostvorenom vaskularizacijom djelujući kemotaktično na vaskularne endotelne stanice (4, 42, 47).

Faktori rasta fibroblasta (eng. *fibroblast growth factor* - FGF) dio su u obitelji heparin vežućih faktora. Promoviraju proliferaciju i vezivanje stanica PDL i endotelnih stanica u procesu cijeljenja. FGF-2 promovira proliferaciju i prijanjanje endotelnih stanica PDL u cijeljenju (47).

Morfogenetski koštani proteini (BMP) dio su porodice transformirajućih faktora rasta (TGF- $\beta$ ). Pohranjeni su u koštanom matriksu i sudjeluju u indukciji, održavanju i popravku kosti. Medijacijom osteoblastične i osteoklastične aktivnosti sudjeluju u modelaciji i remodelaciji kosti. Djeluju potencijalno mitogeno i posjeduju kemotaktična svojstva. Imaju ulogu u promoviranju angiogene aktivnosti regulirajući angiogene peptide kao što je vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF). Djeluju autokrinim i parakrinim putem te induciraju stanične promjene, vežući se za stanične receptore i utječu na diferencijaciju mezenhimalnih progenitornih stanica u osteoblaste pod utjecajem citokina i faktora rasta direktnim ili indirektnim putem na razini transkripcije. Nusprodukti nastali kao posljedica upale tijekom cijeljenja ili povrede interferiraju s biološkom aktivnošću BMP. Sastav i arhitektura nosača i okoliš uz samu koncentraciju proteina djeluju na njegova kinetička svojstva i ishod primjene. Uspješnost postizanja rezultata ovisi o koncentracijskom gradijentu upotrebljenog proteina u organizmu. Posjeduju kemotaktična svojstva i mogu djelovati mitogeno ili utjecati na diferencijaciju mezenhimalnih progenitornih stanica u osteoblaste i hondroblaste (72). Derivati caklinskog matriksa (EMD) pokazuje angiogeni efekt u *in vitro* i *in vivo* studijama te mogu pozitivno utjecati na parodontno cijeljenje i regeneraciju. EMP ima ulogu u inicijaciji i rastu kristala hidroksiapatita u vrijeme formiranja cakline. Najpoznatiji i najviše istražen preparat na bazi EMP je Emdogain<sup>®</sup> (73). Radovi koji se detaljno bave njegovim biološkim učinkom i mehanizmom djelovanja su dostupni (74).

#### **8.4. Angiogeni čimbenici parodontnog cijeljenja**

Područje parodonta ima vrlo razvijenu trofičku opskrbu. Adekvatna vaskularizacija znači adekvatnu krvnu opskrbu i posljedično kisik, nutrijente i čimbenike obrane od infekcije. Najveći izazov pri regeneraciji parodonta je postići angiogenezu na avaskularnom području što bi omogućilo okoliš za

stanični rast, razvoj i migraciju te ujedno sintezu ekstracelularnog matriksa i ostalih uvjeta bitnih u inicijalnim fazama cijeljenja parodontne rane (4).

Novi materijali poput bioaktivnih sintetiziranih hidrogelova baziranih na polietilenglikolu (PEG) pokušavaju riješiti ovaj problem te uz pomoć sintetskih peptida iskoristiti aktivnost vaskularnog endotelnog faktora rasta na zahtjev stanice. Hidrogel osigurava potrebnu mehaničku potporu i milje u kojem može doći do angiogeneze (4, 75).

Nosači koji bi imali prefabriciranu arhitekturu za naseljavanje i formaciju adekvatnog vaskularnog sustava morali bi imati identična mehanička svojstva krvnih žila prije njihove formacije unutar materijala kako bi mogli podnijeti sve sile krvne struje i stres tlaka. FGF pokazuje angiogenu aktivnost i sposobnost induciranja nastanka nezrelih stanica PDL. Laminin prisutan u PDL igra važnu ulogu u angiogenezi a pozitivno je reguliran specifičnim faktorima rasta fibroblasta. Ovaj zadatak često obavljaju faktori rasta koji se koriste jer mogu inducirati angiogenezu, no nisu uvijek pouzdani *in vivo* jer se brzo razgrađuju pa stoga treba riješiti problem unošenja i razgradnje bioaktivnih materijala u organizam. Pokazalo se da PDGF i VEGF doprinose angiogenezi svaki na svoj način formirajući nove krvne žile u klinički značajnom broju (4, 75).

