

Ewa Chomik¹, Paulina Bautembach-Koberda¹, Katarzyna Schütz¹,
Tadeusz Pawełczyk², Izabela Maciejewska¹

Ocena potencjału proliferacji i zdolności formowania kolonii in vitro przez komórki izolowane z miazgi ludzkiego zęba (DPSC) oraz brodawki wierzchołkowej (SCAP) hodowane w warunkach standardowych oraz stymulujących różnicowanie

In vitro analysis of the proliferation potential and colony forming efficiency of stem cells isolated from dental pulp (DPSC) and apical papilla (SCAP), cultured in standard and pro-mineralizing conditions

¹ Katedra i Zakład Protetyki Stomatologicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

² Zakład Medycyny Molekularnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Streszczenie

Wstęp. Niewyrżnięte zęby mądrości są źródłem komórek macierzystych, które przy odpowiedniej stymulacji środowiska hodowanego in vitro różnicują się w liczne linie rozwojowe m.in. odontoblasty, neurocyty, chondrocyty, adipocyty.

Cel pracy. Porównanie in vitro potencjału proliferacji i tworzenia kolonii przez komórki izolowane z miazgi ludzkiego zęba (DPSC) oraz brodawki wierzchołkowej (SCAP), hodowanych w środowisku stymulującym mineralizację (grupa doświadczalna) oraz w warunkach standardowych (grupa wyjściowa i kontrolna).

Materiał i metody. Po zabiegu odontektomii miazgę komorową oraz brodawkę wierzchołkową trawiono roztworem dyspazy i kolagenazy typu I, a pozyskane komórki hodowano w pożywce α MEM uzupełnionej surowicą bydlęcą, L-glutaminą oraz antybiotykami. Pożywkę w grupie doświadczalnej dodatkowo wzbogacano składnikami stymulującymi mineralizację. Mezenchymalny fenotyp komórek określono metodą MACS z użyciem przeciwciał przeciwko STRO-1 i CD146, a komórki hematopoetyczne i leukocyty eliminowano selekcją negatywną z użyciem przeciwciał przeciwko CD34 i CD45. Potencjał proliferacyjny szacowano pomiarem szybkości rozkładu soli tetrazolowej do formazanu, natomiast zdolność tworzenia kolonii oceniono barwieniem Giemsy.

Wyniki. Analiza hodowli komórek DPSC i SCAP wykazała, że komórki SCAP we wszystkich badanych grupach dzieliły się szybciej oraz tworzyły większe i bardziej liczne kolonie w porównaniu z komórkami DPSC. Ponadto, promineralizacyjna stymulacja środowiska hodowanego powodowała obniżenie zdolności formowania kolonii i spadek potencjału proliferacji w obu liniach komórkowych.

Wnioski. Wysoki potencjał proliferacji oraz zdolność tworzenia licznych kolonii przez komórki SCAP dowodzi ich niższej dojrzałości komórkowej w porównaniu do komórek DPSC. Jednak zarówno SCAP jak i DPSC hodowane w środowisku promineralizacyjnym ulegają szybszemu różnicowaniu komórkowemu o czym świadczy ich niższy potencjał do samoodnawiania i spowolnienie procesów proliferacyjnych. Pomimo różnic w dojrzałości komórkowej komórek pochodzących z obu linii komórkowych, zarówno miazga zęba jak i brodawka wierzchołkowa niewyrżniętych zębów ósmych są cennym źródłem mezenchymalnych komórek macierzystych.

Słowa kluczowe: komórki macierzyste, miazga zęba, DPSC, brodawka wierzchołkowa, SCAP.

Abstract

Introduction. Recent data point to unerupted third molars as a promising source of stem cells (SC). Tooth derived SC are clonogenic and present a capacity for self-renewal and colony formation. Additionally, an environmental stimulation induces an in vitro differentiation of SC into multiple lineages, including odontoblasts.

Aim of the study. The aim of the study was to evaluate the in vitro potential for proliferation and colony formation by stem cells derived from both dental pulp and apical papilla cultured in both standard medium (control and primary group) and medium modified with ingredients that stimulate mineralization (experimental group).

Material and methods. Right after odontectomy the dental pulp and apical papilla were digested with dispase and collagenase type I. DPSCs and SCAPs were sorted using anti STRO-1, CD146, CD34, CD45 antibodies by means of the MACS method. Thereafter, the cells from the initial and control groups were cultured in a standard medium. The medium of the experimental group was additionally modified with ingredients that stimulated mineralization. To assess the cells commitment, the rate of proliferation and colony formation were examined.

Results. The analysis showed that SCAPs from all the examined groups proliferated faster and formed more numerous and larger colonies compared to DPSCs. Environmental stimulation reduced proliferation and the ability to form colonies in both the DPSCs and SCAPs lineages.

Conclusion. Faster proliferation and a higher ability to form colonies indicates the lower commitment of SCAPs compared to DPSCs. Additionally, the slower proliferation of stem cells from the experimental group suggests their more advanced commitment and differentiation. Although the SCAPs and DPSCs present different degrees of maturation, both cell lineages seem to be promising sources of stem cells.

Key words: stem cells, dental pulp, DPSC, apical papilla, SCAP.

Wstęp

Rozwój inżynierii genetycznej z wykorzystaniem komórek macierzystych otworzył możliwość regeneracji wielu tkanek, co skutkuje szybkim rozwojem medycyny regeneracyjnej w wielu specjalnościach medycznych [1]. Komórki wykorzystywane w zabiegach regeneracyjnych definiuje się jako posiadające cechy komórek macierzystych (SC), w tym zdolność samoodnawiania oraz możliwość różnicowania w kierunku wyspecjalizowanych tkanek np. tłuszczowej, kostnej, chrzęstnej lub nerwowej [2, 3, 4, 5, 6]. Cechę różnicowania w kierunku co najmniej czterech linii komórkowych określa się jako charakter multipotencjalny [2, 3, 4, 5, 6]. Dodatkowo, podczas hodowli *in vitro* SC są zdolne do proliferacji ponad limit Hayflicka [7]. W warunkach fizjologicznych głównym zadaniem komórek macierzystych jest utrzymanie homeostazy oraz zapewnienie rezerwuaru komórkowego dla rozwoju oraz regeneracji tkanki w przypadku jej uszkodzenia.

Jako pierwsze mezenchymalne komórki macierzyste wyizolowano komórki pochodzące ze szpiku kostnego (BMSC) [8, 9, 10]. Specyficzną cechą wyróżniającą te komórki jest ich heterogenność, co oznacza, że jedynie niewielka ilość komórek danej populacji posiada cechy komórek macierzystych [11]. Przyjęto, że kierunek rozwoju BMSC zależy od stopnia ich zróżnicowania w momencie izolacji oraz wpływu środowiska, w którym wyizolowane komórki są hodowane [11]. Ze względu na obciążający dla pacjenta charakter zabiegu pozyskiwania BMSC ze szpiku kostnego, podjęto próby izolacji komórek macierzystych pochodzenia mezenchymalnego (MSC) z innych, łatwiej dostępnych źródeł [12, 13, 14]. W badaniach ostatniej dekady potwierdzono obecność MSC także w miazdze zęba [15] oraz brodawce wierzchołkowej [16] zlokalizowanej na szczycie nieuformowanych korzeni trzecich zębów trzonowych [17].

