

Received: 09.09.2016  
Accepted: 11.07.2017  
Published: 19.10.2017

## Jama ustna jako potencjalne źródło komórek macierzystych

### The oral cavity – potential source of stem cells

Rafał Brożek<sup>1</sup>, Maciej Kurpisz<sup>2</sup>, Ryszard Koczorowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinika Gerostomatologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

<sup>2</sup>Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk, Poznań

#### Streszczenie

W artykule omówiono typy komórek macierzystych wywodzących się z tkanek jamy ustnej, mających zastosowanie w stomatologii regeneracyjnej, ze szczególnym uwzględnieniem funkcji, zmieniającej się w zależności od miejsca ich pochodzenia. Komórki macierzyste to niedojrzałe, prymitywne i niewyspecjalizowane komórki, zdolne do proliferacji, samoodnowy oraz różnicowania się w bardziej wyspecjalizowane komórki potomne. Ich obecność wykazano w wielu tkankach i narządach, w tym także w układzie stomatognatycznym. Jama ustna wydaje się wyjątkowo atrakcyjnym miejscem pozyskiwania komórek macierzystych. Powszechne występowanie i ich łatwa dostępność w tkankach zębowych i okołozębowych sprawiają, że istnieje realna szansa ich zastosowania w celach terapeutycznych, a ich pochodzenie rozwiązuje konflikty natury moralnej i etycznej.

Wielu autorów przypuszcza, że komórki macierzyste mogą mieć pamięć epigenetyczną, a więc cechy komórek, które są dziedziczone w kolejnych pokoleniach, które jednak nie są związane z modyfikacjami sekwencji samego DNA. Zasadnym więc staje się wykorzystanie komórek, których źródłem są tkanki jamy ustnej, jeśli planuje się je wykorzystać w zabiegach z zakresu medycyny regeneracyjnej oraz inżynierii tkankowej, przeprowadzonych w obrębie układu stomatognatycznego.

Wzrastająca liczba doświadczeń klinicznych, wśród których coraz większy odsetek stanowią badania randomizowane prowadzone w licznych grupach pacjentów, pozwala przypuszczać, że w niedługim czasie wybrane metody terapii z użyciem komórek macierzystych pochodzenia zębowego mogą zostać wprowadzone do rutynowych zastosowań klinicznych.

#### Słowa kluczowe:

mezenchymalne komórki macierzyste • indukowane pluripotentne komórki macierzyste • stomatologia • regeneracja kości • inżynieria tkankowa

#### Summary

The purpose of this review is to present the current knowledge regarding the hierarchy of stem cells originating from the oral cavity, which could have a potential value when applied to regenerative stomatology. It must be particularly emphasized that the heterogenous nature of its biology and function within oral compartment may predispose them to different types of applications. Stem cells can be perceived as immature, primitive and unspecialized types of cells with the ability to proliferate, self-renew and differentiate into specialized progeny according to the compartmental signaling. Their presence in tissue reservoirs was already discovered in many organs and tissues as well as in the stomatognathic system. The oral cavity appears to be an exceptionally attractive site to acquire stem cells. The common presence and easy access to these cells in dental and periodontal tissues provides a real chance to apply them for therapeutic purposes. Such an opportunity would also be neutral to bioethical and

<b>Keywords:</b>	<p>moral issues, assuming autologous stem cells employment. Many authors suspect that stem cells have epigenetic memory, so some of their features can be inherited through generations. They are not connected, however, with DNA sequence modifications. It is, therefore, justified to apply the cells, which have the oral cavity as their natural reservoir, in interventions associated with tissue engineering within the stomatognathic system. An increasing number of clinical trials, among which the number of randomized studies with large group of patients is progressively carried out, allows for a prediction that shortly therapeutic methods based on stem cells of dental origin may be implemented to the routine repertoire of clinical practice.</p> <p><b>mesenchymal stem cells • induced pluripotent stem cells • stomatology • bone regeneration • tissue engineering</b></p>
<b>GICID:</b>	01.3001.0010.5385
<b>DOI:</b>	10.5604/01.3001.0010.5385
<b>Word count:</b>	9741
<b>Tables:</b>	–
<b>Figures:</b>	–
<b>References:</b>	120

**Adres autora:** dr n. med. Rafał Brożek, Klinika Gerostomatologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, Collegium Stomatologicum, ul. Bukowska 70, 60-812 Poznań; e-mail: broz@ump.edu.pl

## WPROWADZENIE

Komórka macierzysta (stem cell) to niedojrzała, prymitywna, niewyspecjalizowana komórka zdolna do samoodnowy oraz do różnicowania w bardziej wyspecjalizowane komórki potomne, które budują tkanki i narządy [110]. Termin „komórka macierzysta” został po raz pierwszy użyty przez rosyjskiego histologa Aleksandra Maksimowa w 1908 r., do hematopoetycznych komórek macierzystych.

Postęp jaki dokonał się w medycynie regeneracyjnej w ostatnich latach sprawił, że komórki macierzyste znajdują coraz szersze zastosowanie w tej dynamicznie rozwijającej się dyscyplinie naukowej. Zwłaszcza gdy zaawansowana utrata tkanki kostnej w obrębie części twarzowej czaszki, spowodowana urazem, procesem nowotworowym, starzeniem lub występowaniem towarzyszących chorób ogólnoustrojowych, niejednokrotnie uniemożliwiała zastosowanie klasycznych technik terapeutycznych i tym samym uzyskanie pozytywnych, długookresowych wyników leczenia stało się niemożliwe. Komórki macierzyste wchodziły w skład triady Lyncha, obejmującej trzy czynniki niezbędne do zapoczątkowania i zapewnienia prawidłowego wzrostu i wydajnego przebiegu procesu odbudowy kości. Do jej elementów zalicza się:

- stworzenie stabilnego rusztowania (osteokondukcja), którym są najczęściej materiały kostne pochodzenia autogenego lub materiały kościostępcze wytwarzane sztucznie;

- cząsteczki sygnałowe, niezbędne do pobudzenia komórek kościotwórczych (osteoindukcja) np. białka morfogenetyczne kości oraz
- właściwe komórki tworzące kość. Są nimi niezróżnicowane komórki macierzyste, częściowo zdeterminowane komórki progenitorowe oraz komórki zróżnicowane np. osteocyty [113].

Tkanki jamy ustnej są bogatym źródłem komórek macierzystych i mogą być cennym uzupełnieniem terapii z zakresu inżynierii tkankowej. Celem artykułu jest przegląd współczesnej wiedzy dotyczącej poszczególnych typów komórek macierzystych wchodzących w skład układu stomatognatycznego, mających zastosowanie w stomatologii regeneracyjnej, ze szczególnym uwzględnieniem funkcji, zmieniającej się w zależności od miejsca ich pochodzenia [3,4,5,6].

## ŹRÓDŁA KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Komórki macierzyste są zdolne do samoodnowy oraz proliferacji. W zależności od rodzaju wykazują także odmienne zdolności do różnicowania. Wyróżnia się dwa podstawowe rodzaje komórek macierzystych: embryonalne komórki macierzyste (embryonic stem cells – ESC) oraz dojrzałe komórki macierzyste (adult stem cells), które są obecne w tkankach dorosłego organizmu. Oprócz nich można także wyróżnić indukowane komórki pluripotenne (induced pluripotent stem cells – iPSC), które powstają sztucznie w wyniku genetycznej modyfikacji komórek somatycznych [88,95].

Komórki ESC i iPSC są komórkami pluripotencjalnymi to znaczy, że mogą się przekształcić w komórki wszystkich trzech listków zarodkowych: endodermy, ektodermy i mezodermy. Dojrzałe komórki macierzyste są zwykle multipotentne, mogą się różnicować w prawidłowych warunkach w obrębie więcej niż jednej linii komórkowej. Totipotencjalnymi komórkami macierzystymi są jedynie blastomery, które wchodzą w skład rozwijającej się zygoty, są one zdolne do tworzenia całego organizmu włącznie z łożyskiem [79].

### Dojrzałe komórki macierzyste

Dojrzałe komórki macierzyste (adult stem cells) tworzą zróżnicowane biologiczne i somatyczne źródło np. mezenchymalnych komórek macierzystych (mesenchymal stem cells, MSC), somatycznych lub postnatalnych komórek macierzystych. Wykazano ich obecność w wielu tkankach i narządach organizmu ludzkiego, takich jak szpik kostny, siatkówka i skóra. Źródłem komórek macierzystych mogą być także tkanki układu stomatognatycznego, w tym jamy ustnej i zębów (ryc. 1). Ich odkrycie datuje się na późne lata 60 ub.w., kiedy Fridenstein zaobserwował przypominające fibroblasty komórki tworzące kolonie *in vitro*, a upowszechnił pod tą nazwą w latach 90 XX w. Caplan [78].

Ich występowanie w tkankach całego organizmu sprawia, że w porównaniu z innymi typami komórek macierzystych, istnieje realna szansa ich klinicznego wykorzystania w celach terapeutycznych. Użycie dojrzałych komórek macierzystych nie jest tak kontrowersyjne jak w przypadku komórek embrionalnych, ponieważ zastosowanie komórek somatycznych nie wymaga zniszczenia embrionu.

MSC zasiedlają specjalne strefy tkanek tzw. niszę komórek macierzystych. Pojęcie zostało wprowadzone do piśmiennictwa przez Schofielda w 1978 r., dotyczy mikrośrodowiska komórek, w którym znajdują się składniki mogące kontrolować asymetryczne podziały komórek macierzystych [85].

Somatyczne komórki macierzyste mogą długo pozostawać nieaktywne w niszach, nie ulegać podziałom ani różnicowaniu. W chwili uszkodzenia narządu lub fizjologicznego zapotrzebowania tkanek na komórki, różnicują się w kierunku komórek, które następnie wbudowują się w dany organ, powodując jego regenerację lub odnowę.

Liczne badania naukowe potwierdziły także ich plastyczność, czyli zdolność różnicowania się dojrzałych komórek macierzystych wywodzących się z jednej tkanki w dojrzałe komórki innych tkanek, nie tylko pochodzenia mezodermalnego [80,89].