Većina današnjih istraživanja bazira se na *in vitro* kulturama stanica glatkog mišićja ili koštane srži i kolagenog nosača s arhitekturom nalik vaskularnoj što dozvoljava endotelnim stanicama njihovo naseljavanje i formiranje sustava nalik vaskularnom (4).

## **8.5. Genska terapija**

Genska terapija se zasniva na genetskoj modifikaciji stanica u terapijske svrhe te uz tkivni inženjering trenutno istražuje metode rehabilitacije parodonta. Biomolekularni proces uključuje transfer ciljane deoksiribonukleinske kiseline (eng. *deoxyribonucleic acid* - DNA) u stanicu dozvoljavajući sintezu DNA i posljedično ekspresije proteina, u tom slučaju nazvanih rekombinantnim proteinima (eng. *recombinant human* - rh) (76).

Genska terapija premošćuje probleme, brze proteolitičke aktivnosti, stanične egzocitoze posredovane receptorima i topivosti nosača na mjestu primjene *in vivo*, korištenjem vektora za prijenos informacija potrebnih pri sintezi samih proteina čime dugotrajno osigurava parodontnu ranu potrebnim aktivnim molekulama. U posljednje vrijeme istražuje se mogućnost terapije bez vektora. Primjer kliničkih ispitivanja ocrta upotreba rekombinantnih adenoviralnih vektora za PDGF i BMP *in vivo* i *ex vivo* pristupom (77).

## **9. RASPRAVA**

Pomoćna terapijska sredstva predmet su brojnih multidisciplinarnih istraživanja danas veoma razvijenog biomedicinskog područja. Usprkos razvoju bazičnih znanosti i rezultatima temeljnih istraživanja put do krajnjeg korisnika iznimno je dug i naporan jer zahtijeva suradnju interdisciplinarnih istraživačkih i kliničkih timova sa stručnjacima u proizvodnom sektoru. U posljednjih petnaest godina zabilježen je velik napredak razvojem translacijskih istraživanja, povezivanjem laboratorijskih istraživanja s "bolesničkim krevetom" (eng. *from bench to bedside*). Milijuni pacijenata svake se godine podvrgavaju operacijama koje uključuju korištenje biomaterijala. Gubitak tkiva uzrokovan traumom ili bolesti ozbiljan je problem koji za posljedicu ima brojne fiziološke i psihološke posljedice na pojedinca. Cilj regenerativne parodontne terapije je potpuna fiziološka i morfološka rekonstrukcija parodontnog tkiva. Stanični procesi na molekularnoj razini nevidljivi su oku kliničara no njihovo poznavanje zasigurno može unaprijediti terapiju i ishod liječenja.

Razvojem biomaterijala razvija se i spoznaja o biokompatibilnosti te se postavlja pitanje kako unaprijediti materijale i terapijske protokole s ciljem postizanja reproducibilnih ishoda terapije bez prisustva nepoželjnih imunoloških reakcija organizma. *Ex vivo* metode mjerenja bioloških parametara organizma baziraju se na histološkom pristupu i analitičkim tehnikama imunohistokemije, no premda ih se smatra zlatnim standardom, postoje brojna ograničenja. Potrebni su brojni životinjski modeli za uzorkovanje tkiva, proces je dug i skup. Iz tih se razloga javlja potreba za brzim, preciznim i jeftinijim strategijama, što u posljednje vrijeme postižemo ranom detekcijom molekularnih zbivanja i matematičkim predikcijskim modelima. Neka od *ex vivo* mjerenja registriraju stanične metabolite nastale u kontaktu s biomaterijalima, imunološki odgovor na odlaganje proteina, reaktivne kisikove spojeve, pH tkiva, neutrofile i aktivaciju makrofaga. S obzirom na poznavanje mehanizama staničnog odgovora, ciljanom analizom biokemijskih, fizikalnih i staničnih procesa zasigurno ćemo svjedočiti napretku na cijelom području regenerativne medicine.