Pomimo, że kość oraz zębina posiadają zbliżony skład białek organicznej macierzy, to struktura tkankowa jaką tworzą jest znacząco różna. Istotną cechą różnicującą BMSC oraz DPSC jest zdolność obu linii komórkowych do tworzenia odpowiednio struktury kość/szypik oraz kompleksu zębina/miazga [18, 19]. Skrupulatnie prowadzone badania porównawcze wykazały, iż DPSC charakteryzują się wyższym potencjałem wzrostowym i proliferacyjnym w porównaniu z BMSC [19]. Wiąże się to ze zwiększonym wydzielaniem przez komórki DPSC specyficznych mediatorów cyklu komórkowego CDK-6 i IGF [19, 24]. Pozyskane wyniki sugerują możliwość podjęcia prób wykorzystania komórek DPSC do regeneracji tkanek o mezenchymalnym rodowodzie, w tym zębiny i kości [19].

Komórki macierzyste miazgi zęba (DPSC) zostały jako pierwsze opisane przez Gronthosa i wsp. [19]. W swoich badaniach autorzy wykazali zdolności multipotencjalne oraz samoodnawiające komórek DPSC, oraz zdolność regeneracji

przez DPSC kompleksu miazga-zębina, w którym to kompleksie potwierdzono ekspresję sialofosfoproteiny zębiny (DSPP) jedyne go specyficznego markera zębiny [15].

Podobnie, jak to miało miejsce w przypadku analizy DPSC, badania komórek pochodzących z brodawki wierzchołkowej (SCAP) wykazały, że również te komórki posiadają zdolność do różnicowania w kierunku funkcjonalnych odontoblastów [20]. Wynik uzyskano na modelu zwierzęcym, w którym po ośmiu tygodniach od implantacji komórek SCAP podskórnie myszom poddanym immunosupresji doszło do ektopowego wytworzenia zębiny, wykazującej ekspresję genu *DSPP* [19]. Obraz histologiczny powstałej zębiny był analogiczny do powstałej z udziałem DPSC. Jednocześnie badania porównawcze przeprowadzane na tych samych myszach immunosupresyjnych wskazały na znacząco większy potencjał regeneracyjny komórek pochodzących z brodawki wierzchołkowej w porównaniu z komórkami izolowanymi z miazgi zęba [21]. Dla potwierdzenia funkcji jaką pełnią komórki formujące brodkę wierzchołkową rozwijającego się zawiązka zęba, przeprowadzono doświadczenie, w którym na etapie wczesnego rozwoju korzenia zęba trzonowego, chirurgicznie odcięto brodkę wierzchołkową z zachowaniem funkcjonalnej miazgi kanałowej [20]. W efekcie odcięcia brodawki doszło do całkowitego zatrzymania rozwoju korzenia zęba, gdyż odontoblasty rezydujące w miazdze kanałowej samodzielnie nie podjęły funkcji dalszego tworzenia zębiny korzeniowej [20]. Doświadczenie to jednoznacznie wskazało na dominujący wpływ komórek SCAP na rozwój zębiny korzeniowej i wzrost korzenia zęba i jednocześnie potwierdza dominujący wpływ sygnalizacji pochodzenia mezenchymalnego na tym etapie morfogenezy korzenia zęba [20]. Ostatecznie multipotencjalny charakter obu linii komórkowych potwierdzono nie tylko przez zdolność różnicowania DPSC oraz SCAP w kierunku funkcjonalnych odontoblastów, ale także adipocytów, wybarwianych czerwienią olejową oraz neurocytów wykazujących ekspresję markerów GFAP i nestyny [15, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27]. Istotną zaletą komórek macierzystych pozyskiwanych z miazgi zęba oraz brodawki wierzchołkowej jest relatywnie łatwa dostępność kliniczna. Do celów badawczych komórki obu linii komórkowych ekstrahuje się z niewyrzniętych trzecich zębów trzonowych, których początek rozwoju określa się na około 6. rok życia, co pozwala wnioskować, że zarówno pozyskiwane DPSC jak i SCAP znajdują się w stosunkowo wczesnej fazie różnicowania komórkowego [19].

Intensywna analiza molekularna komórek izolowanych z miazgi zęba oraz brodawki wierzchołkowej pozwala wnioskować, że zarówno niezróżnicowane komórki DPSC jak i SCAP zlokalizowane są w okolicach nisz okołonaczyniowych [28]. Obecność na powierzchni komórek pochodzą-

cych z obu źródeł epitopów STRO-1 oraz CD146 potwierdza nie tylko mezenchymalny rodowód komórek [15, 19, 20, 21, 28], ale również ich pierwotną lokalizację, gdyż antygen STRO-1 prezentują komórki w ścianach dużych naczyń krwionośnych oraz naczyń miazgi zęba [28], natomiast epitop CD146 komórki lokalizujące w mikrounaczynieniu miazgi [21, 28].

Uzasadnienie i cel pracy

Pomimo złożonej struktury anatomiczno-morfologicznej zapewniającej zębom twardość i wytrzymałość, uszkodzenia mechaniczne oraz bakteryjne prowadzą do nieodwracalnej utraty tkanek zęba, stąd wyzwania medycyny regeneracyjnej dotyczą również zabiegów stomatologicznych. Obiecującą drogą odbudowy zarówno braków zębowych jak i ubytków w obrębie tkanek zęba wydaje się bioinżynieria angażująca komórki macierzyste pochodzenia zębowego. Niektóre badania wykazały, że komórki DPSC mogłyby zostać wykorzystane do wytworzenia kompleksu miazga-zębina [30]. Jednak zanim to nastąpi kluczowym wydaje się skrupulatne poznanie mechanizmów wzrostu oraz różnicowania komórek macierzystych rezydujących w miazdze zęba oraz brodawce wierzchołkowej z uwzględnieniem ich potencjału proliferacyjnego oraz proodontoblastycznego. Skrupulatna analiza publikacji dotyczących porównania potencjału komórek macierzystych pochodzących z miazgi ludzkiego zęba (DPSC) *versus* komórki z brodawki wierzchołkowej (SCAP) wykazała całkowity brak doniesień odnoszących się do komórek izolowanych z tego samego zęba [4, 14]. Ponieważ dotychczasowe doniesienia uwzględniały jedynie analizę porównawczą populacji obu linii komórkowych, celem niniejszej pracy było bezpośrednie porównanie *in vitro* zdolności proliferacyjnych oraz zdolności tworzenia kolonii przez komórki DPSC oraz SCAP pochodzące z tego samego zęba i hodowane zarówno w środowisku stymulującym mineralizację, jak i w warunkach standardowych.