Komórki adherentne, izolowane ze szpiku kostnego nie są jednorodne, stąd trudne jest ustalenie pełnej listy znaczników molekularnych charakterystycznych wyłącznie dla dojrzałych komórek macierzystych i zdefi-

niowanie czym są te komórki, bez uniknięcia kontrowersji [42]. W 2006 r. Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej (International Society for Cellular Therapy – ISCT) zaproponowało minimalne kryteria definiujące MSC jako mezenchymalne komórki zrębu (mesenchymal stromal cell), niezależnie od tkanki, z której są izolowane [25]. Zgodnie z kryteriami przyjętymi przez ISCT, MSC muszą wykazać zdolność do przylegania do powierzchni naczyń hodowlanych (plastyku lub szkła), cechować się wzrostem w hodowlach *in vitro*, prowadzonych w standaryzowanych warunkach. MSC charakteryzują się występowaniem na swojej powierzchni kompletu antygenów różnicowania, które są charakterystyczne, ale nie swoiste dla MSC: CD73+, CD90+, CD105+. Komórki o fenotypie MSC nie wykazują ekspresji antygenów CD45-, CD34-, CD14 – lub CD11b, CD79a lub CD19 oraz HLA-DR oraz są zdolne do różnicowania się w tkankę kostną, chrzęstną i tłuszczową. Badania Buhringa i wsp. [13] oraz Battuli i wsp. [8] potwierdziły, że CD271 oraz antigen-1 także są swoistymi markerami powierzchniowymi dla ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych.

### Komórki macierzyste szpiku kostnego

Komórki macierzyste szpiku kostnego (bone marrow-derived Stem Cells – BMSC). Dojrzały szpik kostny generuje co najmniej dwa różne typy komórek macierzystych. Pierwszy typ zwany jest hematopoetycznymi komórkami macierzystymi (hematopoietic stem cells – HSC). Różnicuje się we wszystkie możliwe rodzaje komórek krwi w organizmie. Badania z użyciem przeciwciał monoklonalnych komórek macierzystych wyizolowanych ze szpiku kostnego pozwoliły na określenie ich antygenów powierzchniowych. Przyjmuje się, że u ludzi HSC mają następujące markery: CD34+, c-kit+, HLA-DR, CD45RO+, CD38-, MDR – 1+, LDM-. Drugi typ – mezenchymalne, multipotencjalne komórki macierzyste – stanowi niewielką, heterogenną populację komórek zrębu. Z powodu niejednorodności, są zdolne do różnicowania się nie tylko w komórki tkanki łącznej, ale także w kierunku wielu innych komórek i tkanek m.in. mięśni szkieletowych, osteoblastów, chondrocytów i adipocytów. Zdolność tworzenia kości *in vivo* czyni z BMSC doskonałe źródło komórek macierzystych, stosowanych w technikach zabiegów z zakresu sterowanej regeneracji kości [23].

### BMSC uzyskane z talerza kości biodrowej

Cechą charakterystyczną BMSC pobranych z talerza kości biodrowej jest duża różnorodność morfologiczna i związany z tym różny potencjał proliferacyjny. Uważa się, że 5-20% izolowanych komórek ma cechy macierzystości, a więc zdolność do samoodnawiania oraz różnicowania w kierunku co najmniej 3 linii komórkowych [10]. BMSC dają początek komórkom kościotwórczym, chrząstkotwórczym, adipocytom, komórkom mięśniowym oraz komórkom nerwowym pochodzenia niemezenchymalnego [29].

Kontrolowana regeneracja kości z zastosowaniem komórek macierzystych pochodzących ze szpiku pobranego z kości biodrowej należy do najczęściej stosowanych i najlepiej udokumentowanych zabiegów w stomatologii. Terapeutyczny wynik jest uzyskiwany nie tylko dzięki zdolności BMSC do różnicowania się w kierunku osteogenezy ale także dzięki właściwościom immunomodulacyjnym i możliwości regulacji zjawisk zachodzących w ich otoczeniu przez wydzielanie odpowiednich cytokin i bezpośredni kontakt z innymi komórkami.

Szpiczek kostny jako źródło osteoblastów jest materiałem łatwo dostępnym, jego pobranie jest zabiegiem inwazyjnym dla dawcy, ale nie generuje wysokich kosztów. Jego zastosowanie w czasie zabiegu rekonstrukcji u tego samego pacjenta nie wywołuje ryzyka zakażenia krzyżowego lub odrzutu. Dodatkowym atutem jest to, że materiał nie jest poddawany procesom zamrażania, sterylizacji, odbiaćzania itp. i zawiera żywe komórki. Także czas od jego pobrania do zastosowania w ubytku kostnym może być skrócony do minimum.

Zabieg kontrolowanej regeneracji kości można przeprowadzić w każdym wieku, niemniej dawcą może zostać osoba, która nie przekroczyła 60 roku życia [60,93]. Doniesienia wielu autorów sugerują jednak możliwość obniżenia osteogenego potencjału BMSC izolowanych z kości biodrowej, co może sugerować, że wiek dawcy jest ważnym czynnikiem mogącym decydować o powodzeniu terapii regeneracyjnych [65,69]. Z wiekiem zarówno *in vivo* jak *in vitro* zaznacza się tendencja zmian w kierunku różnicowania MSC w tkankę tłuszczową, kosztem osteogenezy [11]. Zjawisko to może tłumaczyć występujący w wieku podeszłym defekt regeneracji i mineralizacji kości i zamianę części szpiku w tkankę tłuszczową. Narastający z wiekiem defekt osteogenezy przejawia się obniżeniem ekspresji genów swoistych dla różnicowania w osteoblasty, takich jak CBFA1, Runx2, Dlx5, przy jednoczesnym wzroście aktywności genów, charakterystycznych dla adipogenezy (PPAR- $\gamma$ , aP2) [46].

### BMSC uzyskane z kości płaskich twarzoczaszki

Kość biodrowa pozostaje wciąż głównym źródłem komórek macierzystych. BMSC można także pozyskać z kości części twarzowej czaszki w tym szczęki i żuchwy. Pobranie komórek szpiku można przeprowadzić w warunkach ambulatoryjnych, w czasie wykonywania rutynowych zabiegów stomatologicznych, takich jak implantacja, usunięcie zęba mądrości, wyluszczenie torbieli itp. Komórki macierzyste można z powodzeniem pozyskać z kości twarzoczaszki zarówno od młodszych pacjentów w wieku 6-53 lat [58], ale również od osób starszych (57-62 lata) [34]. Wydaje się, że wiek dawcy odgrywa drugorzędne znaczenie w procesie różnicowania komórek macierzystych pobranych z wyżej wymienionej okolicy.

Obserwacje kliniczne [12,19,52] oraz eksperymenty doświadczalne przeprowadzane na zwierzętach [26,120] dowodzą, że przeszczep z wykorzystaniem kości auto-

logicznej pobranej z okolicy twarzowo-czaszkowej stosowany w leczeniu ubytków kostnych w tej samej okolicy gwarantuje uzyskanie znacznie większej objętości kości w porównaniu z kością pobraną z grzebienia biodrowego lub żebra. Najlepiej gdy okolica, w której pobrano autologiczną kość przeznaczoną do przeprowadzenia przeszczepu, znajduje się w pobliżu miejsca leczonego ubytku kostnego.

Kości szczęki i żuchwy oraz kość biodrowa różnią się pochodzeniem. Szczęka i żuchwa w trakcie rozwoju osobniczego powstają z komórek grzebienia nerwowego (cranial neural crest), podczas gdy kość biodrowa rozwija się z mezodermu [15]. Odmienne pochodzenie tych struktur sprawia, że BMSC pobrane z talerza kości biodrowej różnią się fenotypem i właściwościami funkcjonalnymi w porównaniu z komórkami kości twarzoczaszki [3,16]. BMSC z kości biodrowej cechuje ograniczony potencjał różnicujący oraz zmniejszone zdolności różnicowania w kierunku komórek układu kościotwórczego, a także więcej wytwarzanej zbitnej tkanki kostnej bogatszej w komórki krwiotwórcze w porównaniu z BMSC pobranych z kości twarzoczaszki [3,40].

W badaniach na zwierzętach wykazano, że komórki macierzyste pobrane ze szpiku kości czaszki tworzą większe i bardziej liczne nowe węzły kostnienia (bone nodules), a nowotworzona kość jest bardziej zmineralizowana [2]. Niekorzystne zjawisko tworzenia tkanki tłuszczowej, towarzyszące osteogenezie jest mniej nasilone [3,58]. Wydaje się zatem, że kości czaszki mogą być dobrym źródłem komórek macierzystych przeznaczonych do wykorzystania w stomatologicznych zabiegach regeneracyjnych, maksymalna ilość szpiku pobranego z tej okolicy nie może przekroczyć 0,03-0,5 ml [34,58]. Wobec 1000 ml szpiku pobranego np. ze szpiku z kości długich, ilość ta może się okazać niewystarczająca. Ważne jest ustalenie niezawodnego i bezpiecznego protokołu ekspansji komórek, przeznaczonych do badań klinicznych. Komórki macierzyste pochodzące z tkanek zębowych

Dotąd w tkankach narządu zębowego udało się zidentyfikować, pochodzące z neuroektodermy dwa typy dojrziałych komórek macierzystych: nabłonkowe komórki macierzyste (epithelial stem cells) oraz mezenchymalne komórki macierzyste (mesenchymal stem cells). Nabłonkowe komórki macierzyste odkryto w 1999 r. w siekaczu myszy, w strukturze zwanej pętlą wierzchołkową. Komórki macierzyste, w wyniku asymetrycznych podziałów, tworzą ameloblasty – komórki wytwarzające szkliwo [35]. Komórki te mogą być wykorzystywane do analizy przeznaczenia komórek macierzystych w czasie rozwoju zęba, brak informacji o występowaniu tych komórek w organizmach ludzkich. Ich występowanie może być charakterystyczne wyłącznie dla gryzoni, ponieważ ich siekacze różnią się od zębów ludzkich tym, że wyrzynają się przez całe życie osobnicze zwierzęcia.

W przeciwieństwie do struktur nabłonkowych zęba,

tkanki mezenchymalne cechują się zdolnością do odnawiania i odtwarzania utraconych struktur. Dzięki obecności mezenchymalnych komórek macierzystych w dojrzałym zębie istnieje możliwość regeneracji takich tkanek jak cement korzeniowy, zębina oraz ozębna w ciągu całego życia organizmu ludzkiego [18,32,51,70,81].

#### Komórki macierzyste miazgi zęba (DPSC)

Wśród licznej grupy komórek macierzystych, których źródłem są tkanki układu stomatognatycznego, jako pierwsze zidentyfikowano dojrzałe ludzkie komórki macierzyste umiejscowione w miazdze zęba (dental pulp stem cells – DPSC) [33]. DPSC, w miazdze zęba, są źródłem odontoblastów, komórek wytwarzających zębinę. Fenotypowo komórki przypominają BMSC, jednak DPSC mają wyższy potencjał wzrostowy i proliferacyjny. Do celów badawczych ekstrahuje się DPSC z miazgi zatrzymanych trzecich zębów trzonowych, które rozwijają się od około 6 roku życia, a wyrzynają jako ostatnie zęby około 18 roku życia. Tym samym istnieje prawdopodobieństwo, że komórki macierzyste izolowane z miazgi zatrzymanych zębów ósmych znajdują się w bardzo wczesnej fazie różnicowania komórkowego [33].