Biologija cijeljenja i regenerativnog procesa od iznimne je važnosti za kliničara. Sva tkiva slijede isti proces cijeljenja koji možemo promatrati kao brzi protektivni odgovor organizma. Intraoralno rane cijele slično ekstraoralnim ranama, ali se proces odvija u nepogodnom vlažnom i toplom miljeu izloženom mikroorganizmima. Regenerativni proces može uslijediti, ali mu je potrebno više vremena. Usporedbom cijeljenja oralnih tkiva i kože primijećene su stanovite razlike, no još uvijek ne postoji prihvatljiva klasifikacija cijeljenja oralnih tkiva. Pregledom literature, većina studija upućuje na sposobnost bržeg cijeljenja oralnih tkiva s manje izraženom formacijom ožiljkastog tkiva. Razlozi i mehanizmi ove pojave se istražuju. Primijećeno je da granulacijsko tkivo podrijetlom od PDL ili tkiva prekrivenog keratiniziranim epitelom ima potencijal indukcije keratinizacije, no duboko tkivo nepca nema isti potencijal za razliku od tkiva neposredno prekrivenog epitelom. Zanimljiva je opservacija o aktivaciji upalnoga citokina IL-1 u procesu cijeljenja intraoralnih rana ali ne i ekstraoralnih. Pretpostavlja se da je

razlog tome IL-1 posredovana kontrola obrambenog mehanizma na fiziološki prisutne mikroorganizme (50). Izostanak bioloških i tehničkih komplikacija tijekom cijeljenja može u povoljnim uvjetima doći do parodontne regeneracije za koju je od iznimne važnosti stabilni krvni ugrušak. Primarno, trombociti sintetiziraju i otpuštaju brojne citokine i faktore rasta poput: OPN, PDGF, TGF- $\beta$ , IGF1, FGF-2, VEGF, EGF i drugih koji privlače neutrofile, monocite i makrofage. Sekundarni mehanizmi koagulacije uključuju intrinzični i ekstrinzični put odgovoran za ojačavanje krvnog ugruška umrežavanjem fibrinogena i formacijom fibrina. Ustanovili smo različite mehanizme djelovanja pojedinih signalnih molekula i signalnih puteva uključenih u ovaj proces međutim intrigantna citokinska mreža, faktori rasta i interakcije stanica s brojnim molekulama i ekstracelularnim matriksom područje je koje postavlja mnoga pitanja i u posljednje vrijeme daje sve više odgovora (78, 79).

Navedeni procesi odvijaju se na mikro- i nanometarskoj razini. Područje tkivnog inženjeringa i nanomedicine razvija biomaterijale i nanobiomaterijale koji bi trebali unaprijediti interakciju s tkivom (80). Tkivni inženjering razmatra upotrebu matičnih stanica, signalnih molekula i nosača te u posljednje vrijeme genske terapije. Nosači imitiraju ekstracelularni matriks te služe kao vehikul za preciznu dostavu bioaktivnih molekula i stanica ili služe za popunjavanje tkivnih defekata. Izvori i metode dobivanja nosača variraju od prirodnih do sintetskih dobivenih brojnim metodama, u posljednje vrijeme i naprednim metodama aditivne tehnologije. Poznato nam je da je imunološki odgovor posredovan makrofazima iznimno osjetljiv na veličinu čestica s kojima je u kontaktu (81, 82). Primjer nanobiomaterijala je anorganski koštani matriks sačinjen od kristala apatita veličine 400x30x75 Å. Velik interes pobuđuje projektiranje nanostrukturiranih površina zbog sposobnosti inicijacije kontakta sa stanicama i formiranja veza koje dovode do reorganizacije staničnog citoskeleta što znači da se otvara mogućnost komunikacije sa stanicama nefarmakološkim pristupom ovisnim isključivo o topografiji i geometriji površine s kojom je u interakciji. Stanična membrana posjeduje integrinske receptore posredstvom kojih komunicira s ostalim stanicama, ekstracelularnim matriksom i molekulama te proteinima koji je okružuju što joj omogućuje brzi odgovor na promjene u okruženju (83). Pomažu joj pri migraciji, diferencijaciji, stvaranju i razgradnji ekstracelularnog matriksa (37).

Promatranje različitih staničnih odgovora u odnosu na dizajn materijala izvanredna je prilika za proučavanje signalnih puteva koji upravljaju različitim staničnim procesima. Adsorpcija proteina na površine ovisi o topografskim karakteristikama površina. U pravilu svi materijali potiču vezivanje nespecifičnih proteina pa tako i stanica odgovornih za upalni odgovor organizma. Biomaterijali dobiveni tkivnim inženjeringom mogu se prekriti specifičnim proteinima čime se postiže selektivno vezivanje stanica. Različitom ekspresijom integrina moguće je izolirati tkivno specifične stanice (84, 85). U pravilu svi ekstracelularni, biokemijski i fizikalni signali moduliraju unutarstanična zbivanja.