Materiał i metody

Komórki macierzyste izolowano z miazgi zęba (DPSC) oraz brodawki wierzchołkowej (SCAP) niewyrzniętych zębów ósmych. Komórki pochodziły z tego samego zęba (w sumie 9 zębów), a ich hodowla prowadzona była równolegle w sposób pozwalający na analizę porównawczą komórek DPSC oraz SCAP pochodzących od pojedynczego pacjenta. Hodowlę prowadzono w trzech niezależnych doświadczeniach, co oznacza, że równolegle prowadzono trzy hodowle komórek DPSC oraz trzy hodowle komórek SCAP, przy czym jednej hodowli komórek DPSC odpowiadała jedna hodowla komórek SCAP. W celu uzyskania populacji komórek o mezenchymalnym fenotypie oraz eliminacji leukocytów i komórek hematopoetycznych, komórki DPSC i SCAP poddano selek-

cji na obecność epitopów STRO-1, CD146, CD34 i CD45. Następnie, komórki hodowano w pożywce standardowej (grupa wyjściowa i kontrolna) oraz w pożywce stymulującej mineralizację (grupa doświadczalna). Zaplanowano przeprowadzenie analizy potencjału proliferacji badanych komórek metodą WST-1 oraz zdolności formowania kolonii (CFU-F) dla grupy wyjściowej w 5 pasażu hodowli, natomiast dla grup doświadczalnej i kontrolnej po 6 tygodniach hodowli prowadzonej nieprzerwanie w określonych warunkach.

Pozyskiwanie miazgi zęba i brodawki wierzchołkowej

Materiał do badań pozyskiwano z niewyrzniętych trzecich zębów trzonowych. Pierwotnie uzyskano materiał badawczy od 9 osób tak, że równoległa hodowla komórek DPSC oraz SCAP była możliwa w 3 powtórzeniach. Materiał badawczy stanowiły miazga zęba oraz brodawka wierzchołkowa pobrana od pacjentów obojga płci, w przedziale wiekowym 16–20 lat (średnia wieku 18,3 lat). Po usunięciu zęba drogą odontektomii, skalpelem odcinano brodawkę wierzchołkową, a z powierzchni korzenia usuwano pozostałości włókien ozębnej. Kolejno, ząb dwukrotnie przemywano 70% etanolem oraz pięciokrotnie płukano w roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS). Następnie, tarczą diamentową z chłodzeniem solą fizjologiczną ząb przecinano w płaszczyźnie poprzecznej wzdłuż granicy szkliwno-cementowej i wyłuszczano miazgę komorową. Zarówno miazgę jak i brodawkę wierzchołkową w warunkach sterylnych przenoszono do standardowej pożywki α MEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Pozyskiwanie komórek DPSC oraz SCAP

Miazgę zęba oraz brodawkę wierzchołkową rozdrabniano przy użyciu skalpela, a następnie trawiono roztworem dyspazy (4 mg/ml) i kolagenazy typu I (3 mg/ml) przez 45 minut w temperaturze 37°C. Po okresie trawienia całość odwirowywano (10 min \times 1200 rpm), a następnie przesączało przez filtr o średnicy porów 70 μ m (Milipore). W ten sposób eliminowano niestrawione tkanki oraz uzyskano hodowlę 1-warstwową. Komórki wysiewano do butelek z pożywką hodowlaną α MEM uzupełnioną surowicą bydlęcą (15%) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 2% L-glutaminą (Invitrogen) oraz 100 U/ml penicyliny i 100 mg/ml streptomycyny (Invitrogen).

W celu pozyskania do dalszych doświadczeń homogennej hodowli komórek mezenchymalnych (STRO-1+; CD146+) oraz w celu eliminacji leukocytów oraz komórek hematopoetycznych (CD34+; CD45+) przed rozpoczęciem właściwego doświadczenia komórki DPSC oraz SCAP poddano selekcji z wykorzystaniem przeciwciał anty STRO-1, CD146, CD34, CD45 (R&D Systems Inc., USA) przy użyciu metody MACS (Magnetic Acti-

vated Cell Sorting) oraz magnetycznego separatora (MagCelect Magnet, R&D Systems Inc., USA). Komórki poddano sortowaniu pozytywnemu na obecność receptorów STRO-1, CD146 oraz sortowaniu negatywnemu z wykorzystaniem receptorów CD34 i CD45 [8, 9, 19, 28, 33]. Następnie komórki zrywano z podłoża z użyciem 0,25% trypsyny po uprzednim odsączeniu pożywki i 2-krotnym płukaniu roztworem PBS. Kolejno, komórki wirowano przez 3 minuty \times 1200 rpm i zawieszano w ilości 1×10^6 komórek w 1 ml buforu reakcyjnego (2 mM EDTA + 0,5% BSA + PBS). Segregację pozytywną przeprowadzono w dwóch etapach, najpierw na obecność receptorów STRO-1, a następnie CD146. Procedurę sortowania negatywnego prowadzono jednocześnie na obecność obu epitopów CD34 i CD45.

W celu sortowania pozytywnego do zawiesiny komórek w buforze reakcyjnym wprowadzono przeciwciała anti-STRO-1 i/lub anti-CD146 w stężeniu $1 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ komórek, a następnie inkubowano 15 min. w temperaturze 2–8°C. Kolejno dodawano 100 μl ferrofluidu (MagCelect Goat Anti-Mouse IgG Ferrofluid, R&D Systems Inc., USA) sprzężonego z przeciwciałem przeciwko mysiemu IgG (R&D Systems Inc., USA) i inkubowano w tych samych parametrach. W końcowej fazie inkubacji komórki przenoszono do 50 ml saszetki, płukano w 15 ml mieszaniny reakcyjnej i wirowano 8 min. \times 300 g. Po zebraniu supernatantu i rozpuszczeniu komórek w 2 ml buforu reakcyjnego, prowadzono 6-minutową inkubację w temperaturze pokojowej w magnetycznym separatorze. Po odessaniu supernatantu komórki związane z ferrofluidem o fenotypie STRO-1(+) lub CD146(+) dwukrotnie płukano w PBS, a następnie wysiewano do pożywki.

Sorting negatywny był przeprowadzany jednocześnie dla receptorów CD34 i CD45. Po 1 μg przeciwciał przeciwko ludzkiemu receptorowi błonowemu CD34 i CD45 dodawano do 1×10^6 komórek pozyskanych z poprzedniego sortingu pozytywnego. Komórki zawieszano w buforze reakcyjnym, a następnie inkubowano 15 min. w temp. 2–8°C. Kolejno zawiesinę uzupełniono o 125 μl ferrofluidu sprzężonego z przeciwciałem przeciwko mysiemu IgG i ponownie inkubowano w tych samych warunkach. W końcowym okresie inkubacji zawiesinę uzupełniono buforem reakcyjnym do objętości 2 ml i umieszczano w separatorze magnetycznym na 6 minut w temperaturze pokojowej. Zawieszono w supernatancie komórki STRO-1(+), CD146(+), CD34(-) i CD45(-) stanowiły materiał do dalszych doświadczeń i analizy. Sorting wykonano czterokrotnie, a pozyskane komórki stanowiły materiał badawczy do czterech niezależnie powtarzanych doświadczeń.

