

EWA MARIA CHOMIK

**ANALIZA PORÓWNAWCZA KOMÓREK MACIERZYSTYCH
IZOLOWANYCH Z MIAZGI LUDZKIEGO ZĘBA (DPSC – DENTAL PULP
STEM CELLS) ORAZ BRODAWKI WIERZCHOŁKOWEJ (SCAP – STEM
CELLS FROM HUMAN APICAL PAPILLA) *IN VITRO*.**

PRACA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

Z KATEDRY I ZAKŁADU PROTETYKI STOMATOLOGICZNEJ
GDAŃSKIEGO UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO.

PROMOTOR:

DR HAB. N MED. IZABELA MACIEJEWSKA

PRACA WYKONANA W ZAKŁADZIE MEDYCYNY MOLEKULARNEJ KATEDRY
BIOCHEMII KLINICZNEJ GDAŃSKIEGO UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO,
FINANSOWANA Z PROJEKTU BADAWCZEGO NR 1283/B/P01/2011/40 IM.

KIEROWNIK ZAKŁADU:

PROF. DR HAB. TADEUSZ PAWEŁCZYK

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

GDAŃSK 2012

*Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi,
Pani Dr hab. Izabeli Maciejewskiej za opiekę merytoryczną,
wielką życzliwość, cierpliwość i wyrozumiałość,
a także za ogrom pracy, wsparcia i pomoc podczas powstawania
i redagowania niniejszej pracy.*

*Serdecznie dziękuję Panu Profesorowi Tadeuszowi Pawełczykowi,
za możliwość prowadzenia badań w Zakładzie Medycyny Molekularnej,
oraz Panu Profesorowi Adamowi Włodarkiewiczowi
za umożliwienie wykonania części klinicznej niniejszej pracy
w Przychodni Chirurgii Stomatologicznej.*

*Koleżankom z Zakładu Medycyny Molekularnej dziękuję za wszelką pomoc,
cenne rady i wskazówki oraz wspianą atmosferę pracy, w szczególności:
Monice Sakowicz-Burkiewicz,
Agnieszce Kitowskiej.*

*Mojej Rodzinie dziękuję, że jest zawsze ze mną, w szczególności mojemu
mężowi Piotrowi, za cierpliwość i dobre słowo, które wielokrotnie było mi
bardzo potrzebne przy tworzeniu tej pracy.*

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI	3
OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW I SYMBOLI UŻYWANYCH W PRACY	5
1. STRESZCZENIE	7
2. SUMMARY	10
3. WSTĘP	12
Odontogeneza.....	13
Powstawanie i struktura zębiny.....	17
Komórki macierzyste obecne w miazdze zęba i brodawce wierzchołkowej	22
Analiza porównawcza DPSC vs. SCAP	22
4. UZASADNIENIE I CEL PODJĘTYCH BADAŃ	28
5. MATERIAŁ I METODY	29
5.1. Materiał badań.....	29
5.2. Izolacja miazgi zęba oraz brodawki wierzchołkowej	29
5.3. Izolacja komórek DPSC i SCAP	31
5.4. Hodowle komórkowe	31
5.5. Sortowanie komórek na obecność epitopów STRO-1, CD146, CD34, CD45	32
5.5.1. Selekcja pozytywna komórek z użyciem przeciwciał przeciwko STRO-1 i CD146.....	32
5.5.2. Selekcja negatywna komórek z użyciem przeciwciał przeciwko CD34, CD45. 33	
5.6. Ilościowa ocena potencjału proliferacji	33
5.7. Badanie zdolności tworzenia kolonii (CFU-F, <i>colony forming unit – fibroblast</i>) ...	34
5.8. Badanie odkładania złogów mineralnych metodą <i>von Kossa</i>	35
5.9. Badanie aktywności fosfatazy alkalicznej (ALP)	36
5.10. Badanie poziomu wapnia wewnątrzkomórkowego	37
5.11. Izolacja RNA.....	38
5.12. Reakcja odwrotnej transkrypcji PCR (RT-PCR, <i>reverse transcriptase PCR</i>).....	38
5.13. Ocena ekspresji genów <i>OC</i> , <i>DMP1</i> , <i>DSPP</i> metodą PCR w czasie rzeczywistym	39
5.14. Analiza statystyczna.....	41
6. WYNIKI	42
6.1. Ocena mezenchymalnego fenotypu linii komórek SCAP i DPSC	42
6.2. Ocena potencjału proliferacji komórek macierzystych SCAP i DPSC.....	43
6.3. Ocena zdolności formowania kolonii (CFU-F) komórek macierzystych SCAP i DPSC.....	45
6.4. Ocena odkładania złogów mineralnych przez komórki SCAP i DPSC – barwienie metodą <i>von Kossa</i>	49
6.5. Ocena aktywności fosfatazy alkalicznej (ALP) w komórkach SCAP oraz DPSC ..	52
6.6. Ocena poziomu wapnia w komórkach SCAP i DPSC	54
6.7. Poziom ekspresji genów <i>OC</i> , <i>DMP1</i> oraz <i>DSPP</i> w komórkach SCAP i DPSC.....	56
6.7.1. Ekspresja genu <i>osteokalcyny</i>	56