Pokušaj stvaranja materijala koji ne dovode do FBR i fibroze te koji bi djelovali protuupalno rezultirao je stvaranjem materijala sa specifičnim kemijskim i fizikalnim karakteristikama (eng. *nonfouling biomaterials*): amfifilni, zwitter-ionski i neionski hidrofilni materijali. Biomaterijali izloženi fibrozi na mjestu implantacije upućuju na mogućnost ugradnje bioloških senzora, što bi omogućilo nove metode administracije odnosno doziranja lijekova. Nova skupina materijala su samoorganizirajući biomolekularni materijali čija svojstva su inspirirana prirodnim materijalima ali sami ne moraju nužno biti biološkog podrijetla. Veličinom variraju od 100 Å do 10 nm. Uključuju biosintetske polimere, mikrofluide, hidrogelove, samoorganizirajuće sustave u slojevima, lipidnim dvoslojem inspirirane membrane, mezoskopske strukture i biomineralizacijske materijale (86). Cilj istraživanja je pronalaženje materijala koji organizam ne razlikuje od vlastitih tkiva te može postići funkcionalnu biološku integraciju.

Ultimativni cilj regenerativne terapije je korištenje regenerativnog potencijala organizma bez posredstva lijekova. Uzmemo li u obzir da je medij u kojem djelujemo otvoreni sustav, konstantno izložen mikroorganizmima i virusima teško je zamisliti liječenje bez potporne farmakološke terapije. U ovu svrhu primjenjuju se različite skupine lijekova s različitim stupnjevima uspješnosti. U upotrebi su protuupalni lijekovi, antibiotici, razne supstance s utjecajem na koštano tkivo te razne druge od kojih možemo za primjer izdvojiti terapiju Orthokinom<sup>®</sup>. Regenerativni potencijal i mehanizmi unutar životinjskog carstva se razlikuju. Klinička upotreba stanične terapije prepoznaje potencijal različitih progenitornih i matičnih stanica. Inducirane pluripotentne matične stanice su otkrivene tek u ovome desetljeću. Istraživanja na životinjskim modelima su obećavajuća. U posljednje vrijeme istražuje se značaj i mehanizam transdiferencijacije i mehanizam dediferencijacije stanica te njegov potencijal u terapiji. Pregledom literature rezultati upućuju na autologne matične stanice kao najsigurniji odabir (PDLSC). Ostale stanice izolirane iz oralnog područja ne doimaju se efikasnim u regeneraciji parodontnih struktura (DPSC, SHED, DFSC, DAPSC).

Potrebno nam je bolje razumijevanje staničnog i molekularnog mehanizma formacije korijena i pripadajućeg cementa što se smatra vodećim problemom. Potrebno je dobro poznavati stanični ciklus te njihove sposobnosti obnavljanja na temelju čega ih možemo podijeliti na: labilne, stabilne i permanentne. Smatra se da Hertwigova epitelna ovojnica (HERS) ima ključnu ulogu u razvoju korijena i cementogenezi. Ostaci HERS perzistiraju kao ostaci Malassezeovih tjelešaca u parodontnom ligamentu i smatraju se matičnim stanicama koje mogu stvoriti cementoblaste (43).

Želimo li unaprijediti regenerativnu terapiju parodontnoga kompleksa potrebno nam je poznavanje biologije parodontne bolesti i uzroka poremećaja u cijeljenju. Znanje terapeuta pored kliničkih protokola zahtjeva poznavanje staničnih i molekularnih mehanizama regenerativnog procesa, razvojne biologije, stanične komunikacije i diferencijacije te komunikacije među svim uključenim sastavnicama regenerativnog procesa.