#### Komórki macierzyste zębów mlecznych (SHED)

Jako następne wyizolowano komórki pochodzące z miazgi zębów mlecznych (stem cells from human exfoliated deciduous teeth – SHED) [62]. Podobnie jak DPSC są umiejscowione w okołonaczyniowej miazdze, mają jednak wyższy potencjał proliferacyjny, co świadczy o tym, że komórki SHED znajdują się we wczesnym stadium różnicowania. Swoistą ich cechą jest intensywna ekspresja genów związanych z wytwarzaniem czynników wzrostu np. czynnika wzrostu fibroblastów FGF oraz transformującego czynnika wzrostu beta (TGF- $\beta$ ) oraz zdolność tworzenia *in vivo* warunków osteoindukcyjnych, rekrutacji komórek kościotwórczych gospodarza i tworzenie nowej kości. Dzięki tym właściwościom resorpcji korzeni zębów mlecznych może towarzyszyć jednoczesna apozycja tkanki kostnej. Komórki te są zdolne do regeneracji kompleksu zębinowo-miazgowego po przeszczepieniu ich do organizmu myszy poddanej immunosupresji.

#### Komórki macierzyste więzadła ozębnego (PDLSC)

Podstawowym źródłem komórek macierzystych więzadła ozębnego (periodontal ligament stem cells – PDLSC) są więzadła ozębnej. Potwierdzono skuteczną izolację tych komórek z powierzchni korzeni zębów usuniętych. Mają zdolność regeneracji tkanek przyzębia, tj. włókien ozębnej, cementu korzeniowego, a także kości wyrostka zębodołowego. Procesy te poddano analizie w doświadczeniach *in vivo* na modelach zwierzęcych [86,87]. Właściwości komórek PDLSC mogą zależeć od miejsca ich występowania. Te, które są bliżej powierzchni kości mogą być odpowiedzialne ze jej rege-

nerację, a usytuowane bliżej korzenia zębowego będą odpowiedzialne za syntezę cementu korzeniowego [106].

#### Komórki macierzyste występujące w okresie wzrostu zęba (SCAP i DFPC)

Komórki macierzyste zidentyfikowano także w strukturach występujących wyłącznie w okresie rozwoju zęba. Są nimi: brodawka wierzchołkowa (apical papilla) oraz woreczek zębowy (dental follicle).

Jednym z najbardziej dostępnych źródeł komórek macierzystych jest miazga i brodawka wierzchołkowa trzecich zębów trzonowych. Początek ich rozwoju rozpoczyna się około szóstego roku życia, a wyrzynają się jako ostatnie zęby około osiemnastego roku życia. Późne kształtowanie się zawiązków zębów ósmych w stosunku do pozostałych zębów sugeruje, że komórki macierzyste mogą się znajdować w bardzo wczesnej fazie różnicowania komórkowego [33,92].

Brodawka wierzchołkowa to tkanka miękka, umiejscowiona w okolicy okołowierzchołkowej rozwijającego się zęba, jest niezbędnym elementem odpowiedzialnym za kształtowanie części korzeniowej i ostateczny wzrost zęba. Powstaje w wyniku intensywnych podziałów komórek nabłonka, występujących między ektodermalną warstwą zewnętrzną i wewnętrzną narządu szklivotwórczego, w miejscu w tzw. pętli szyjnej (cervical loop). Leży w bezpośrednim sąsiedztwie miazgi kanałowej, od której oddzielona jest jedynie tzw. warstwą bogatokomórkową. Komórki macierzyste brodawki wierzchołkowej (stem cells of the apical papilla – SCAP) są umiejscowione w okolicy wierzchołkowej korzenia zęba z nieukończonym wzrostem [91,92]. SCAP są obecne jedynie w procesie odontogenezy i odpowiadają za tworzenie pierwotnej zębiny korzeniowej. Po zakończeniu rozwoju zęba, czyli całkowitym uformowaniu korzenia i zamknięciu otworu wierzchołkowego, SCAP zanikają.

SCAP charakteryzują się wysokim potencjałem proliferacyjnym oraz mineralizacyjnym w porównaniu do DPSC. Obserwuje się też ekspresję typowych dla MSC znaczników fenotypowych: STRO-1, CD73, CD90 oraz CD105 [24].

SCAP w hodowlach *in vitro* są zdolne do różnicowania w kierunku komórek tłuszczowych, komórek kościotwórczych, podobnie jak DPSC i SHED, wykazują ekspresję markerów typowych dla komórek nerwowych, takich jak neurofilament M, neuroswoista enolaza oraz wykazują zdolność różnicowania w kierunku hepatocytów, komórek wątroby [75]. Po wprowadzeniu SCAP na nośniku podskórnie do organizmów myszy *in vivo* komórki są zdolne do regeneracji kompleksu miazgowo-zębinowego, w rozwoju osobniczym prawdopodobnie są źródłem pierwotnych odontoblastów, odpowiedzialnych za formację zębiny korzeniowej. SCAP charakteryzują się niewielką immunogennością oraz hamują proliferację limfocytów T *in vivo* [75].

Przechowywanie komórek w niskiej, ujemnej temperaturze (krioprezervacja) nie wpływa na właściwości immunologiczne SCAP.

Woreczek zębowy powstaje z ektomezenchymy sąsiadującej z obwodowymi fragmentami narządu szkliwotwórczego, jest macierzystą strukturą tkanek przyzębia, zawiera niezróżnicowane komórki macierzyste i progenitorowe osteoblastów, komórek ozębnej oraz cementoblastów [37].

Komórki macierzyste woreczka zębowego (dental follicle stem cells – DFPC) mają typowe właściwości komórek macierzystych pochodzenia zębowego. Wykazują zdolność do proliferacji, formowania tkanek twardych zęba, dodatkowo ekspresję genów notch-1 i nestyny. DFPC zdolne są do sekrecji TGF- $\beta$  [64].

#### Komórki macierzyste błony śluzowej jamy ustnej (GMSC i OMSC)

Błona śluzowa jamy ustnej składa się z nabłonka wielowarstwowego płaskiego, tkanki łącznej oraz dobrze unaczynionej blaszki podstawowej. Poniżej znajduje się tkanka podśluzówkowa, która może zawierać niewielkich rozmiarów gruczoły ślinowe, komórki tkanki tłuszczowej oraz naczynia krwionośne i limfatyczne. Zidentyfikowano dwa różne typy ludzkich dorosłych komórek macierzystych w błonie śluzowej jamy ustnej. Jednym z nich są nabłonkowe komórki progenitorowe/macierzyste, które są subpopulacją małych keratynocytów błony śluzowej jamy ustnej (mniejsze niż 40  $\mu$ m) [45].

Komórki te są komórkami unipotentnymi, a więc mogą różnicować się wyłącznie w komórki nabłonkowe, cechuje je także klonogenność (clonogenicity) i zdolność do regeneracji warstwowych i dobrze zorganizowanych przeszczepów błony śluzowej jamy ustnej *ex vivo*, co może sugerować zasadność ich stosowania w transplantacji w obrębie jamy ustnej [43,44].

Komórki macierzyste zostały zidentyfikowane także w blaszce podstawowej, która jest bezpośrednio złączona z okostną niżej leżącej kości, bez udziału warstwy podśluzowej. Błona śluzowa pokrywająca wyrostki zębodołowe oraz obszar zatrzonowcowy jest często wycinana w czasie zabiegów z zakresu chirurgii stomatologicznej, zatem może być łatwo dostępnym źródłem komórek do dalszych badań.

Zhang i wsp. [118] jako pierwsi w 2009 r. scharakteryzowali komórki macierzyste dziąsła (gingiva-derived mesenchymal stem cells – GMSC), które wykazują klonogenność, zdolność do samoodnowy oraz multipotentne zdolności różnicowania, przypominające właściwości typowe dla BMSC. GMSC szybciej proliferują, ich budowa morfologiczna jest długo stabilna, nie tracą jej wraz z kolejnymi pokoleniami (passaging) [101]. Marynka-Kalmani i wsp. [57], wykazali, że w blaszce wla-

ściwej znajdują się komórki przypominające multipotentne komórki macierzyste grzebienia nerwowego tzw. komórki macierzyste błony śluzowej jamy ustnej (oral mucosa stem cells – OMSC). Są zdolne do różnicowania w linie komórkowe pochodzące z 3 listków zarodkowych. Komórki linii fibroblastycznej pochodzących z błony śluzowej jamy ustnej wykazują dużą efektywność w trakcie przeprogramowania iPS. Multipotencjalność tych komórek, łatwość pobierania i izolacji, występowanie dużej liczby oraz szybka ekspansja *ex vivo* to cechy, które wyróżniają te komórki wśród innych potencjalnych źródeł komórek macierzystych przeznaczonych do zastosowań klinicznych [28].

#### Komórki macierzyste okostnej (PSC)

Komórki macierzyste/progenitorowe mogą także pochodzić z okostnej (periosteum-derived stem/progenitor Cells – PSC). Okostna to włóknista błona pokrywająca tkankę kostną. Na jej zdolności osteogenne zwrócono uwagę już w 1932 r. i wykazano zdolność okostnej do tworzenia zmineralizowanej macierzy pozakomórkowej w warunkach *in vitro* [4].

Histologicznie okostna jest zbudowana z dwóch odrębnych warstw. Warstwa zewnętrzna składa się głównie z fibroblastów i włókien elastycznych, warstwa wewnętrzna zawiera komórki macierzyste [21,82,109], osteogenne komórki progenitorowe [5,6], a także osteoblasty, fibroblasty, mikronaczynia krwionośne oraz włókna nerwowe układu współczulnego. Komórki występujące w okostnej są zdolne do różnicowania w osteoblasty, adipocyty i chondrocyty, obserwuje się także ekspresję markerów typowych dla MSC [82,109].

Ponadto De Bari i wsp. [21] wykazali, że pojedyncze komórki powstałe w wyniku podziału dojrzałych komórek macierzystych okostnej mają właściwości multipotentne, tj. zdolność do różnicowania się w kierunku osteoblastów, chondrocytów, adipocytów i komórek mięśni szkieletowych w warunkach *in vivo* i *in vitro*, stąd komórki te mogą być szczególnie użyteczne w zabiegach sterowanej regeneracji kości.