Ostatecznie komórki grupy kontrolnej hodowano w pożywce standardowej α MEM uzupełnionej 15% surowicą bydlęcą, 2% L-glutaminą oraz 100 U/ml penicyliny i 100 mg/ml streptomycyny [33,

35]. Pożywkę grupy doświadczalnej dodatkowo wzbogacono składnikami stymulującymi mineralizację. 10 nM deksametazon dodano w celu stymulowania proliferacji, 10 mM β -glicerofosforan w celu stymulowania mineralizacji, natomiast 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kwas L-askorbinowy miał na celu stymulację tworzenia macierzy zewnątrzkomórkowej [19, 20, 25, 36]. Pożywkę zmieniano co 3 dni, każdorazowo dwukrotnie płuczając komórki w PBS. Inkubację komórek prowadzono w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO_2 . Po osiągnięciu przez komórki 80% konfluencji, hodowlę komórkową zrywano z podłoża z użyciem 0,25% trypsyny (Invitrogen), a następnie rozsiewano do kolejnych butelek. Doświadczenie zaplanowano na 6 tygodni prowadzenia nieprzerwanej hodowli. Po 6 tygodniach obserwacji porównano potencjał proliferacyjny i zdolność tworzenia kolonii grupy kontrolnej i doświadczalnej względem siebie oraz w stosunku do grupy wyjściowej z początku doświadczenia (pasaż 5). Zaplanowane doświadczenia przeprowadzono 3-krotnie, a wyniki uśredniono z trzech niezależnych powtórzeń.

Ocena potencjału proliferacyjnego komórek DPSC oraz SCAP

Potencjał proliferacyjny badano w grupie wyjściowej na początku doświadczenia oraz w grupie kontrolnej i doświadczalnej po 6 tygodniach hodowli.

Do oceny ilościowej potencjału proliferacji użyto zestawu Quick Cell Proliferation Assay Kit (Bio-Vision, Mountain View, CA, USA), który oparty jest na pomiarze szybkości katalizowanej przez dehydrogenazę mitochondrialną redukcji soli tetrazolowej do formazanu (WST-1). Enzym dehydrogenaza mitochondrialna znajduje się w błonie wewnętrznej mitochondrium i katalizuje reakcję kompleksu łańcucha oddechowego, polegającą na transporcie jonów wodorowych z NADH (Dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy) do ubichinonu (CoQ). Prowadzi to do powstania ubichinolu (CoQH₂) [34], a cała reakcja rozpoczyna cykl oddechowy. Ponieważ jedynie żywe komórki o niezaburzonym metabolizmie wykazują aktywność dehydrogenazy mitochondrialnej, to zwiększenie liczby komórek bezpośrednio przekłada się na wzrost aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej i w konsekwencji zwiększenie ilości wytworzonego formazanu. Zastosowany zestaw cechuje się wyższą czułością niż tradycyjne metody MTT.

Do doświadczenia użyto 96-studzienkową płytkę. Komórki w liczbie 1×10^4 zawieszono w 90 μl pożywki i poddano 24-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO_2 . Następnie do każdej studzienki wprowadzono 10 μl WST-1, otrzymując 100 μl roztworu łącznie. Wykonano próbę ślepą, mieszając 10 μl WST-1 i 90 μl pożywki. Tak przygotowaną płytkę inkubowano przez 4 godziny w warunkach standardowych. Po inkubacji w spektrofotometrze (Victor3, Perkin Elmer)

zmierzone poziom absorpcji światła przy długości fali 450 nm. Eksperyment niezależnie przeprowadzono 3-krotnie w trzech powtórzeniach.

Analiza statystyczna

Dla oceny istotności różnic pomiędzy średnimi wynikami w doświadczeniach wykorzystano test t-Studenta. Istotność statystyczną przyjęto na poziomie $p < 0,05$.

Badanie zdolności formowania kolonii (CFU-F, colony forming unit-fibroblast) komórek SCAP i DPSC

Komórki pochodzenia mezenchymalnego mają zdolność do tworzenia kolonii pochodzących z pojedynczej fibroblastopodobnej komórki (CFU-F). Jest to jedna z cech charakterystycznych tych komórek progenitorowych, która pośrednio może świadczyć o ich stopniu zróżnicowania i dojrzałości. Jednostka CFU-F powstaje po możliwie równomiernym rozprowadzeniu zawiesiny z komórkami w pożywce hodowlanej, tak aby każda komórka znalazła się w pewnym oddaleniu od siebie. Następnie poprzez rozmnażanie się pojedynczej komórki progenitorowej powstaje populacja, która w mikroskopie świetlnym tworzy charakterystyczny obraz „wiru”.

W obecnym doświadczeniu, zdolność formowania kolonii (CFU-F) przez komórki macierzyste SCAP i DPSC oceniono barwieniem *Giemsy*. Do butelek hodowlanych o objętości 25 ml wysiano po 5 ml pożywki z zawartością 1×10^5 komórek i inkubowano 2 godziny w warunkach standardowych (temp. 37°C , 5% CO_2). Kolejno hodowlę przepłukano 2-krotnie w PBS. Następnie do butelki grupy kontrolnej wprowadzono 5 ml pożywki standardowej αMEM , natomiast do butelki grupy doświadczalnej dodano 5 ml pożywki αMEM zmodyfikowanej składnikami stymulującymi mineralizację [19, 20, 25, 36]. Całość hodowano przez 14 dni w warunkach standardowych bez zmiany pożywki. Po 2-tygodniowej hodowli komórki barwio-

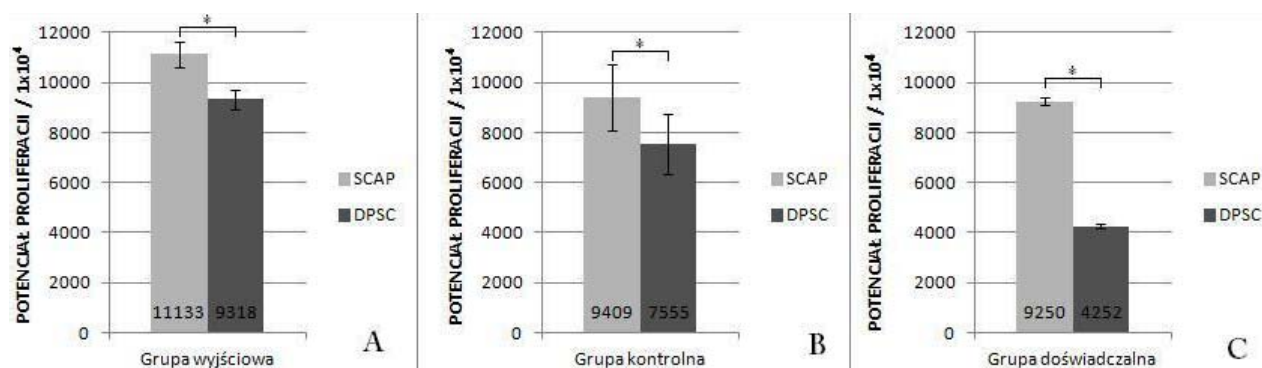
no metodą *Giemsy*. Z butelek hodowlanych odsączono pożywkę, płukano 2-krotnie w PBS i przez 20 minut utrwalano na lodzie w 70% etanolu. Następnie alkohol etylowy odsączano, a do hodowli wprowadzano 5 ml roztworu *Giemsy* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) na 20 minut. Kolejno po odsączeniu barwnika hodowlę 2-krotnie płukano wodą destylowaną i pozostawiono do wyschnięcia. Obraz komórek oceniono makroskopowo oraz w mikroskopie świetlnym w powiększeniu $\times 10$. Doświadczenie przeprowadzono 3-krotnie w trzech powtórzeniach.