6.7.2. Ekspresja genu kodującego białko macierzy zębinowej 1	57
6.7.3. Ekspresja genu kodującego białko sialofosforowe zębiny	59
7. DYSKUSJA	62
8. WNIOSKI.....	74
9. LITERATURA.....	75

OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW I SYMBOLI UŻYWANYCH W PRACY.

- ALP** - gen kodujący białko fosfatazę alkaliczną (ang. *Alkaline Phosphatase Gene*)
- ALP** - białko fosfataza alkaliczna (ang. *Alkaline Phosphatase*)
- Asp** - kwas asparaginowy (aminokwas)
- Barx** - czynnik transkrypcyjny
- BMP** - białko macierzy kostnej (ang. *Bone Matrix Protein*)
- BSA** - surowicza albumina wołowa (ang. *Bovine Serum Albumin*)
- CD34** - receptor błonowy prezentowany przez komórki hematopoetyczne
- CD45** - receptor błonowy prezentowany przez leukocyty
- CD146** - receptor błonowy prezentowany przez komórki mezenchymy
- Dlx** - czynnik transkrypcyjny
- DMP1** - gen kodujący białko DMP1 (ang. *gene encoding Dentin Matrix Protein 1*)
- DMP1** - białko macierzy zębinowej 1 (ang. *Dentin Matrix Protein 1*)
- DPSC** - komórki macierzyste miazgi zęba stałego (ang. *Dental Pulp Stem Cells*)
- DPP** - fosfoproteina zębiny (ang. *Dentin Phosphoprotein*)
- DSPP** - gen kodujący białko sialofosforowe zębiny (ang. *gene encoding Dentin Sialophosphoprotein*)
- DSPP** - białko sialofosforowe zębiny (ang. *Dentin Sialophosphoprotein*)
- DSP** - białko sialowe zębiny, produkt rozpadu DSPP (ang. *Dentin Sialoprotein*)
- EDTA** - sól sodowa kwasu etylenodwuaminoczworoctowego
- FBS** - płodowa surowica bydłęca (ang. *Fetal Bovine Serum*)
- FGF** - czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *Fibroblast Growth Factor*)
- GFAP** - kwaśne białko włókienkowe (ang. *Glial Fibrillary Acid Protein*)
- Gli** - czynnik transkrypcyjny
- HERS** - pochewka nabłonkowa Hertwiga (ang. *Hertwig's Epithelial Root Sheath*)
- Lhx** - czynnik transkrypcyjny
- MACS** - metoda sortowania komórek (ang. *Magnetic Activated Cell Sorting*)
- MEPE** - fosfoglikoproteina macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein*)
- Msx** - czynnik transkrypcyjny
- OC** - gen kodujący białko osteokalcynę (ang. *gene encoding Osteocalcin*)
- OC** - białko osteokalcyna (ang. *Osteocalcin*)
- Pax** - czynnik transkrypcyjny
- PBS** - sól fizjologiczna buforowana fosforanem (ang. *Phosphate Buffered Saline*)
- PCR** - reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction*)
- PP** - białko fosforyna (ang. *Phosphophoryn*)
- Runx2** - czynnik transkrypcyjny
- SCAP** - komórki macierzyste z brodawki wierzchołkowej zęba stałego (ang. *Stem Cells from Apical Papilla*)
- Ser** - seryna (aminokwas)
- SHED** - komórki macierzyste izolowane z miazgi zęba mlecznego (ang. *Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth*)