Analiza porównawcza psich komórek MSC/progenitorowych wykazała, że komórki okostnej charakteryzują się większym potencjałem do tworzenia kości niż komórki pobrane z talerza kości biodrowej w warunkach *in vivo* [119]. Fenotypowo komórki okostnej szczęki i zuchwy nie różnią się od komórek BMSC pobranych z guzowatości szczęki, obydwie populacje komórkowe są zdolne do tworzenia kości ektopowo po implantacji podskórnej tych komórek u myszy [17].

Agata i wsp. [1] wykazali, że ludzkie komórki okostnej proliferują szybciej niż komórki zrębu szpiku kostnego, a ich podskórna transplantacja z rekombinowanymi czynnikami wzrostu do organizmu myszy sprawia, że objętość kości jest większa w porównaniu z zastosowaniem komórek BMSC. Przeszczepiane komórki okostnej

indukują tworzenie nowej kości korowej, podczas gdy komórki szpiku kostnego przyspieszają tworzenie kości gąbczastej [103]. Źródło i pochodzenie komórek macierzystych może zatem wpływać na właściwości morfologiczne regenerowanej kości.

Ze względu na właściwości kościotwórcze, komórki okostne są obecnie wykorzystywane w regeneracji kości twarzoczaszki. Technika chirurgiczna z zastosowaniem odwróconego płata okostnej (inverted periosteal flap technique) jest metodą leczenia z wyboru zalecaną w augmentacji wyrostka zębodołowego w połączeniu z implantacją lub przeszczepem kostnym [90]. Badania kliniczne z użyciem hodowanych komórek okostnej wykazały dużą skuteczność zastosowania tych komórek w technikach regenerujących ubytki kostne, tym samym pozwalają istotnie skrócić czas potrzebny na przeprowadzenie implantacji oraz wygojenie się wszczepu w kości wyrostka zębodołowego [66,84]. Tak więc okostna jest doskonałym źródłem komórek macierzystych/progenitorowych służących do leczenia ubytków kostnych dużych rozmiarów.

#### Komórki macierzyste gruczołów ślinowych (SGSC)

Komórki macierzyste mogą istotnie poprawić jakość życia pacjentów chorujących na nowotwory rozwijające się w obrębie głowy i szyi, u których w wyniku przeprowadzonego zabiegu radioterapii, wydzielanie śliny ulega upośledzeniu, prowadząc do kserostomii. Chociaż istnienie komórek macierzystych występujących w gruczołach ślinowych zostało zasugerowane w badaniach *in vivo* [22,56], jednak do tej pory nie udało się zidentyfikować komórek, zdolnych do podjęcia funkcji wewnątrzwydzielniczej.

Kishi i wsp. [50] wyizolowali gruczołowe komórki macierzyste/progenitorowe (salivary gland-derived stem cell - SGSC) ze ślinianki podżuchwowej szczura. Komórki te charakteryzowały się zdolnością proliferacji oraz ekspresją markerów typowych dla komórek zrazikowych, przewodów wyprowadzających wydzielinę oraz mioepitelialnych.

Lombaert i wsp. [55] zauważyli, że tradycyjna metoda hodowli komórkowej *in vitro* w trójwymiarowych hodowlach sferycznych/sferoidów (floating sphere culture) może być z powodzeniem zastosowana do uzyskania komórek, które są zdolne do różnicowania w komórki przewodów wyprowadzających oraz w śluzowe i surowicze komórki pęcherzykowe. Komórki macierzyste zostały także wyizolowane ze świńskich i ludzkich gruczołów ślinowych [55,59,83]. Wewnątrzgruczołowe przeszczepienie komórek macierzystych przywróciło zdolność sekrecyjną gruczołu ślinowego u myszy poddanej napromienianiu [55,67].

Gruczoły ślinowe pacjentów, poddane radioterapii w obrębie głowy i szyi z powodu przebytego procesu nowotworowego, tracą bezpowrotnie zdolność wydzie-

lania śliny, co znacznie pogarsza jakość życia tych pacjentów. Jak dotąd nie opracowano skutecznej terapii przywracającą prawidłową funkcję gruczołów ślinowych. Jedną z obiecujących metod terapeutycznych wydaje się autologiczna transplantacja dojrzałych komórek macierzystych gruczołów ślinowych. Jednak poważnym ograniczeniem tej metody może być krótki okres życia tych komórek w hodowlach *in vitro*, a zatem krótki okres potrzebny na przeprowadzenie zabiegu implantacji, a tym samym zwiększone ryzyko metaplastji nowotworowej tych komórek. Neumann i wsp. [68] podjęli próbę długoczasowego zamrażania komórek, będących subpopulacją ślinowych komórek macierzystych/progenitorowych. Po trzech latach trwania eksperymentu, komórki te w dalszym ciągu wykazywały stabilność fenotypową i funkcjonalną, identyczną z komórkami niepoddanymi zamrażaniu. Doniesienie Neumanna i wsp. dowodzi, że komórki te mogą być skutecznie stosowane w dłuższej perspektywie czasowej.

Hodowle gruczołowych komórek macierzystych, zawsze zawierają także komórki mięszu, zrębu, tkanki łącznej, naczyń krwionośnych, co może utrudniać izolację właściwych komórek macierzystych. Gorjuop i wsp. [31] otrzymali z ludzkich gruczołów ślinowych komórki macierzyste, które pochodzą najprawdopodobniej z komórek zrębu wykazujące ekspresję markerów typowych dla embrionalnych i dojrzałych komórek macierzystych i są zdolne do różnicowania się w komórki tłuszczowe, kościotwórcze i chrząstkotwórcze.

#### Komórki macierzyste tkanki tłuszczowej (ASC)

Tkanka tłuszczowa jest bogatym źródłem komórek MSC. Komórki macierzyste tkanki tłuszczowej (adipose-derived stem cells - ASC) fenotypowo przypominają komórki macierzyste szpiku kostnego i tworzą dosyć homogeną populację komórkową. Jedyną znaczącą ilościowo domieszkę, w proporcji kilku-kilkunastu procent, stanowią prekursorowe komórki śródbłonka naczyń krwionośnych, zdolne do lokalnego indukowania tworzenia naczyń krwionośnych. Częstość występowania MSC w szpiku kostnym jest mniejsza niż częstość występowania ASC w populacji komórek tkanki tłuszczowej [94]. Nie wykazano różnic w dynamice różnicowania w kierunku osteo- i chondrogenyzy. W zastosowanych modelach doświadczalnych potencjał chondro- i osteogenyzy ASC był porównywalny w stosunku do BMSC, ASC są jednak mniej narażone na wystąpienie częściowego zahamowania proliferacji. Sposób pozyskania tłuszczowych komórek macierzystych jest łatwiejszy i mniej inwazyjny dla dawcy, odbywa się podczas zabiegów chirurgicznego usunięcia (lipektomia) lub odessania (liposukcja) nadmiaru podskórnej tkanki tłuszczowej z takich obszarów ciała jak podbródek, ramiona, brzuch, biodra, pośladki i uda. Dotychczas pozyskany materiał uważany był za odpad medyczny [48].

Wykorzystanie ASC w stomatologii zostało potwierdzone klinicznie [53,61]. Pieri i wsp. [77] potwierdzili dużą

skuteczność tłuszczowych komórek macierzystych, które zostały przeszczepione wraz z materiałem kośćcozastępczym Bio-Oss podczas implantacji wszczepu śródkostnego, w formowaniu nowej kości *in vivo*. Potwierdzono obecność nowej kości zwłaszcza w jej pionowym wymiarze oraz integrację implantowanego wszczepu.

ASC zostały z powodzeniem wykorzystane doświadczalnie w regeneracji tkanek przyzębia [100,111] oraz miąższu zęba po jej wcześniejszej pulpektomii [38,41]. Pluripotenne komórki macierzyste

Pluripotencja (pluripotencjalność) to zdolność pojedynczej komórki do przekształcenia się w dowolny typ komórek somatycznych. Proces różnicowania komórek pluripotentnych zachodzi w odpowiedzi na sygnały płynące z otoczenia zarodka lub hodowli komórkowej *in vitro*. Komórkami pluripotentnymi są embrionalne komórki macierzyste (ESC) oraz indukowane pluripotenne komórki macierzyste (iPSC). Z tej klasyfikacji należy wyłączyć wczesne embrionalne komórki macierzyste, których źródłem jest zarodek znajdujący się we wczesnej fazie rozwoju, od etapu zygoty do etapu moruli. Te komórki są totipotencjalne, a więc zdolne do wytworzenia całego organizmu, także tkanek pozazarodkowych, czyli łożyska i błon płodowych [114].

#### Embrionalne komórki macierzyste (ES)

Embrionalne komórki macierzyste (embryonic stem cells – ES) rozwijają się z niezróżnicowanych komórek węzła zarodkowego, 5-6-dniowej blastocysty, we wczesnym etapie rozwoju zarodka po zapłodnieniu [30,99]. Wykorzystanie tych komórek do celów badawczych lub terapeutycznych może się wiązać ze zniszczeniem zarodka i jest główną przeszkodą moralną i etyczną przed dalszym ich stosowaniem [112].

Tworzone są banki komórek macierzystych, dla których oznacza się antygeny zgodności tkankowej (human leukocyte antigen – HLA), istnieje możliwość generowania niestandardowych, indywidualnych komórek macierzystych przez transplantację jądra komórkowego komórki somatycznej do wyjądrzonego oocyty komórki biorcy, ze względu na drogie i nieefektywne techniki, obarczone problemami natury etycznej, brak jest doniesień o próbach wykorzystania ESC w stomatologii [112].

#### Indukowane pluripotenne komórki macierzyste (iPSC)

W 2006 r. Takashi i Yamanaka dokonali reprogramowania diploidalnego jądra komórkowego dojrzałej komórki somatycznej (fibroblast) pobranej ze skóry myszy, co doprowadziło do cofnięcia jej w rozwoju do komórki, będącej odpowiednikiem pluripotentnej komórki macierzystej [96]. Proces indukcji genów, których aktywność jest niezbędna do zachowania pluripotencji, odbył się przez transfekcję komórki somatycznej wektorami wirusopochodnymi kodującymi cztery znaczniki molekularne: Oct3/4 i Sox2, będące genami pluripotencji,

Klf4, odpowiedzialnego za inicjowanie ekspresji podstawowego dla ESC czynnika Nanog oraz onkogenu *c-Myc*, którego aktywność zapewnia intensywne podziały transfekowanych komórek. Rok po przeprowadzeniu eksperymentu na komórkach mysich, z powodzeniem podjęto próby z fibroblastami pochodzenia ludzkiego [95]. Otrzymane tą metodą komórki to indukowane pluripotenne komórki macierzyste (induced pluripotent stem cells – iPSC). iPSC są zdolne do różnicowania w komórki wszystkich trzech listków zarodkowych, są immunologicznie zgodne z organizmem biorcy, a wykorzystanie do badań dojrzałych pluripotencjalnych komórek somatycznych rozwiązuje konflikty i problemy natury moralnej i etycznej. Komórki te charakteryzują się dużym potencjałem proliferacyjnym, co pozwala uzyskać wystarczającą liczbę komórek do stosowania w celach terapeutycznych. Główną ich wadą jest ich niestabilność genomowa oraz potencjalna zdolność indukowania procesów nowotworowych w warunkach *in vivo*, co jest spowodowane pełną integracją genomu wektora wirusopochodnego z genomem przeprogramowanych komórek. Ryzyko związane ze stosowaniem komórek iPSC w celach terapeutycznych jest zbyt duże dla organizmu biorcy, stąd też ze względów bezpieczeństwa, na obecnym stanie wiedzy, nie zaleca się ich stosowanie w organizmach ludzkich *in vivo*.