## **10. ZAKLJUČAK**

Tehnološki napredak omogućio nam je široki izbor materijala i metoda za regeneraciju parodontno ugroženih dijelova zuba. Proteini caklinskog matriksa za sada jedini dokazano regeneriraju parodontne strukture. Transformirajući faktori rasta dokazano djeluju na diferencijaciju ključnih stanica u regenerativnom procesu. Nezaobilazna je i upotreba nosača kao načina preciznog dopremanja bioaktivnih molekula i stanica te popunjavanja tkivnih defekata. Matične stanice pokazuju velik potencijal, no još nisu spremne za svakodnevnu kliničku upotrebu. Imunomodulacijska terapija postavlja temelje nefarmakološkog djelovanja na imunološki odgovor organizma koji za posljedicu ima prihvaćanje implantata i transplantata bez bojazni od mogućeg odbačivanja ili fibroznog odgovora organizma. Metode za evaluaciju odgovora organizma na regenerativne materijale *ex vivo* i još značajnije *in vivo*, su u porastu. Uz laboratorijske metode i predikcijske matematičke modele interpretacija njihovih rezultata ključna je za daljnji razvoj materijala, terapija i strategija u regenerativnoj parodontologiji. Histološke metode ostaju analitički zlatni standard i čvrst temelj za razvoj novih metoda poput metoda *in vivo* mjerenja pH vrijednosti, odlaganja proteina, detekcije reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i drugih. Etička pitanja o podrijetlu i posljedicama korištenja matičnih stanica u terapiji ostaju otvorena, no rastuća spoznaja o biološkoj funkciji organizma na bazičnoj razini i njegovoj interakciji s okolinom zasigurno doprinosi kvaliteti liječenja. Terapije navedenim metodama i materijalima su obećavajuće, no potrebna su nam dodatna bazična i translacijska istraživanja te kliničke randomizirane studije dužeg trajanja s ciljem standardizacije terapijskih protokola i postizanja konzistentno reproducibilnih rezultata. Preostaje nam i revidirati opravdanosti pojedinih zahvata s obzirom na trošak i potencijalne opasnosti primjene određenih materijala i metoda, kad uzmemo u obzir da se radi o *bona fide*, ambicioznom pothvatu rješavanja stanja koje nije životno ugrožavajuće.

## **11. LITERATURA**

1. Williams DF, Definitions in biomaterials. *J Polymer Sci Polymer Lett Ed.* 1988;26(9):414.
2. Bhat S, Kumar A. Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. *Biomatter.* 2013;3(3):e24717.
3. Swetha B, Mathew S, Murthy BVS, Shruthi N, Bhandi SH. Determination of biocompatibility: A review. *IDMJAR* 2015;1(1):1–6.
4. Badylak SF. *Host Response to Biomaterials: The Impact of Host Response on Biomaterial Selection.* Amsterdam: Elsevier Acad. Press; 2015. 432 p.
5. Ratner BD. A pore way to heal and regenerate: 21st century thinking on biocompatibility. *Regen Biomater.* 2016;3(2):107–10.
6. Favus MJ. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism.* 6th ed. Washington DC: American Society for Bone and Mineral Research; 2006. p. 20-35.
7. Sharma CP. *Biointegration of medical implant materials: science and design.* Oxford: CRC Press; 2010. 412 p.
8. Politis C, Schoenaers J, Jacobs R, Agbaje JO. Wound Healing Problems in the Mouth. *Front Physiol.* 2016;7:1-13.
9. Lindhe J, Lang NP, Berglundh T, Giannobile WV, Sanz M, editors. *Clinical periodontology and implant dentistry.* 6th edition. Chichester: John Wiley and Sons Inc; 2015. p. 129-82.
10. Magan A, Ripamonti U. Biological aspects of periodontal tissue regeneration: cementogenesis and the induction of Sharpey's fibres. *SADJ.* 2013;68(7):304–14.
11. Slots J, MacDonald ES, Nowzari H. Infectious aspects of periodontal regeneration. *Periodontol.* 2000. 1999;19:164–72.
12. Taba M, Jin Q, Sugai J, Giannobile W. Current concepts in periodontal bioengineering. *Orthod Craniofac Res.* 2005;8(4):292–302.
13. Bosshardt DD, Nanci A. Hertwig's epithelial root sheath, enamel matrix proteins, and initiation of cementogenesis in porcine teeth. *J Clin Periodontol.* 2004;31(3):184–92.
14. Giannobile WV, Somerman MJ. Growth and amelogenin-like factors in periodontal wound healing. A systematic review. *Ann Periodontol.* 2003;8:193–204.
15. Schroeder HE, Listgarten MA. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontol.* 2000. 1997;13:91–120.
16. Smith A. A glossary for stem-cell biology. *Nature.* 2006;441(7097):1060.