Wyniki

Ocena potencjału proliferacyjnego komórek DPSC oraz SCAP

Zaobserwowano, iż komórki z grup wyjściowych (pasaż 5) obu linii komórkowych DPSC oraz SCAP ulegały szybszemu podziałowi aniżeli komórki pochodzące z analogicznych grup kontrolnych i doświadczalnych po 6 tygodniach hodowli. Po 24-godzinnej inkubacji przyrost liczby komórek SCAP w grupie wyjściowej wyniósł 11133 ($\pm 501,47$), a w analogicznej grupie komórek DPSC 9318 (± 381) (Rycina 1: A).

Po 6 tygodniach hodowli potencjał proliferacyjny komórek z grup kontrolnych obu linii komórkowych zmalał. W grupie komórek SCAP wyniósł 9409 (± 1299), a w analogicznej grupie komórek DPSC 7555 (± 1200) (Rycina 1: B). Jednocześnie stwierdzono, że pożywka stymulująca mineralizację zastosowana w grupach doświadczalnych w sposób istotny wpłynęła na zmniejszenie potencjału proliferacyjnego głównie w linii komórkowej DPSC. W grupie doświadczalnej DPSC zanotowano przyrost liczby komórek na poziomie 4252 (± 86). Stymulacja środowiska hodowlanego nie miała istotnego wpływu na szybkość podziału komórek w linii SCAP. W grupie doświadczalnej komórek SCAP odnotowano przyrost liczby komórek na poziomie 9250 ($\pm 154,8$) (Rycina 1: C).



Rycina 1. Ocena potencjału proliferacji komórek SCAP i DPSC z grup: A) wyjściowych (pasaż 5) oraz B) kontrolnych, C) doświadczalnych (po 6 tygodniach hodowli). Przedstawione wyniki są średnimi z trzech niezależnych doświadczeń \pm SD, $*P < 0,05$.

Figure 1. The proliferation rate of DPSCs and SCAP from the groups A) initial (passage 5); B) control, and C) experimental (after 6 weeks of cell culture). Mean \pm SD of 3 experiments. $*P < 0,05$.

Przeprowadzone badania wykazały, że komórki pochodzące z brodawki wierzchołkowej we wszystkich grupach badawczych (wyjściowej, kontrolnej oraz doświadczalnej) dzieliły się szybciej w porównaniu do analogicznych grup komórek izolowanych z miazgi zęba. Potencjał proliferacyjny grupy wyjściowej linii SCAP był najwyższym uzyskanym w całym doświadczeniu i wynosił 11133 ($\pm 501,47$) (Tabela 1).

Tabela 1. Tabela zbiorcza potencjałów proliferacji komórek SCAP i DPSC wszystkich badanych grup (wyjściowa, kontrolna, doświadczalna). Przedstawione wyniki są średnimi z trzech niezależnych doświadczeń \pm SD. * $P < 0,05$

Table 1. Picture of numerous clusters formed by SCAPs (A, C, E) (light microscope $\times 10$) and macroscopic picture (B, D, F). Giemsa staining. A, B: initial group; C, D: control group; E, F: experimental group

	SCAP	DPSC
Grupa wyjściowa	11133 ($\pm 501,47^*$)	9318 ($\pm 381^*$)
Grupa kontrolna	9409 ($\pm 1299^*$)	7555 ($\pm 1200^*$)
Grupa doświadczalna	9250 ($\pm 154,8^*$)	4252 ($\pm 86^*$)

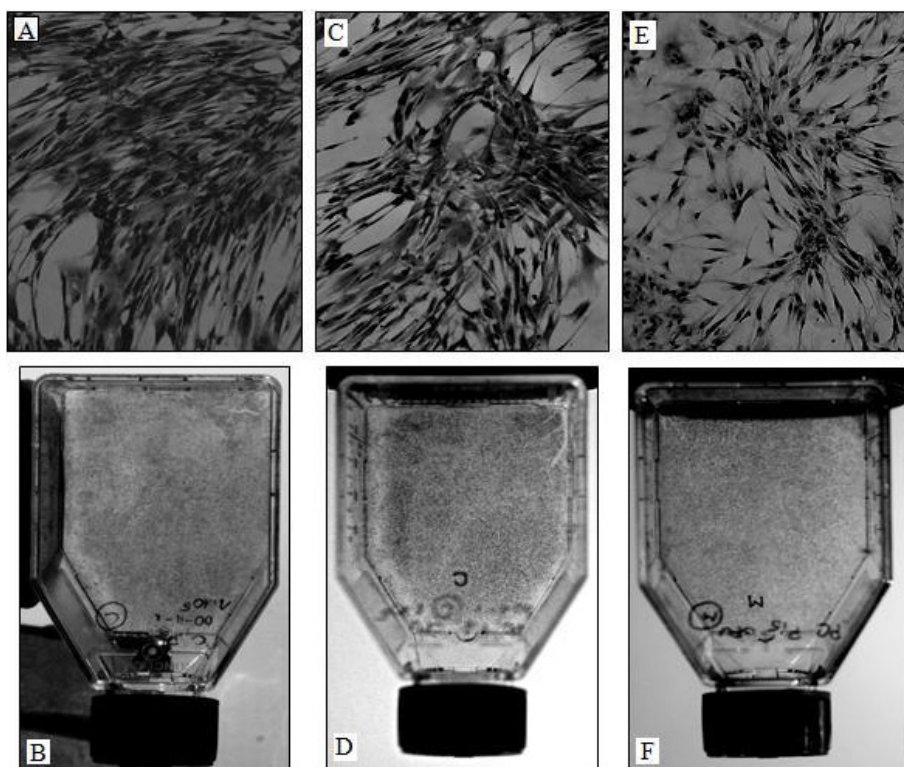
Wyniki oceny zdolności tworzenia kolonii (CFU-F) komórek macierzystych SCAP i DPSC

Barwienie metodą Giemsy wykazało, iż komórki DPSC i SCAP zdolne są do formowania kolonii

z pojedynczej komórki progenitorowej, co uwiarydliło się w postaci charakterystycznych „wirów” złożonych z tworzących się populacji. W grupie wyjściowej linii komórkowej SCAP stwierdzono największą ilość komórek progenitorowych w całym doświadczeniu, co skutkowało powstaniem największych i najliczniejszych kolonii (Rycina 2: A, B). Po 6-tygodniowej obserwacji odnotowano mniejszą ilość i wielkość kolonii zarówno w grupie kontrolnej (Rycina 2: C, D) jak i doświadczalnej (Rycina 2: E, F) komórek SCAP, jednak różnica pomiędzy tymi dwoma grupami była nieznaczna.