Istnieje możliwość zastąpienia stosowanych wektorów wirusopochodnych na takie, które umożliwiłyby ekspresję wnoszonych przez nie do komórki genów bez konieczności wbudowania się do genomu. Istotne jest także opracowanie metody uzyskiwania komórek iPSC, która nie wymagałaby wprowadzania do komórek potencjalnie groźnych czynników, takich jak np. protoonkogen *c-Myc*, którego niekontrolowana ekspresja może doprowadzić do rozwoju nowotworowego.

Komórki somatyczne, które mają być poddane reprogramowaniu w kierunku iPSC, mogą być pobrane z różnych miejsc w organizmie. Ze względu na łatwą dostępność jama ustna wydaje się wyjątkowo atrakcyjnym miejscem pozyskiwania komórek, a badania Yana i wsp. [116] wykazały, że efektywność procesu reprogramowania w przypadku komórek pochodzących z tkanek jamy ustnej jest większa w porównaniu z fibroblastami pobranymi z innych okolic ciała. Wielu autorów [736,49,73] przypuszcza, że komórki iPSC mają pamięć epigenetyczną, a więc cechy komórek, które są dziedziczone w kolejnych pokoleniach, a nie są związane z modyfikacjami sekwencji samego DNA. Komórki somatyczne cofnięte w rozwoju do komórki pluripotentnej będą się różnicować w tkanki, z których komórki iPSC się wywodzą. Zasadnym więc staje się wykorzystanie komórek, których źródłem są tkanki jamy ustnej, jeśli planuje się wykorzystać powstałe komórki iPSC w stomatologicznych zabiegach regeneracyjnych.

Do tej pory komórki iPSC otrzymano z komórek pobranych z następujących struktur w jamie ustnej:

- Komórki macierzyste brodawki wierzchołkowej (SCAP)



[116].

- Komórki macierzyste miazgi zębów: stałych (DPSC) [116], mlecznych w okresie erupcji (wyrzynania) [9], mlecznych w okresie eksfoliacji (wypadania, SHED) [20].
- Fibroblasty błony śluzowej jamy ustnej [63].
- Komórki macierzyste dziąsła (GMSC) [28,105].
- Komórki macierzyste włókien ozębnej (PDLSC) [105].
- Komórki usuniętych zębów mądrości [72,97].

Opublikowano cztery doniesienia dotyczące potencjalnych możliwości wykorzystania iPSC w stomatologii zwłaszcza w celu regeneracji tkanek przyzębia [27] bądź otrzymania komórek biorących udział w tworzeniu narządu zębowego [74,111] lub tkanek zęba, takich jak: miazga, zębina, szkliwo [14].

### Komórki indukowane przekształcone w komórki mezenchymalne (iPSC-MSC)

Wykorzystanie komórek iPSC doświadczalnie w badaniach klinicznych, na obecnym poziomie wiedzy jest niemożliwe ze względu na ryzyko indukcji procesu nowotworowego przez te komórki.

Dlatego też są prowadzone badania nad komórkami progenitorowymi (iPSC-MSC), które powstają w wyniku asymetrycznego podziału komórek macierzystych. W procesie tym jedna z dwóch komórek potomnych różnicuje się jako komórka progenitorowa, a druga pozostaje niezróżnicowana jako komórka potomna utrzymująca właściwości samoodnowy typowej dla komórek macierzystych. W porównaniu do indukowanych komórek pluripotentnych, komórki progenitorowe wykazują wyższy stopień zróżnicowania, ponadto nie wzbudzają procesu nowotworowego w organizmie biocy, mają ograniczoną zdolność do samoodnowy, a po określonej liczbie podziałów komórkowych, różnicują się w wyspecjalizowane komórki ciała.

Ze względu na mniejsze ryzyko, w porównaniu z iPSC, wzbudzenia procesu nowotworowego, do celów klinicznych w stomatologii lepszym wydaje się wykorzystanie bardziej wyspecjalizowanych komórek MSC oraz komórek osteoprogenitorowych, powstałych w procesie różnicowania iPSC.

Zaletą stosowania komórek zróżnicowanych, takich jak iPSC-MSC jest także dostęp do potencjalnie dużej ich liczby, ich wysoka jakość oraz charakteryzująca je niewielka liczba dalszych podziałów komórkowych. Natywne komórki MSC można pozyskać z wielu miejsc w obrębie jamy ustnej, liczba tych komórek przeznaczonych do dalszych badań lub celów terapeutycznych pobrana od jednego dawcy jest niewielka, a ich zdolność do dalszych podziałów ograniczona. Stąd też istnieje potrzeba identyfikacji nowych źródeł komórek MSC zanim będzie można je powszechnie stosować u pacjentów klinicznie.

### ZASTOSOWANIE iPSC-MSC W CHOROBYCH PRZYZĘBIA

Skuteczność stosowania komórek iPSC-MSC potwierdzono dwukrotnie w szczurzych modelach zwierzęcych, w regeneracji tkanek przyzębia przez zespół Heynesa i wsp. [39] oraz w leczeniu zapalenia tkanek przyzębia przez Yanga i wsp. [117].

Hyens i wsp. [39] aplikowali, specjalnie do tego celu chirurgicznie wypreparowanych ubytków kostnych, komórki iPSC-MSC wprowadzono na rusztowaniu powstałym z fibrynogenu pod wpływem działania trombiny. Źródłem komórek iPSC były komórki somatyczne pobrane z błony śluzowej jamy ustnej, znajdujące się w obrębie włókien ozębnej oraz w płucach.

Komórki iPSC-MSC, których użyto do dalszych badań fenotypowo i funkcjonalnie przypominały komórki MSC, występujące naturalnie w tkankach dojrzałego organizmu. Ponadto wykazano ekspresję markerów typowych dla MSC (CD73, CD90, CD105, CD146), nie stwierdzono natomiast ekspresji markerów pluripotencji (TRA160, TRA 161 oraz alkalicznej fosfatazy) oraz markerów hematopoetycznych CD14, CD34, CD45. Komórki *in vitro* miały zdolność do różnicowania się w komórki kościotwórcze, chrząstkotwórcze oraz komórki tkanki tłuszczowej. Badania *in vivo* podskórnej implantacji komórek iPSC-MSC myszom NOD/SCID wykazało, że jedynie komórki, które otrzymano z fibroblastów pobranych z tkanki łącznej ozębnej, były zdolne do wytwarzania struktury zmineralizowanej, przypominającą budową histologiczną dojrzałą kość.

Analiza histomorfometryczna przeprowadzona w 2 tygodnie po wszczępieniu iPSC-MSC wykazała wzrost tkanki zmineralizowanej w porównaniu z grupą kontrolną oraz potwierdziła ich potencjał terapeutyczny.

Drugie badanie przeprowadzili Yang i wsp. [117]; eksperyment polegał na ocenie przydatności komórek iPSC-MSC w hamowaniu procesu zapalnego rozwijającego się w obrębie tkanek przyzębia (periodontitis). Komórki macierzyste podawano dożylnie oraz miejscowo z użyciem płynnej macierzy międzykomórkowej Matrigel. Linie hodowlane obejmowały standardowe komórki iPSC-MSC oraz komórki, które wykazywały zwiększoną ekspresję genu *tsg-6* (tumor necrosis factor a stimulated gene).

Białko TSG-6, kodowane przez *tsg-6*, stwierdzono w wielu typach komórek (fibroblastach, neutrofilach, makrofagach, komórkach dendrytycznych i chondrocytach) i narządów (mięśni szkieletowych, sercu, nerkach oraz jajniku). TSG-6 bierze udział w odpowiedzi organizmu na choroby, którym towarzyszy stan zapalny. Białko to uczestniczy w syntezie i organizacji macierzy zewnątrzkomórkowej przez interakcje z jej składnikami, przede wszystkim z glikozaminoglikanami (hialuronian, siarczan-4-chondroityny, heparyna) oraz proteoglikanami (agrekana, inhibitor  $\alpha$  trypsyny – Ial (interia  $\alpha$  tripsin

inhibitor)). TSG-6 jest również zaangażowane w procesy proliferacji komórek, hamowania migracji neutrofilów, a także w regulację ekspresji antygenu CD44, który jest głównym receptorem hialuronianu w komórkach ziarnistych [117].

Na podstawie analiz histologicznych przeprowadzonych przez Yanga i wsp. [117], stwierdzono redukcję intensywności nacieków zapalnych po leczeniu z zastosowaniem komórek macierzystych. Ich spadek wiązał się także ze zmniejszeniem poziomu prozapalnych cytokin w surowicy krwi. Leczenie z zastosowaniem komórek iPSC-MSC/TSG-6 ograniczyło utratę kości wyrostków zębodołowych wokół toczącego się procesu zapalnego.

### ZASTOSOWANIE iPSC-MSC W REGENERACJI KOŚCI

Stosowanie niezróżnicowanych iPSC w praktyce klinicznej wiąże się z dużym ryzykiem wzbudzenia procesu nowotworowego w organizmie biorcy. Komórki te mogą ulegać spontanicznym i niekontrolowanym podziałom, co może spowodować rozwój potworniaków, nowotworów, w których dochodzi do rozrostu komórek, mających cechy wszystkich trzech listków zarodkowych. Wysoce wyspecjalizowane komórki osteoprogenitorowe (iPSC-MSC) powstałe z komórek iPSC nie mają tego ograniczenia. Stanowią bogate źródło wysokiej jakości komórek macierzystych, które można bezpiecznie wykorzystać w stomatologii regeneracyjnej.

Zastosowanie komórek iPSC w procesie odnowy tkanki kostnej jest zagadnieniem nowym, znanych jest kilkanaście prac z tego zakresu. Potwierdzają e tezę, że komórki te mogą być z powodzeniem przekształcone w osteoblastyczne komórki progenitorowe, mają aktywność alkalicznej fosfatazy i są zaangażowane w wytwarzanie nowej kości, w tym mineralnej macierzy międzykomórkowej. Mogą być podstawą terapii obejmującej tkankową regenerację kości [108].