17. Shenghui H, Nakada D, Morrison SJ. Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009;25(1):377–406.
18. Tzach-Nahman R, Nashef R, Fleissig O, Palmon A, Shapira L, Wilensky A, et al. Oral fibroblasts modulate the macrophage response to bacterial challenge. *Sci Rep.* 2017;7(1):11516.
19. Anderson, DM, et al. A homologue of TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic cell function. *Nature.* 1997;390:175-9.
20. Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone.* 2007;40:251-64.
21. Bar-Shavit Z. The osteoclast: A multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *J Cell Biochem.* 2007;102:1130-9.
22. Herman S, Kronke G, Schett G. Molecular mechanisms of inflammatory bone damage: emerging targets for therapy. *Trends Mol Med.* 2008;14:245-53.
23. Archana D, Venkata Srikanth D, Sasireka D, Bobby Kurien D, Ebenezer D. Fibroblast Heterogeneity in Periodontium – a Review. *IJDSR.* 2014;2(3):50–4.
24. Lekic PC, Pender N, McCulloch CAG. Is Fibroblast Heterogeneity Relevant To the Health, Diseases, and Treatments of Periodontal Tissues? *Crit Rev Oral Bio Med.* 1997;(3):253–68.
25. Gao Y, Grassi F, Ryan MR, Terauchi M, Page K, Yang X, et al. IFN- $\gamma$  stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation. *J Clin Invest.* 2007;117(1):122–32.
26. Chen B, Wu W, Sun W, Zhang Q, Yan F, Xiao Y. RANKL Expression in Periodontal Disease: Where Does RANKL Come from? *Biomed Res Int.* 2014;2014. p. 1–7.
27. Lapérine O, Cloitre A, Caillon J, Huck O, Bugueno IM, Pilet P, et al. Interleukin-33 and RANK-L Interplay in the Alveolar Bone Loss Associated to Periodontitis. *PLOS ONE.* 2016;11(12):e0168080.
28. Jönsson D, Nebel D, Bratthall G, Nilsson B-O. The human periodontal ligament cell: a fibroblast-like cell acting as an immune cell: Human periodontal ligament cell characteristics. *J Periodontal Res.* 2011;46(2):153–7.
29. Magan A, Ripamonti U. Biological aspects of periodontal tissue regeneration: cementogenesis and the induction of Sharpey’s fibres. *SADJ.* 2013;68(7):304–10.
30. Bosshardt DD, Zalzal S, McKee MD, Nanci A. Developmental appearance and distribution of bone sialoprotein and osteopontin in human and rat cementum. *Anat Rec.* 1998;250(1):13–33.

31. Bosshardt DD. Are Cementoblasts a Subpopulation of Osteoblasts or a Unique Phenotype? *J Dent Res.* 2005;84(5):390–406.
32. Rozario T, DeSimone DW. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol.* 2010;341:126-40.
33. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cell Mol Immunol.* 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2000. 553 p.
34. Murphy SP, Porrett PM, Turka LA. Innate immunity in transplant tolerance and rejection: Innate immunity in transplantation. *Immunol Rev.* 2011;241(1):39–48.
35. Srdana Č. Citokini i autoimunosne bolesti. *Pediatr Croat.* 2005;49 Suppl 1:141-61.
36. Grinnell F. Fibronectin and wound healing. *J Cell Biochem.* 1984;26(2):107–16.
37. Carson AE, Barker TH. Emerging concepts in engineering extracellular matrix variants for directing cell phenotype. *Regen Med.* 2009;4(4):593–600.
38. Ruggiero S, Cosgarea R, Potempa J, Potempa B, Eick S, Chiquet M. Cleavage of extracellular matrix in periodontitis: Gingipains differentially affect cell adhesion activities of fibronectin and tenascin-C. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* 2013;1832(4):517–26.
39. Kao WJ, Lee D, Schense JC, Hubbell JA. Fibronectin modulates macrophage adhesion and FBGC formation: The role of RGD, PHSRN, and PRRARV domains. *J Biomed Mater Res.* 2001;55(1):79–88.
40. Love BJ. *Biomaterials: a systems approach to engineering concepts.* London: Elsevier/Academic Press; 2017. 387 p.
41. Urist MR. Bone: Formation by Autoinduction. *Science.* 1965;150(3698):893–9.
42. Stocum DL. *Regenerative biology and medicine.* 2nd ed. Amsterdam: Elsevier Acad. Press; 2012. p. 3-20.
43. Bosshardt DD, Stadlinger B, Terheyden H. Cell-to-cell communication - periodontal regeneration. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(3):229–39.
44. Sojod B, Chateau D, Mueller CG, Babajko S, Berdal A, Lézot F, et al. RANK/RANKL/OPG Signalization Implication in Periodontitis: New Evidence from a RANK Transgenic Mouse Model. *Front Physiol.* 2017;8:338.
45. Sculean A, Gruber R, Bosshardt DD. Soft tissue wound healing around teeth and dental implants. *J Clin Periodontol.* 2014;41 Suppl 15:6–22.
46. Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol.* 2014;15(7):602–11.
47. Pandit N, Malik R, Philips D. Tissue engineering: A new vista in periodontal regeneration. *J Indian Soc Periodontol.* 2011;5(4):328–37.