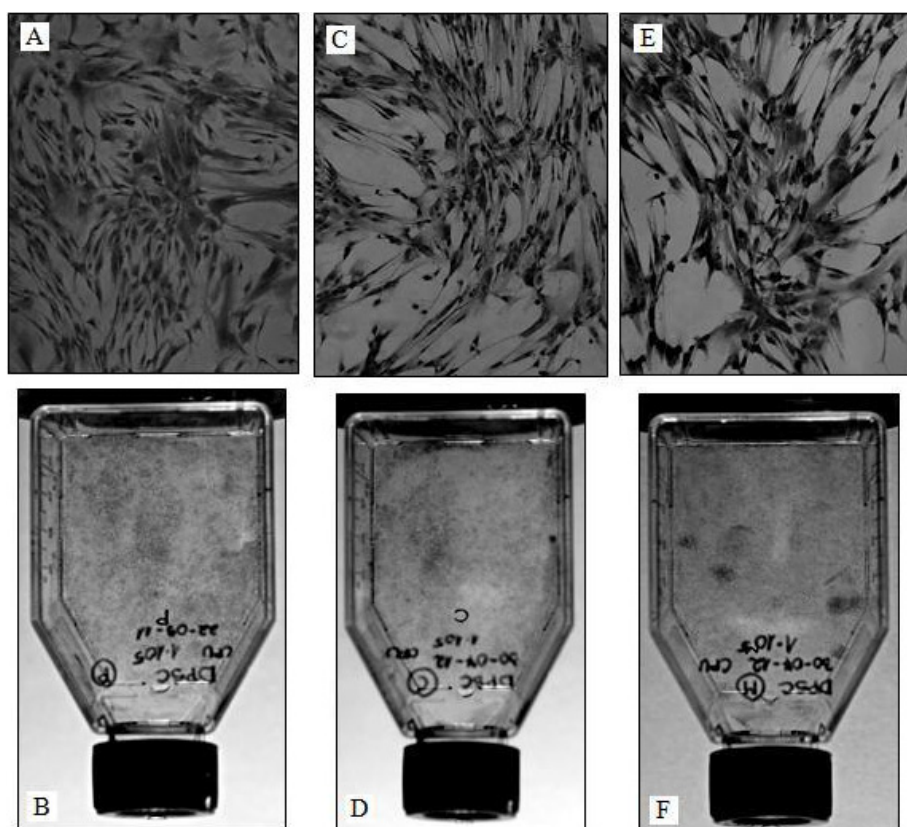
Podobną zależność zaobserwowano w linii komórkowej DPSC. W grupie wyjściowej komórek wyizolowanych z miazgi zęba (Rycina 3: A, B) wytworzone kolonie były większe i liczniejsze w porównaniu do grupy kontrolnej i doświadczalnej. Po 6 tygodniach hodowli grupa doświadczalna linii komórkowej DPSC (Rycina 3: E, F) także wykazywała spadek ilości i wielkości kolonii w stosunku do grupy kontrolnej (Rycina 3: C, D), przy czym dysproporcja w formowaniu kolonii pomiędzy tymi grupami była większa w porównaniu do komórek SCAP. W całym eksperymencie najmniejszą ilość kolonii stwierdzono w grupie doświadczalnej linii komórkowej DPSC.

Przeprowadzona analiza wykazała, że komórki SCAP formowały więcej kolonii w stosunku do komórek DPSC w analogicznych grupach badawczych (Tabela 2). Po 6-tygodniowej hodowli w ob-



Rycina 2. Obraz skupisk komórek SCAP tworzących charakterystyczne „wiry”: – mikroskopowy (A, C, E) (pow. $\times 10$) oraz – makroskopowy (B, D, F). Barwienie Giemsy. A, B: grupa wyjściowa; C, D: grupa kontrolna; E, F: grupa doświadczalna.

Figure 2. Picture of numerous clusters formed by SCAPs (A, C, E) (light microscope $\times 10$) and macroscopic picture (B, D, F). Giemsa staining. A, B: initial group; C, D: control group; E, F: experimental group.



Rycina 3. Obraz skupisk komórek DPSC tworzących charakterystyczne „wiry”: – mikroskopowy (A, C, E) (pow. $\times 10$) oraz – makroskopowy (B, D, F). Barwienie Giemsa. A, B: grupa wyjściowa; C, D: grupa kontrolna; E, F: grupa doświadczalna.

Figure 3. Picture of numerous clusters formed by DPSCs (A, C, E) (light microscope $\times 10$) and macroscopic picture (B, D, F). Giemsa staining. A, B: initial group; C, D: control group; E, F: experimental group.

razie makroskopowym linii komórkowej SCAP stwierdzono 85–90% konfluencję (Rycina 2: B, D, F), podczas gdy konfluencja hodowli komórek DPSC była niższa i wynosiła ok. 60% (Rycina 3: B, D, F).

Tabela 2. Podsumowanie wyników oceny zdolności formowania kolonii (CFU) przez komórki SCAP i DPSC. Grupę wyjściową stanowił pasaż 5, natomiast ocenę pozostałych grup dokonano po 6 tygodniach hodowli komórkowej

Table 2. Colony forming ability (CFU) of both SCAPs and DPSCs. The initial group form cells at 5th passage, whereas the control and experimental groups were assessed after 6 weeks of culture

	SCAP	DPSC
Grupa wyjściowa	++++	+++
Grupa kontrolna	+++	++
Grupa doświadczalna	++	+

Dyskusja

Wyzwaniem współczesnej stomatologii jest stworzenie takiego sposobu odbudowy utraconych tkanek zęba, który byłby zadawalający zarówno

pod względem funkcjonalnym jak i estetycznym. Możliwość wykorzystania komórek macierzystych pochodzenia zębowego w codziennej praktyce stomatologicznej, pomimo iż na dzień dzisiejszy jest dużym wyzwaniem, to jednocześnie wydaje się być sposobem leczenia najbardziej zbliżonym do warunków fizjologicznych. Aby jednak zrealizować ten cel niezbędne jest skrupulatne poznanie mechanizmów sterujących rozwojem i różnicowaniem komórek pochodzących z miazgi ludzkiego zęba oraz brodawki wierzchołkowej, które stanowią sprawdzone źródło pozyskiwania komórek macierzystych [16, 19].

Użyte w naszym doświadczeniu komórki progenitorowe o fenotypie STRO-1(+), CD146(+), CD34(-), CD45(-), wyizolowane z miazgi i brodawki wierzchołkowej niewyrzniętych trzecich zębów trzonowych, należą do komórek macierzystych, których multipotencjalny charakter potwierdzono zdolnością do samoodnawiania, tworzenia kolonii i różnicowania w kierunku licznych linii komórkowych, w tym osteoblastów, adipocytów, neurocytów oraz funkcjonalnych odontoblastów [15, 19, 31]. Analiza zdolności proliferacyjnych komórek DPSC i SCAP wykazała różny potencjał proliferacyjny obu linii komórkowych, co w naszym przekonaniu wynika z różnej dojrzałości omawianych