Populację progenitorowych komórek kościotwórczych można otrzymać w dwojaki sposób: bezpośrednio przez różnicowanie komórek iPSC [47,71,76,107] lub pośrednio przez otrzymanie komórek iPSC-MSC, a dopiero w następnej kolejności komórek osteoprogenitorowych [98,104,108].

Philips i wsp. [76] porównali 4 różne protokoły otrzymywania komórek progenitorowych z zastosowaniem następujących dodatków:

- deksametazon i kwas askorbinowy;
- kwas retinowy;
- rapamycyna;
- fibroblasty oraz białko morfogenetyczne kości 4.

Badania potwierdziły nowotworzenie kości w przypadku komórek osteoprogenitorowych otrzymanych w wyniku zastosowania protokołów pierwszego i czwartego.

Kanke i wsp. [47] wykorzystali cztery niewielkich roz-

miarów cząsteczki: 1) CHIR99021 [CHIR]; 2) cykloпамine [CYC]; 3) smoothened agonist [SAG]; 4) pochodną heliokasantyny [TH]. Ich strategia postępowania zakładała początkową indukcję mezodermy, poprzedzoną indukcją osteoblastów i ostateczną fazą dojrzewania, poprawia ekspresję genów i białek związanych z osteoblastami.

Ochiai-Shino i wsp. [71] wykorzystali transformujący czynnik wzrostu  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ ), insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (somatomedyna-C, insulin-like growth factor 1, IGF-1) oraz czynnik wzrostu fibroblastów 2 (fibroblast growth factor 2, FGF-2) do pobudzenia różnicowania komórek iPSC w kierunku komórek osteoprogenitorowych. Wykorzystanie wymienionych czynników wzrostu zwiększyło częstość wytwarzania komórek. Otrzymane tą metodą komórki charakteryzowały się wysokim poziomem ekspresji czynnika transkrypcyjnego Osterix (Osx). Oprócz Runx2 Osx jest głównym regulatorem, charakterystycznym dla tworzenia kości i różnicowania komórek progenitorowych w osteoblasty, odpowiada za ich prawidłowe dojrzewanie i funkcjonowanie [71].

Wang i wsp. [107] wykorzystali do pobudzenia procesu przekształcania komórek iPSC (zamiast kombinacji czynników wzrostu) syntetyczny materiał tworzący trójwymiarową sieć krystaliczną, utworzony z polidopaminy oraz chitozanu (carboxymethyl chitosan), co przyspiesza hodowlę komórek progenitorowych.

Villa-Diaz i wsp. [104] przeszczepiali myszom, komórki otrzymane w procesie różnicowania iPSC-MSC i potwierdzono syntezę nowej kości *de novo*, w porównaniu z grupą kontrolną. Co więcej, przeszczepione komórki zostały zidentyfikowane w obrębie nowej kości, co potwierdza fakt, że wzięły one czynny udział w procesie jej syntezy.

Tang i wsp. [98] wykorzystali cement kostny oparty na fosforanie (V) wapnia (calcium phosphate cement – CPC), tworzący rusztowanie dla komórek osteogennych, do pobudzenia komórek iPSC-MSC do różnicowania się w kierunku osteogenezy. Zaobserwowano zwiększoną ekspresję głównych w procesie osteogenezy znaczników alkalicznej fosfatazy oraz osteoklacy, które są białkami swoistymi dla tkanki kostnej i są charakterystyczne dla terminalnie zróżnicowanych osteoblastów, a także dla kolagenu typ I oraz RUNX2 (runt-related transcription factor 2), który jest uważany za nadrzędny regulator procesu kościotworzenia. Jego niedobór prowadzi do różnych typów dysplazji kostnej [98].

### PODSUMOWANIE

Jama ustna jest bogatym i wydaje się nieograniczonym źródłem komórek macierzystych. Łatwy dostęp do jej anatomicznych struktur sprawia, że możliwe staje się nieinwazyjne pobranie próbek tkankowych do dalszych badań w warunkach ambulatoryjnych, bez generowania dodatkowych kosztów. Często komórki te mogą być

pozyskane z materiału będącego „odpadem medycznym”. Można przypuszczać, że w niedalekiej przyszłości terapię z zastosowaniem komórek macierzystych wcho-

dzić będą w skład standardowych, rutynowych rozwiązań terapeutycznych proponowanych pacjentom przez ogólnie praktykujących lekarzy stomatologów.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Agata H., Asahina I., Yamazaki Y., Uchida M., Shinohara Y., Honda M.J., Kagami H., Ueda M.: Effective bone engineering with periosteum-derived cells. *J. Dent. Res.*, 2007; 86: 79-83
- [2] Aghaloo T.L., Chaichanasakul T., Bezouglaia O., Kang B., Franco R., Dry S.M., Atti E., Tetradis S.: Osteogenic potential of mandibular vs. long-bone marrow stromal cells. *J. Dent. Res.*, 2010; 89: 1293-1298
- [3] Akintoye S.O., Lam T., Shi S., Brahim J., Collins M.T., Robey P.G.: Skeletal site-specific characterization of orofacial and iliac crest human bone marrow stromal cells in same individuals. *Bone*, 2006; 38: 758-768
- [4] Allen M.R., Hock J.M., Burr D.B.: Periosteum: biology, regulation, and response to osteoporosis therapies. *Bone*, 2004; 35: 1003-1012
- [5] Arnsdorf E.J., Jones L.M., Carter D.R., Jacobs C.R.: The periosteum as a cellular source for functional tissue engineering. *Tissue Eng. Part A*, 2009; 15: 2637-2642
- [6] Ball M.D., Bonzani I.C., Bovis M.J., Williams A., Stevens M.M.: Human periosteum is a source of cells for orthopaedic tissue engineering: a pilot study. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2011; 469: 3085-3093
- [7] Bar-Nur O., Russ H.A., Efrat S., Benvenisty N.: Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. *Cell Stem Cell*, 2011; 9: 17-23
- [8] Battula V.L., Tremel S., Bareiss P.M., Gieseke F., Roelofs H., de Zwart P., Müller I., Schewe B., Skutella T., Fibbe W.E., Kanz L., Bühring H.J.: Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. *Haematologica*, 2009; 94: 173-184
- [9] Beltrão-Braga P.C., Pignatari G.C., Maiorka P.C., Oliveira N.A., Lizer N.F., Wenceslau C.V., Miglino M.A., Muotri A.R., Kerkis I.: Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from human immature dental pulp stem cells. *Cell Transplant.*, 2011; 20: 1707-1719
- [10] Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey P.G.: Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, 2001; 19: 180-192
- [11] Bonab M.M., Alimoghaddam K., Talebian F., Ghaffari S.H., Ghamvazadeh A., Nikbin B.: Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol.*, 2006; 7: 14
- [12] Borstlap W.A., Heidbuchel K.L., Freihofer H.P., Kuijpers-Jagtman A.M.: Early secondary bone grafting of alveolar cleft defects. A comparison between chin and rib grafts. *J. Craniomaxillofac. Surg.*, 1990; 18: 201-205
- [13] Bühring H.J., Battula V.L., Tremel S., Schewe B., Kanz L., Vogel W.: Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2007; 1106: 262-271
- [14] Cai J., Zhang Y., Liu P., Chen S., Wu X., Sun Y., Li A., Huang K., Luo R., Wang L., Liu Y., Zhou T., Wei S., Pan G., Pei D.: Generation of tooth-like structures from integration-free human urine induced pluripotent stem cells. *Cell Regen.*, 2013; 2: 6
- [15] Chai Y., Jiang X., Ito Y., Bringas P.Jr., Han J., Rowitch D.H., Soriano P., McMahon A.P., Sucov H.M.: Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*, 2000; 127: 1671-1679
- [16] Chung I.H., Yamaza T., Zhao H., Choung P.H., Shi S., Chai Y.: Stem cell property of postmigratory cranial neural crest cells and their utility in alveolar bone regeneration and tooth development. *Stem Cells*, 2009; 27: 866-877
- [17] Cicconetti A., Sacchetti B., Bartoli A., Michienzi S., Corsi A., Funari A., Robey P.G., Bianco P., Riminucci M.: Human maxillary tuberosity and jaw periosteum as sources of osteoprogenitor cells for tissue engineering. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 2007; 104: 618.e1-618.12
- [18] Cox C.F., White K.C., Ramus D.L., Farmer J.B., Snuggs H.M.: Reparative dentin: factors affecting its deposition. *Quintessence Int.*, 1985, 1992; 23: 257-270
- [19] Crespi R., Vinci R., Capparè P., Gherlone E., Romanos G.E.: Calvarial versus iliac crest for autologous bone graft material for a sinus lift procedure: a histomorphometric study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 2007; 22: 527-532
- [20] Dambrot C., van de Pas S., van Zijl L., Brändl B., Wang J.W., Schaliq M.J., Hoeben R.C., Atsma D.E., Mikkers H.M., Mummery C.L., Freund C.: Polyclonal lentivirus induced pluripotent stem cells from skin biopsies after long term storage, blood outgrowth endothelial cells and cells from milk teeth. *Differentiation*, 2013; 85: 101-109
- [21] De Bari C., Dell'Accio F., Vanlauwe J., Eyckmans J., Khan I.M., Archer C.W., Jones E.A., McGonagle D., Mitsiadis T.A., Pitzalis C., Luyten F.P.: Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheum.*, 2006; 54: 1209-1221
- [22] Denny P.C., Denny P.A.: Dynamics of parenchymal cell division, differentiation, and apoptosis in the young adult female mouse submandibular gland. *Anat. Rec.*, 1999; 254: 408-417
- [23] Derubeis A.R., Cancedda R.: Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances. *Ann. Biomed. Eng.*, 2004; 32: 160-165
- [24] Ding G., Wang W., Liu Y., An Y., Zhang C., Shi S., Wang S.: Effect of cryopreservation on biological and immunological properties of stem cells from apical papilla. *J. Cell. Physiol.*, 2010; 223: 415-422
- [25] Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E.: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006; 8: 315-317
- [26] Donovan M.G., Dickerson N.C., Hellstein J.W., Hanson L.J.: Autologous calvarial and iliac onlay bone grafts in miniature swine. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 1993; 51: 898-903
- [27] Duan X., Tu Q., Zhang J., Ye J., Sommer C., Mostoslavsky G., Kaplan D., Yang P., Chen J.: Application of induced pluripotent stem (iPS) cells in periodontal tissue regeneration. *J. Cell. Physiol.*, 2011; 226: 150-157
- [28] Egusa H., Okita K., Kayashima H., Yu G., Fukuyasu S., Saeki M., Matsumoto T., Yamanaka S., Yatani H.: Gingival fibroblasts as a promising source of induced pluripotent stem cells. *PLoS One*, 2010; 5: e12743
- [29] Egusa H., Schweizer F.E., Wang C.C., Matsuka Y., Nishimura I.: Neuronal differentiation of bone marrow-derived stromal stem cells involves suppression of discordant phenotypes through gene silencing. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 23691-23697
- [30] Evans M.J., Kaufman M.H.: Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature*, 1981; 292: 154-156
- [31] Gorjup E., Danner S., Rotter N., Habermann J., Brassat U., Brumendorf T.H., Wien S., Meyerhans A., Wollenberg B., Kruse C., von Briesen H.: Glandular tissue from human pancreas and salivary gland yields similar stem cell populations. *Eur. J. Cell Biol.*, 2009; 88: 409-421