48. Carey LE, Dearth CL, Johnson SA, Londono R, Medberry CJ, Daly KA, et al. In vivo degradation of <sup>14</sup>C-labeled porcine dermis biologic scaffold. *Biomaterials*. 2014;35(29):8297–304.
49. Tsay R-Y. Development of Nonfouling Biomaterials. *Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Science 2V*. Hoboken: Wiley & Sons, Inc; 2016. p. 145-160.
50. Graves DT, Nooh N, Gillen T, Davey M, Patel S, Cottrell D, et al. IL-1 Plays a Critical Role in Oral, But Not Dermal, Wound Healing. *J Immunol*. 2001;167(9):5316–20.
51. Shelton RM, Rasmussen AC, Davies JE. Protein adsorption at the interface between charged polymer substrata and migrating osteoblasts. *Biomaterials*. 1988;9(1):249.
52. Sykaras N, Opperman LA. Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? *J Oral Sci*. 2003;45(2):57–73.
53. Department of National Security, State University of Library Studies and Information Technologies, Sofia, Bulgaria, Deliversky J, Yaneva-Deliverska M, Lyapina M, Kisselova A. European and International Standards on Medical Devices for Dentistry. *J IMAB - Annual Proceeding (Scientific Papers)*. 2015;16;21(1):713–7.
54. Pejčić A, Kojović D, Mirković D, Minić I. Stem Cells for Periodontal Regeneration. *Balkan J Med Genet*. 2013;16(1):7–11.
55. Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ. Cell and molecular biology of cementum. *Periodontol 2000*. 2000;24:73–98.
56. Geissler EK. The ONE Study compares cell therapy products in organ transplantation: introduction to a review series on suppressive monocyte-derived cells. *Transplant Res*. 2012;1(1):11.
57. Bota PCS, Collie AMB, Puolakkainen P, Vernon RB, Sage EH, Ratner BD, et al. Biomaterial topography alters healing in vivo and monocyte/macrophage activation in vitro. *J Biomed Mater Res A*. 2010;95A(2):649–57.
58. Knight SR, Aujla R, Biswas SP. Total Hip Arthroplasty – over 100 years of operative history. *Ortho Rev (Pavia)*. 2011;3(2):16.
59. Hinz B. Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair. *J Invest Dermatol*. 2007;127(3):526–37.
60. Downing TL, Soto J, Morez C, Houssin T, Fritz A, Yuan F, et al. Biophysical regulation of epigenetic state and cell reprogramming. *Nat Mater*. 2013;12(12):1154–62.
61. Melcher AH. On the Repair Potential of Periodontal Tissues. *J Periodontol*. 1976;47(5):256–60.



62. Shenghui H, Nakada D, Morrison SJ. Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009;25(1):377–406.
63. Chen F-M, Periodontal Tissue Engineering and Regeneration: Current Approaches and Expanding Opportunities. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16(2):219–55.
64. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell.* 2006;126(4):663–76.
65. Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol.* 1962;10:622–40.
66. Cox JL, Rizzino A. Induced pluripotent stem cells: what lies beyond the paradigm shift. *Exp Biol Med (Maywood).* 2010;235(2):148–58.
67. Cherry ABC, Daley GQ. Reprogramming Cellular Identity for Regenerative Medicine. *Cell.* 2012;148(6):1110–22.
68. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry – Part I: Stem cell sources. *J Prosthodont Res.* 2012;56(3):151–65.
69. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry – Part II: Clinical applications. *J Prosthodont Res.* 2012;56(4):229–48.
70. Tobita M, Mizuno H. Adipose-Derived Stem Cells and Periodontal Tissue Engineering. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013;28(6):e487.
71. Liao F, Chen Y, Li Z, Wang Y, Shi B, Gong Z, et al. A novel bioactive three-dimensional  $\beta$ -tricalcium phosphate/chitosan scaffold for periodontal tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med.* 2010;21:489–9.
72. Guyton AC, Hall JE. *Medicinska fiziologija.* 10th ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2003. p. 901-906.
73. Sculean A, Alessandri R, Miron R, Salvi GE, Bosshardt DD. Enamel Matrix Proteins and Periodontal Wound Healing and Regeneration. *Clin Adv Periodontics.* 2011;1(2):101–17.
74. Bosshardt DD. Biological mediators and periodontal regeneration: a review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels. *J Clin Periodontol.* 2008;35 Suppl 8:87–105.
75. Zisch AH, Lutolf MP, Ehrbar M, Raeber GP, Rizzi SC, Davies N, et al. Cell-demanded release of VEGF from synthetic, biointeractive cell ingrowth matrices for vascularized tissue growth. *The FASEB Journal.* 2003;17(15):2260–2.
76. Singh N, Saluja M, Chatterjee A. Gene therapy in periodontics. *J Indian Soc Periodontol.* 2013;17(2):156.