grup komórkowych. Pozyskane wyniki potwierdzają przypuszczenie, że rezydujące w miazdze zęba odontoblasty, wykształcone w okresie odontogenezy, tracą swoją aktywność po całkowitym uformowaniu zębiny pierwotnej, co stwarza konieczność zastąpienia ich przez nowe komórki odontoblastopodobne zdolne do produkcji zębiny wtórnej i reparacyjnej. Nasze badania są zgodne z uzyskanymi przez innych autorów i wskazują, iż te nowo wyróżnicowane komórki odontoblastopodobne pochodzą z nisz okołonaczyniowych miazgi zębów, stanowiących rezerwuar komórek progenitorowych [28]. Nieco inną rolę pełnią komórki progenitorowe pochodzące z brodawki wierzchołkowej, które są źródłem pierwotnych odontoblastów odpowiedzialnych za wytwarzanie pierwotnej zębiny korzeniowej [17]. Szybkość odkładania zębiny wtórnej i reparacyjnej *versus* pierwotnej zębiny korzeniowej wymaga ekspresji różnych genów oraz uruchomienia odmiennych ścieżek sygnalizacyjnych skutkujących różnym nasileniem procesów metabolicznych w komórkach odpowiedzialnych za odkładanie obu rodzajów zębiny. Zatem nieco odmienne funkcje komórek pochodzących z miazgi zęba po zakończonym okresie morfogenezy oraz komórek brodawki wierzchołkowej w okresie tworzenia korzenia zęba sugerują, że obie linie komórkowe prezentują różny stopień dojrzałości, co w konsekwencji bezpośrednio przekłada się na szybkość proliferacji oraz zdolność tworzenia kolonii z pojedynczej fibroblastopodobnej komórki [20, 21]. Te obserwacje dodatkowo potwierdza nasze doświadczenie polegające na hodowli komórek SCAP i DPSC w warunkach stymulacji promienalizacyjnej środowiska hodowlanego. Dokonane pomiary jednoznacznie wykazały, że stymulowanie dojrzewania komórek przyczyniało się do spadku potencjału proliferacji oraz zdolności tworzenia kolonii w grupach doświadczalnych z obu linii komórkowych w porównaniu z grupami kontrolnymi. Do podobnych wniosków w swoich badaniach doszli Suchanek i wsp. [37]. Ostatecznie potwierdzono, że najwyższy potencjał proliferacyjny miały komórki na początku doświadczenia, co jest zgodne z obserwacjami innych badaczy [19, 20, 21, 32].

Niezwykle intrygujące wydają się wyniki uzyskane w grupie komórek pochodzących z brodawki wierzchołkowej, w których szybkość proliferacji grup kontrolnej oraz stymulowanej nie wykazała istotnej różnicy, a jedynie komórki stymulowane dzieliły się minimalnie wolniej. Obserwacja ta potwierdza jednoznacznie, iż komórki pochodzące z brodawki wierzchołkowej wyjściowo prezentują znacząco niższy stopień dojrzałości w porównaniu z komórkami z miazgi zęba i sześciotygodniowa stymulacja środowiskowa nie jest wystarczająca do wyrównania aktywności metabolicznej komórek SCAP do poziomu prezentowanego przez komórki DPSC, a tym samym procesy proliferacyj-

ne dominują nad dojrzewaniem komórkowym. Jednocześnie nasuwa się wniosek, że komórki z brodawki wierzchołkowej stanowią bardziej „plastyczny” rezerwuar komórek progenitorowych dla odontoblastów.

Wnioski pochodzące z badań potencjału proliferacji komórek DPSC oraz SCAP są zgodne z danymi uzyskanymi w doświadczeniu mającemu wykazać dojrzałość komórkową poprzez badanie zdolności tworzenia kolonii (CFU). Duża zdolność tworzenia kolonii z jednej fibroblastopodobnej komórki jest cechą specyficzną dla komórek niedojrzałych [8]. W naszych badaniach komórki pochodzące z brodawki wierzchołkowej tworzyły bardzo liczne kolonie widoczne w postaci „wirów”. Jednocześnie wysoki poziom proliferacji tych komórek sprawiał, iż obserwowane hodowle były prawie całkowicie konfluentne. W tym samym okresie obserwacji komórki DPSC formowały mniejszą ilość dobrze odgraniczonych kolonii przy istotnie mniejszej konfluencji. Po wprowadzeniu w grupach doświadczalnych pożywki stymulującej mineralizację odnotowano znaczny spadek ilości tworzących się kolonii w obu liniach komórkowych, przy czym liczba skupisk komórek i konfluencja była niższa w komórkach wyizolowanych z miazgi zęba w porównaniu z komórkami z brodawki wierzchołkowej. Podobne obserwacje poczynił Sonoyama i wsp. którzy zaobserwowali, iż komórki z brodawki wierzchołkowej mają wyższy potencjał samoodnowy i większą zdolność tworzenia kolonii w stosunku do komórek DPSC [20, 21]. Jednak istotna różnica wyników pozyskanych w naszym doświadczeniu polega na obserwacji dwóch linii komórkowych pochodzących z jednego zęba, co w naszym przekonaniu pozwala na bardziej precyzyjną ocenę porównawczą. Dodatkowo, wspomniani autorzy sugerowali również, iż różny potencjał proliferacji DPSC *versus* SCAP może wynikać z mniejszej średnicy komórek SCAP w porównaniu do DPSC, co miałoby umożliwiać większej ilości mniejszych komórek SCAP wzrost na tej samej przestrzeni hodowlanej [20, 21]. Test CFU oraz poziom potencjału proliferacji wykorzystali też inni autorzy do oceny komórek progenitorowych wyizolowanych z miazgi ludzkich zębów mlecznych i stałych [38]. Podobnie jak to miało miejsce w naszych badaniach autorzy ci zaobserwowali większą ilość tworzących się kolonii na początku doświadczenia w stosunku do końca obserwacji oraz znaczny spadek proliferacji w grupach komórek poddanych stymulacji promienalizacyjnej [38]. Dowodzi to, że wyższy stopień zróżnicowania komórek przekłada się bezpośrednio na spadek zdolności formowania kolonii.

Bieżące doświadczenie pozwala wysnuć wniosek, iż komórki macierzyste z miazgi ludzkiego zęba oraz brodawki wierzchołkowej, pozyskane z tego samego niewyrzniętego zęba mądrości, wykazują znacząco różny potencjał proliferacyjny oraz zdolność tworzenia kolonii, na korzyść

komórek SCAP. Wskazuje to, iż komórki pochodzące z brodawki wierzchołkowej są bardziej plastycznym rezerwuarem komórek macierzystych i zachowują bardziej pierwotny charakter zarówno w warunkach hodowli standardowej, jak i stymulowanej przez czynniki promineralizacyjne.

Szeroki zakres badań prowadzonych na komórkach progenitorowych wyizolowanych z tkanek zęba przybliżył nas do przełomu w inżynierii tkankowej i materiałoznawstwie, dzięki któremu możliwa będzie sterowana regeneracja tkanek w praktyce stomatologicznej, podobnie jak ma to miejsce w ortopedii. Pozwala to mieć nadzieję, że uzupełnienie utraconych tkanek zęba przy wykorzystaniu zębopochodnych komórek progenitorowych, które rozwiną się w poszczególne tkanki zęba, stanie się złotym standardem leczenia stomatologicznego w przyszłości. W ocenie autorów istnieje zatem potrzeba nie tylko kontynuacji, ale również intensyfikacji badań komórek macierzystych izolowanych ze struktur zęba.