- [32] Gottlow J., Nyman S., Lindhe J., Karring T., Wennström J.: New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. *Case reports. J. Clin. Periodontol.*, 1986; 13: 604-616
- [33] Gronthos S., Mankani M., Brahimi 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
- [34] Han J., Okada H., Takai H., Nakayama Y., Maeda T., Ogata Y.: Collection and culture of alveolar bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells from older individuals. *J. Cell. Biochem.*, 2009; 107: 1198-1204
- [35] Harada H., Kettunen P., Jung H.S., Mustonen T., Wang Y.A., Thesleff I.: Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J. Cell Biol.*, 1999; 147: 105-120
- [36] Hu Q., Friedrich A.M., Johnson L.V., Clegg D.O.: Memory in induced pluripotent stem cells: reprogrammed human retinal-pigmented epithelial cells show tendency for spontaneous redifferentiation. *Stem Cells*, 2010; 28: 1981-1991
- [37] 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
- [38] Hung C.N., Mar K., Chang H.C., Chiang Y.L., Hu H.Y., Lai C.C., Chu R.M., Ma C.M.: A comparison between adipose tissue and dental pulp as sources of MSCs for tooth regeneration. *Biomaterials*, 2011; 32: 6995-7005
- [39] Hynes K., Menicanin D., Han J., Marino V., Mrozik K., Gronthos S., Bartold P.M.: Mesenchymal stem cells from iPSCs facilitate periodontal regeneration. *J. Dent. Res.*, 2013; 92: 833-839
- [40] Igarashi A., Segoshi K., Sakai Y., Pan H., Kanawa M., Higashi Y., Sugiyama M., Nakamura K., Kurihara H., Yamaguchi S., Tsuji K., Kawamoto T., Kato Y.: Selection of common markers for bone marrow stromal cells from various bones using real-time RT-PCR: effects of passage number and donor age. *Tissue Eng.*, 2007; 13: 2405-2417
- [41] Ishizaka R., Iohara K., Murakami M., Fukuta O., Nakashima M.: Regeneration of dental pulp following pulpectomy by fractionated stem/progenitor cells from bone marrow and adipose tissue. *Biomaterials*, 2012; 33: 2109-2118
- [42] Izadpanah R., Trygg C., Patel B., Kriedt C., Dufour J., Gimble J.M., Bunnell B.A.: Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J. Cell. Biochem.*, 2006; 99: 1285-1297
- [43] Izumi K., Feinberg S.E., Iida A., Yoshizawa M.: Intraoral grafting of an ex vivo produced oral mucosa equivalent: a preliminary report. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 2003; 32: 188-197
- [44] Izumi K., Feinberg S.E., Terashi H., Marcelo C.L.: Evaluation of transplanted tissue-engineered oral mucosa equivalents in severe combined immunodeficient mice. *Tissue Eng.*, 2003; 9: 163-174
- [45] Izumi K., Tobita T., Feinberg S.E.: Isolation of human oral keratinocyte progenitor/stem cells. *J. Dent. Res.*, 2007; 86: 341-346
- [46] Jiang Y., Mishima H., Sakai S., Liu Y.K., Ohyabu Y., Uemura T.: Gene expression analysis of major lineage-defining factors in human bone marrow cells: effect of aging, gender, and age-related disorders. *J. Orthop. Res.*, 2008; 26: 910-917
- [47] Kanke K., Masaki H., Saito T., Komiyama Y., Hojo H., Nakauchi H., Lichtler A.C., Takato T., Chung U.I., Ohba S.: Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into osteoblasts using four small molecules under serum-free and feeder-free conditions. *Stem Cell Reports*, 2014; 2: 751-760
- [48] Kern S., Eichler H., Stoeve J., Klüter H., Bieback K.: Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, 2006; 24: 1294-1301
- [49] Kim K., Doi A., Wen B., Ng K., Zhao R., Cahan P., Kim J., Aryee M.J., Ji H., Ehrlich L.I., Yabuuchi A., Takeuchi A., Cunniff K.C., Hongguang H., McKinney-Freeman S. i wsp.: Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2010; 467: 285-290
- [50] Kishi T., Takao T., Fujita K., Taniguchi H.: Clonal proliferation of multipotent stem/progenitor cells in the neonatal and adult salivary glands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006; 340: 544-552
- [51] Kitamura C., Kimura K., Nakayama T., Terashita M.: Temporal and spatial expression of c-jun and jun-B proto-oncogenes in pulp cells involved with reparative dentinogenesis after cavity preparation of rat molars. *J. Dent. Res.*, 1999; 78: 673-680
- [52] Koole R., Bosker H., van der Dussen F.N.: Late secondary autogenous bone grafting in cleft patients comparing mandibular (ectomesenchymal) and iliac crest (mesenchymal) grafts. *J. Craniomaxillofac. Surg.*, 1989; 17: 28-30
- [53] Kulakov A.A., Goldshtein D.V., Grigoryan A.S., Rzhanchinova A.A., Alekseeva I.S., Arutyunyan I.V., Volkov A.V.: Clinical study of the efficiency of combined cell transplant on the basis of multipotent mesenchymal stromal adipose tissue cells in patients with pronounced deficit of the maxillary and mandibular bone tissue. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2008; 146: 522-525
- [54] Langer R., Vacanti J.P.: *Tissue engineering*. Science, 1993; 260: 920-926
- [55] Lombaert I.M.A., Brunsting J.F., Wierenga P.K., Faber H., Stokman M.A., Kok T., Visser W.H., Kampinga H.H., de Haan G., Coppes R.P.: Rescue of salivary gland function after stem cell transplantation in irradiated glands. *PLoS One*, 2008; 3: e2063
- [56] Man Y.G., Ball W.D., Marchetti L., Hand A.R.: Contributions of intercalated duct cells to the normal parenchyma of submandibular glands of adult rats. *Anat. Rec.*, 2001; 263: 202-214
- [57] Marynka-Kalmani K., Treves S., Yafee M., Rachima H., Gafni Y., Cohen M.A., Pitaru S.: The lamina propria of adult human oral mucosa harbors a novel stem cell population. *Stem Cells*, 2010; 28: 984-995
- [58] Matsubara T., Suardita K., Ishii M., Sugiyama M., Igarashi A., Oda R., Nishimura M., Saito M., Nakagawa K., Yamanaka K., Miyazaki K., Shimizu M., Bhawal U.K., Tsuji K., Nakamura K., Kato Y.: Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. *J. Bone Miner. Res.*, 2005; 20: 399-409
- [59] Matsumoto S., Okumura K., Ogata A., Hisatomi Y., Sato A., Hattori K., Matsumoto M., Kaji Y., Takahashi M., Yamamoto T., Nakamura K., Endo F.: Isolation of tissue progenitor cells from duct-ligated salivary glands of swine. *Cloning Stem Cells*, 2007; 9: 176-190
- [60] Mendes S.C., Tibbe J.M., Veenhof M., Bakker K., Both S., Platenburg P.P., Oner F.C., de Bruijn J.D., van Blitterswijk C.A.: Bone tissue-engineered implants using human bone marrow stromal cells: effect of culture conditions and donor age. *Tissue Eng.*, 2002; 8: 911-920
- [61] Mesimäki K., Lindroos B., Törnwall J., Mauno J., Lindqvist C., Kontio R., Miettinen S., Suuronen R.: Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 2009; 38: 201-209
- [62] 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: 5807-5812
- [63] Miyoshi K., Tsuji D., Kudoh K., Satomura K., Muto T., Itoh K., Noma T.: Generation of human induced pluripotent stem cells from oral mucosa. *J. Biosci. Bioeng.*, 2010; 110: 345-350
- [64] Morsczeck C., Götz W., Schierholz J., Zeilhofer F., Kühn U., Möhl C., Sippel C., Hoffmann K.H.: Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.*, 2005; 24: 155-165
- [65] Mueller S.M., Glowacki J.: Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J. Cell. Biochem.*, 2001; 82: 583-590
- [66] Nagata M., Hoshina H., Li M., Arasawa M., Uematsu K., Ogawa S., Yamada K., Kawase T., Suzuki K., Ogose A., Fuse I., Okuda K., Uoshima K., Nakata K., Yoshie H., Takagi R.: A clinical study of alveolar