77. Ansari S, Kale T, Mahale S, Dani N. Gene therapy and its implications in Periodontics. *J Indian Soc Periodontol.* 2009;13(1):1.
78. Lekic P, Sodek J, McCulloch CAG. Osteopontin and bone sialoprotein expression in regenerating rat periodontal ligament and alveolar bone. *Anat Rec.* 1996;244(1):50–8.
79. Lynch SE, Lynch LA, Nevins M. Use of rhPDGF to improve bone and periodontal regeneration. In: Lynch SE, Marx RE, Nevins M, Lynch LA. *Tissue engineering: Applications in Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontics.* 2nd ed. Chicago: Quintessence Publishing; 2006. p. 87–102.
80. Klaessig F, Marrapese M, Abe S. Current Perspectives in Nanotechnology Terminology and Nomenclature. *Nanotechnology Standards.* New York: Springer New York; 2011. p. 21–52.
81. Zolnik BS, González-Fernández Á, Sadrieh N, Dobrovolskaia MA. Minireview: Nanoparticles and the Immune System. *Endocrinology.* 2010;151(2):458–65.
82. Ye L, Yong K-T, Liu L, Roy I, Hu R, Zhu J, et al. A pilot study in non-human primates shows no adverse response to intravenous injection of quantum dots. *Nat Nanotechnol.* 2012;7(7):453–8.
83. Carson AE, Barker TH. Emerging concepts in engineering extracellular matrix variants for directing cell phenotype. *Regenerative Medicine.* 2009;4(4):593–600.
84. Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Percy MJ. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Eng.* 2005;11(1–2):1–18.
85. Londono R, Badylak SF. Biologic Scaffolds for Regenerative Medicine: Mechanisms of In vivo Remodeling. *Ann Biomed Eng.* 2015;43(3):577–92.
86. Staff NRC. *Biomolecular Self Assembling Materials: Scientific and Technological Frontier.* Washington: National Academies Press; 1996. 31 p.

## **12. ŽIVOTOPIS**

Frane Kovačević rođen je 6. 10. 1988. godine u Zadru gdje je završava osnovnu školu. Srednju školu za zubnog tehničara završava na Zdravstvenom učilištu u Zagrebu gdje upisuje Stomatološki fakultet. Aktivan je član Studentske sekcije za parodontologiju od 2015. godine te je volontirao na Zavodu za parodontologiju i na Zavodu za endodonciju i restaurativnu stomatologiju. Sudjelovao je na projektu 1. Kongresa studenata dentalne medicine Stomatološkog fakulteta u Zagrebu 2017. godine gdje je održao predavanje na temu "Recesije i terapija" pod mentorstvom prof. dr. sc. Darka Božića. Sudjelovao je u organizaciji Dentakla, kulturnog događanja studenata Stomatološkog fakulteta u Zagrebu. Bio je voditelj projekta u razvoju pod nazivom "Oralna higijena trudnica i dojenčadi" s potporom HZZO. S kolegom Goranom Tomićem tijekom studija razvija prototip 3D atlasa morfologije i histologije zuba pod nazivom "3Dent". Dugogodišnji je član Akademskog zbora "Ivan Goran Kovačić". S kolegama osniva vaterpolo momčad Stomatološkog fakulteta u Zagrebu. Tijekom studija završio je iTOP Curaprox tečaj i prisustvovao na više stručnih kongresa te je asistirao u privatnoj stomatološkoj ordinaciji.