- SHH** - cząsteczka sygnałowa (ang. *Sonic Hedgehog Signalling Molecule*)
- SIBLING** - rodzina białek niekolagenowych biorących udział w mineralizacji zębiny (ang. *Small Integrin – Binding Ligand N-linked Glycoproteins*)
- STRO-1** - specyficzny epitop prezentowany przez komórki mezenchymy
- TNF** - czynnik martwicy nowotworu (ang. *Tumor Necrosis Factor*)
- WNT** - cząsteczka sygnałowa (ang. *Wingless*)

1. STRESZCZENIE.

Komórki macierzyste stanowią populację komórek prezentujących szereg wspólnych cech, które definiują ich pierwotny charakter. Należą do nich: zdolność do samoodnawiania, tworzenia kolonii z pojedynczej komórki oraz możliwość różnicowania w kierunku licznych linii rozwojowych określane jako charakter multipotencjalny. Dotychczas najlepiej poznano i opisano komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego, poszukując jednocześnie alternatywnych, bardziej dostępnych źródeł. Łatwiejszym, z powodu mniejszej inwazyjności procesu pozyskiwania, okazał się materiał pochodzenia zębowego. Jak dotąd komórki progenitorowe pochodzenia zębowego wyizolowano z miazgi zębów stałych i mlecznych, tkanek przyzębia, brodawki wierzchołkowej oraz woreczka zębowego. Jednym z najbardziej dostępnych źródeł komórek macierzystych jest miazga zębów mądrości (Dental Pulp Stem Cells, DPSC) oraz brodawka wierzchołkowa (Stem Cells from Apical Papilla, SCAP) zlokalizowana na szczycie nieuformowanych korzeni trzecich zębów trzonowych. Funkcja komórek SCAP polega na tworzeniu pierwotnej zębiny korzeniowej w procesie odontogenezy, podczas gdy komórki DPSC zastępują pierwotne odontoblasty i wytwarzają zębinę wtórną i reparacyjną.

Celem pracy była analiza porównawcza *in vitro* zdolności różnicowania komórek macierzystych DPSC *versus* SCAP w kierunku funkcjonalnych odontoblastów.

W celu wyodrębnienia komórek o niskim stopniu zróżnicowania, przeprowadzono selekcję na obecność epitopów charakterystycznych dla komórek nisz okołonaczyniowych (STRO-1(+); CD146(+); CD34(-), CD45(-)). Komórki wyizolowane z trzecich zębów trzonowych hodowano przez okres sześciu tygodni w pożywce standardowej (grupa wyjściowa i kontrolna) oraz pożywce modyfikowanej składnikami stymulującymi mineralizację (grupa doświadczalna). Dla oceny stopnia dojrzałości komórek zbadano

potencjał proliferacyjny oraz zdolność tworzenia kolonii przez komórki obu linii komórkowych. Komórki SCAP ze wszystkich badanych grup dzieliły się szybciej, tworzyły większe i liczniejsze kolonie w porównaniu z komórkami DPSC, co sugerowało o ich niższej dojrzałości komórkowej. Znaczący wpływ na wynik doświadczenia miała stymulacja promineralizacyjna środowiska hodowli, skutkująca obniżeniem potencjału proliferacji i formowania kolonii w obu liniach komórkowych.