- bone tissue engineering with cultured autogenous periosteal cells: coordinated activation of bone formation and resorption. *Bone*, 2012; 50: 1123-1129
- [67] Nanduri L.S., Maimets M., Pringle S.A., van der Zwaag M., van Os R.P., Coppes R.P.: Regeneration of irradiated salivary glands with stem cell marker expressing cells. *Radiother. Oncol.*, 2011; 99: 367-372
- [68] Neumann Y., David R., Stiubea-Cohen R., Orbach Y., Aframian D.J., Palmon A.: Long-term cryopreservation model of rat salivary gland stem cells for future therapy in irradiated head and neck cancer patients. *Tissue Eng. Part C Methods*, 2012; 18: 710-718
- [69] Nishida S., Endo N., Yamagiwa H., Tanizawa T., Takahashi H.E.: Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *J. Bone Miner. Metab.*, 1999; 17: 171-177
- [70] Nyman S., Gottlow J., Lindhe J., Karring T., Wennstrom J.: New attachment formation by guided tissue regeneration. *J. Periodontal Res.*, 1987; 22: 252-254
- [71] Ochiai-Shino H., Kato H., Sawada T., Onodera S., Saito A., Takato T., Shibahara T., Muramatsu T., Azuma T.: A novel strategy for enrichment and isolation of osteoprogenitor cells from induced pluripotent stem cells based on surface marker combination. *PLoS One*, 2014; 9: e99534
- [72] Oda Y., Yoshimura Y., Ohnishi H., Tadokoro M., Katsube Y., Sasao M., Kubo Y., Hattori K., Saito S., Horimoto K., Yuba S., Ohgushi H.: Induction of pluripotent stem cells from human third molar mesenchymal stromal cells. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 29270-29278
- [73] Ohi Y., Qin H., Hong C., Blouin L., Polo J.M., Guo T., Qi Z., Downey S.L., Manos P.D., Rossi D.J., Yu J., Hebrok M., Hochedlinger K., Costello J.F., Song J.S., Ramalho-Santos M.: Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPSCs. *Nat. Cell Biol.*, 2011; 13: 541-549
- [74] Otsu K., Kishigami R., Oikawa-Sasaki A., Fukumoto S., Yamada A., Fujiwara N., Ishizeki K., Harada H.: Differentiation of induced pluripotent stem cells into dental mesenchymal cells. *Stem Cells Dev.*, 2012; 21: 1156-1164
- [75] Patil R., Kumar B.M., Lee W.J., Jeon R.H., Jang S.J., Lee Y.M., Park B.W., Byun J.H., Ahn C.S., Kim J.-., Rho G.J.: Multilineage potential and proteomic profiling of human dental stem cells derived from a single donor. *Exp. Cell Res.*, 2014; 320: 92-107
- [76] Phillips M.D., Kuznetsov S.A., Cherman N., Park K., Chen K.G., McClendon B.N., Hamilton R.S., McKay R.D., Chenoweth J.G., Mallon B.S., Robey P.G.: Directed differentiation of human induced pluripotent stem cells toward bone and cartilage: in vitro versus in vivo assays. *Stem Cells Transl. Med.*, 2014; 3: 867-878
- [77] Pieri F., Lucarelli E., Corinaldesi G., Aldini N.N., Fini M., Parrilli A., Dozza B., Donati D., Marchetti C.: Dose-dependent effect of adipose-derived adult stem cells on vertical bone regeneration in rabbit calvarium. *Biomaterials*, 2010; 31: 3527-3535
- [78] Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999; 284: 143-147
- [79] Pojda Z., Machaj E., Kurzyk A., Mazur S., Dębski T., Gilewicz J., Wysocki J.: Mezenchymalne komórki macierzyste. *Postępy Biochem.*, 2013; 59: 187-197
- [80] Poulosom R., Alison M.R., Forbes S.J., Wright N.A.: Adult stem cell plasticity. *J. Pathol.*, 2002; 197: 441-456
- [81] Ruch J.V.: Odontoblast commitment and differentiation. *Biochem. Cell Biol.*, 1998; 76: 923-938
- [82] Sakaguchi Y., Sekiya I., Yagishita K., Muneta T.: Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.*, 2005; 52: 2521-2529
- [83] Sato A., Okumura K., Matsumoto S., Hattori K., Hattori S., Shinohara M., Endo F.: Isolation, tissue localization, and cellular characterization of progenitors derived from adult human salivary glands. *Cloning Stem Cells*, 2007; 9: 191-205
- [84] Schmelzeisen R., Schimming R., Sittlinger M.: Making bone: implant insertion into tissue-engineered bone for maxillary sinus floor augmentation—a preliminary report. *J. Craniomaxillofac. Surg.*, 2003; 31: 34-39
- [85] Schofield R.: The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 1978; 4: 7-25
- [86] Seo B.M., Miura M., Gronthos S., Bartold P.M., Batouli S., Brahimi J., Young M., Robey P.G., Wang C.Y., Shi S.: Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 2004; 364: 149-155
- [87] Seo B.M., Miura M., Sonoyama W., Coppe C., Stanyon R., Shi S.: Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *J. Dent. Res.*, 2005; 84: 907-912
- [88] Sikora M.A., Olszewski W.L.: Komórki macierzyste – biologia i zastosowanie terapeutyczne. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2004; 58: 202-208
- [89] Simmons P.J., Gronthos S., Zannettino A., Ohta S., Graves S.: Isolation, characterization and functional activity of human marrow stromal progenitors in hemopoiesis. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1994; 389: 271-280
- [90] Soltan M., Smiler D., Soltan C.: The inverted periosteal flap: a source of stem cells enhancing bone regeneration. *Implant Dent.*, 2009; 18: 373-379
- [91] Sonoyama W., Liu Y., Fang D., Yamaza T., Seo B.M., Zhang C., Liu H., Gronthos S., Wang C.Y., Wang S., Shi S.: Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One*, 2006; 1: e79
- [92] Sonoyama W., Liu Y., Yamaza T., Tuan R.S., Wang S., Shi S., Huang G.T.: Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J. Endod.*, 2008; 34: 166-171
- [93] Stenderup K., Justesen J., Eriksen E.F., Rattan S.I., Kassem M.: Number and proliferative capacity of osteogenic stem cells are maintained during aging and in patients with osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.*, 2001; 16: 1120-1129
- [94] Strem B.M., Hicok K.C., Zhu M., Wulur I., Alfonso Z., Schreiber R.E., Fraser J.K., Hedrick M.H.: Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J. Med.*, 2005; 54: 132-141
- [95] Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S.: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007; 131: 861-872
- [96] Takahashi K., Yamanaka S.: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006; 126: 663-676
- [97] Tamaoki N., Takahashi K., Tanaka T., Ichisaka T., Aoki H., Takeda-Kawaguchi T., Iida K., Kunisada T., Shibata T., Yamanaka S., Tezuka K.: Dental pulp cells for induced pluripotent stem cell banking. *J. Dent. Res.*, 2010; 89: 773-778
- [98] Tang M., Chen W., Liu J., Weir M.D., Cheng L., Xu H.H.: Human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cell seeding on calcium phosphate scaffold for bone regeneration. *Tissue Eng. Part A*, 2014; 20: 1295-1305
- [99] Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M.: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998; 282: 1145-1147
- [100] Tobita M., Uysal A.C., Ogawa R., Hyakusoku H., Mizuno H.: Periodontal tissue regeneration with adipose-derived stem cells. *Tissue Eng. Part A*, 2008; 14: 945-953

- [101] Tomar G.B., Srivastava R.K., Gupta N., Barhanpurkar A.P., Pote S.T., Jhaveri H.M., Mishra G.C., Wani M.R.: Human gingiva-derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010; 393: 377-383
- [102] Ueda M., Yamada Y., Kagami H., Hibi H.: Injectable bone applied for ridge augmentation and dental implant placement: human progress study. *Implant Dent.*, 2008; 17: 82-90
- [103] Ueno T., Honda K., Hirata A., Kagawa T., Kanou M., Shirasu N., Sawaki M., Yamachika E., Mizukawa N., Sugahara T.: Histological comparison of bone induced from autogenously grafted periosteum with bone induced from autogenously grafted bone marrow in the rat calvarial defect model. *Acta Histochem.*, 2008; 110: 217-223
- [104] Villa-Diaz L.G., Brown S.E., Liu Y., Ross A.M., Lahann J., Parent J.M., Krebsbach P.H.: Derivation of mesenchymal stem cells from human induced pluripotent stem cells cultured on synthetic substrates. *Stem Cells*, 2012; 30: 1174-1181
- [105] Wada N., Wang B., Lin N.H., Laslett A.L., Gronthos S., Bartold P.M.: Induced pluripotent stem cell lines derived from human gingival fibroblasts and periodontal ligament fibroblasts. *J. Periodontal Res.*, 2011; 46: 438-447
- [106] Wang L., Shen H., Zheng W., Tang L., Yang Z., Gao Y., Yang Q., Wang C., Duan Y., Jin Y.: Characterization of stem cells from alveolar periodontal ligament. *Tissue Eng. Part A*, 2011; 17: 1015-1026
- [107] Wang M., Deng Y., Zhou P., Luo Z., Li Q., Xie B., Zhang X., Chen T., Pei D., Tang Z., Wei S.: In vitro culture and directed osteogenic differentiation of human pluripotent stem cells on peptides-decorated two-dimensional microenvironment. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2015; 7: 4560-4572
- [108] Wang P., Liu X., Zhao L., Weir M.D., Sun J., Chen W., Man Y., Xu H.H.: Bone tissue engineering via human induced pluripotent, umbilical cord and bone marrow mesenchymal stem cells in rat cranium. *Acta Biomater.*, 2015; 18: 236-248
- [109] Wang Q., Huang C., Zeng F., Xue M., Zhang X.: Activation of the Hh pathway in periosteum-derived mesenchymal stem cells induces bone formation in vivo: implication for postnatal bone repair. *Am. J. Pathol.*, 2010; 177: 3100-3111
- [110] Waś H.: Komórki macierzyste, a starzenie. *Postępy Biochem.*, 2014; 60: 161-176
- [111] Wen X., Nie X., Zhang L., Liu L., Deng M.: Adipose tissue-derived stem cells acquire cementoblast features treated with dental follicle cell conditioned medium containing dentin non-collagenous proteins *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011; 409: 583-589
- [112] Wobus A.M., Boheler K.R.: Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol. Rev.*, 2005; 85: 635-678
- [113] Wojtowicz A., Perek J., Urbanowska E., Kamiński A., Olender E., Jodko M.: Leczenie defektów tkanki kostnej szczęk z wykorzystaniem autologicznych preosteoblastów na nośniku allogenicznym. *Dent. Med. Probl.*, 2013; 50: 20-29
- [114] Wray J., Kalkan T., Smith A.G.: The ground state of pluripotency. *Biochem. Soc. Trans.*, 2010; 38: 1027-1032
- [115] Yamada Y., Ueda M., Hibi H., Baba S.: A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology: a clinical case report. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.*, 2006; 26: 363-369
- [116] Yan X., Qin H., Qu C., Tuan R.S., Shi S., Huang G.T.: iPSC cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin. *Stem Cells Dev.*, 2010; 19: 469-480
- [117] Yang H., Aprecio R.M., Zhou X., Wang Q., Zhang W., Ding Y., Li Y.: Therapeutic effect of TSG-6 engineered iPSC-derived MSCs on experimental periodontitis in rats: a pilot study. *PLoS One*, 2014; 9: e100285
- [118] Zhang Q., Shi S., Liu Y., Uyanne J., Shi Y., Shi S., Le A.D.: Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J. Immunol.*, 2009; 183: 7787-7798
- [119] Zhu S.J., Choi B.H., Huh J.Y., Jung J.H., Kim B.Y., Lee S.H.: A comparative qualitative histological analysis of tissue-engineered bone using bone marrow mesenchymal stem cells, alveolar bone cells, and periosteal cells. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 2006; 101: 164-169
- [120] Zins J.E., Whitaker L.A.: Membranous versus endochondral bone: implications for craniofacial reconstruction. *Plast. Reconstr. Surg.*, 1983; 72: 778-785

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.