Piśmiennictwo

- [1] Kadar K., Kiraly M., Porcsalmy B., Molnar B., Racz G.Z., Blazsek J., Kallo K., Szabo E.L., Gera I., Gerber G., Varga G. Differentiation potential of stem cells from human dental origin – promise for tissue engineering. *J Physiol Pharmacol.* 2009;60(Supl. 7):167–75.
- [2] Lohberger B., Payer M., Rinner B., Kaltenecker H., Wolf E., Schallmoser K., Strunk D., Jakse N. Tri – lineage potential of intraoral tissue – derived mesenchymal stromal cells. *J Craniomaxillofac Surg.* 2013;41(2):110–118.
- [3] Sprio A.E., Di Scipio F., Raimondo S., Salamone P., Pagliari F., Pagliari S., Folino A., Berta G.N. Self – renewal and multipotency coexist in a long – term cultured adult rat dental pulp stem cells line: An exception to the rule? *Stem Cells Dev.* 2012;21(18):3278–3288.
- [4] Tamaki Y., Nakahara T., Ishikawa H., Sato S. In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow. *Odontology.* 2013;10.1007/s10266–012–0075–0.
- [5] Kopen G.C., Prockop D.J., Phinney D.G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:10711.
- [6] Muraglia A., Cancedda R., Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci.* 2000; 113(Pt. 7):1161.
- [7] Minguel J.J., Erices A., Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med.* 2001;226:507–20.
- [8] Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Gehron Robey P. Bone marrow stromal cells: nature, biology and potential application. *Stem Cells.* 2001;19:180–192.
- [9] Gronthos S., Zanetti A.C., Hay S.J., Shi S., Graves S.E., Kortjesids A., Simmons P.J. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci.* 2003;116:1827–1835.
- [10] Undale A.H., Westendorf J.J., Yaszemski M.J., Khosla S. Mesenchymal stem cells for bone repair and metabolic bone diseases. *Mayo Clin Proc.* 2009;84(10):893–902.
- [11] Kolf C.M., Cho E., Tuan R.S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(1):204–214.
- [12] Grove J.E., Bruscia E., Krause D.S. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells.* 2004;22:487–500.
- [13] Sedgley C.M., Botero T.M. Dental stem cells and their sources. *Dent Clin North Am.* 2012;56:549–561.
- [14] Akiyama K., Chen C., Gronthos S., Shi S. Lineage differentiation of mesenchymal stem cells from dental pulp, apical papilla and periodontal ligament. *Methods Mol Biol.* 2012;887:111–121.
- [15] Gronthos S., Brahim J., Li W., Fisher L.W., Cherman N., Boyde A., DenBesten P., Gehron Robey P., Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002;81:531–535.
- [16] Miura M., Gronthos S., Zhao M., Lu B., Fisher L.W., Robey P.G., Shi S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(10): 5807–5812.
- [17] Huang G.T., Sonoyama W., Liu Y., Liu H., Wang S., Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod.* 2008;34(6):645–651.
- [18] Krebsbach P.H., Kuznetsov S.A., Satomura K., Emmons R.V., Rowe D.W., Robey P.G. Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation.* 1997;63:1059–1069.
- [19] Gronthos S., Mankani M., Brahim J., Robey P.G., Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:13625–13630.
- [20] Sonoyama W., Liu Y., Yamaza T., Tuan R.S., Wang S., Shi S., Huang G.T. Characterization of apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth – a pilot study. *Journal of Endodontics.* 2008;34:166–171.
- [21] Sonoyama W., Liu Y., Fanf D. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in Swine. 2006;1(1):e79. DOI:10.1371/journal.pone.0000079.
- [22] Abey S., Yamaguchi S., Amagasa T. Multilineage cells from apical pulp of human tooth with immature apex. *Oral Science International.* 2007;4:45–58.
- [23] Huang G.T., Gronthos S., Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 2009;88:792–806.
- [24] Karaoz E., Dogan B., Aksoy A., Gacar A., Akyuz S., Genc Z., Yuruker S., Duruksu G., Demircan P., Sariboyaci A. Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochemistry and Cell Biology.* 2010;133:95–112.
- [25] Kadar K., Kiraly M., Porcsalmy B., Molnar B., Racz G.Z., Blazsek J., Kallo K., Szabo E.L., Gera I., Gerber G., Varga G. *Journal of Physiology and Pharmacology.* 2009;60:167–175.
- [26] Wang S., Mu J., Fan Z., Yu Y., Yan M., Lei G., Tang C., Wang Z., Zheng Y., Yu J., Zhang G. Insuline-like growth factor 1 can promote the osteogenic differentiation and osteogenesis of stem cells from apical papilla. *Stem Cells Research.* 2012;8:346–356.
- [27] Petrovic V., Stefanovic V. Dental tissue – new source for stem cells. *The Scientific World Journal.* 2009;9:1167–1177.
- [28] Shi S., Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2003;18(4):696–704.
- [29] Gotlieb E.L., Murray P.E., Namerow K.N., Kuttler S., Garcia-Godoy F. An ultrastructural investigation of tissue-engineered pulp constructs implanted within endodontically treated teeth. *JADA.* 2008;139:457–465.
- [30] Yu J., Deng Z., Shi J., Zhai H., Nie X., Zhuang H., Li Y., Jin Y. Differentiation of dental pulp cells into regular-shaped dentin pulp complex induced by tooth germ cell conditioned medium. *Tissue Eng.* 2006;11:3097–3105.
- [31] Batouli S., Miura M., Brahim J., Tsutsui T.W., Fisher L.W., Gronthos S., Robey G. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *Journal of Dental Research.* 2003;82:976–981.
- [32] Bakopoulou A., Leyhausen G., Volk J., Tsiftoglou A., Garefis P., Koidis P., Geurtsen W. Comparative analysis

- of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAPs). *Archives of Oral Biology*. 2011;56:709–721.
- [33] Maciejewska I. Wpływ zmian ekspresji genu *TWIST1* i czynnika transkrypcyjnego E2A na różnicowanie i rozwój komórek macierzystych z ludzkich zębów mlecznych i stałych oraz zawiązków zębów myszy. *Annales Academiae Medicae Gedanensis*. 2009;29(Supl. 4).
- [34] Fuller G.M., Shields D.: Podstawy molekularne biologii komórki. Aspekty Medyczne, Wydanie I. Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 2000.
- [35] Liu H., Gronthos S., Shi S. Dental Pulp Stem Cells. *Methods In Enzymology*. 2006;419:99–113.
- [36] Perry B.C., Zhou D., Wu X., Yang F.C., Byers M.A., Chu T.M., Hockema J.J., Woods E.J., Goebel W.S. Collection, Cryopreservation, and Characterization of Human Dental Pulp-Derived Mesenchymal Stem Cells for Banking and Clinical Use, *Tissue Engineering: Part C*. 2008;14(2): 149–156.
- [37] Suchanek J., Soukup T., Visek B., Ivancakova R., Kucerova L., Mokry J. Dental Pulp Stem Cells and Their Characterization. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2009;153(1):31–36.
- [38] Guan Z., Shi S., Kamolmatyakul S. Proliferation and mineralization ability of dental pulp cells derived from primary and permanent teeth, *Songklanakarin J Sci Technol*. 2011;33(2):129–134.

Adres do korespondencji:
Katedra i Zakład Protetyki Stomatologicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Orzeszkowej 18, 80-208 Gdańsk
tel.: (58) 349 21 05, fax: (58) 349 21 50
e-mail: izabelam@gumed.edu.pl