Poziom zróżnicowania komórek w odontoblasty określono badaniem aktywności fosfatazy alkalicznej (ALP) uznawanej za wczesny marker różnicowania komórkowego, który bierze udział w procesie mineralizacji oraz oceną poziomu wapnia wewnątrzkomórkowego. Wykazana mniejsza aktywność ALP oraz koncentracja wapnia w wyjściowej grupie komórek SCAP, w porównaniu z komórkami DPSC, potwierdziła pierwotnie niższy poziom zróżnicowania komórek pochodzących z brodawki wierzchołkowej. W grupach doświadczalnych obu linii komórkowych aktywność enzymu i poziom wapnia były większe w stosunku do grup wyjściowych. W celu potwierdzenia aktywności mineralizacyjnej komórek dodatkowo wybarwiono złogi soli mineralnych powstające w procesie mineralizacji macierzy zewnątrzkomórkowej oraz zbadano ekspresję genów wybranych jako markery różnicowania i dojrzewania odontoblastów (*OC*, *DMP1*, *DSPP*). W grupach doświadczalnych komórki SCAP i DPSC wykazały zdolność tworzenia złogów mineralnych *in vitro*, co sugeruje, że różnicowanie komórek macierzystych jest stymulowane przez czynniki środowiskowe promujące zachowania promineralizacyjne. Ponadto, obserwowana zwiększona ekspresja genów *OC*, *DMP1* oraz *DSPP* jednoznacznie potwierdziła, że komórki DPSC i SCAP zdolne są do różnicowania w kierunku funkcjonalnych odontoblastów. Przeprowadzone w niniejszej pracy obserwacje wskazują, że komórki izolowane z brodawki wierzchołkowej i miazgi zęba zdolne są do różnicowania w kierunku funkcjonalnych odontoblastów, przy czym komórki SCAP

prezentują wyższy potencjał proodontoblastyczny w porównaniu do komórek pochodzących z miazgi zęba.

2. SUMMARY.

Stem cells are defined as clonogenic cells with the capacity of self-renewal, single cell colony formation and differentiation into the multiple lineages (at least 4). To date, bone marrow stem cells have been investigated most comprehensively. However, more accessible sources of the stem cells are currently being explored. So far, multiple molecular studies of dental area revealed the presence of the stem cells in both the permanent and deciduous teeth. Dental pulp (Dental Pulp Stem Cells, DPSCs) and apical papilla (Stem Cells from Apical Papilla, SCAPs) are considered to be most accessible source of stem cells. Apical papilla, which is localized at the apex of developing dental roots of impacted third molars is the source of primary odontoblasts and is responsible for root dentin formation during odontogenesis, whereas DPSCs derived from dental pulp replace primary odontoblasts and produce tertiary dentin.

The aim of the study was to evaluate the potential of commitment and differentiation of the DPSCs and SCAPs into the functional odontoblasts.

The cells, isolated from both dental pulp and papilla, were sorted for the presence of the specific mesenchymal epitopes (STRO-1 and CD146) and cultured in a standard medium (primary and control group). For the cells from the experimental groups medium was additionally modified with ingredients that stimulated cells' differentiation into functional odontoblasts. To assess cells commitment and differentiation the test for proliferation and the ability of colony formation were applied. SCAPs from all investigated groups had the higher potential of proliferation and formed larger and more frequent colonies compared to DPSCs. This observation suggests that SCAPs were less differentiated compared to DPSCs. Osteo/odontogenic stimulation resulted in the decreased proliferation and colony formation in the both cells' lineages.

The differentiation commitment towards functional odontoblasts was examined with two methods; the alkaline phosphatase (ALP) activity, which is regarded as an early marker of cells' differentiation and measurement of an intracellular calcium concentration. The lower activity of ALP, as well as calcium concentration in the primary group of SCAPs compared to DPSCs confirmed the lower level of differentiation of the former group. In the experimental groups of both cells lines the ALP activity as well as calcium concentration was higher compared to the primary groups. The most precise confirmation of the cells' commitment and differentiation was achieved with the mineral nodules staining and PCR for *OC*, *DMP1*, and *DSPP*. An analysis of the experimental groups from both DPSCs and SCAPs lines showed the ability of DPSCs and SCAPs to formation of mineral nodules *in vitro*. The expression of the mineralization related genes confirmed that both the DPSCs and SCAPs are able to differentiate into functional odontoblasts.

The results obtained in this study showed that either DPSCs or SCAPs are the reservoir of the stem cells that are capable of differentiation into the functional odontoblasts.

3. WSTĘP.

Po całkowicie zakończonym procesie odontogenezy, funkcja obronna miazgi zęba skierowana przeciwko bodźcom patologicznymi (próchnica, urazy zębów) jak i fizjologicznym (starcie zębów) pozostaje na relatywnie niskim poziomie i polega na dokomorowym odkładaniu zębiny wtórnej i reparacyjnej przez odontoblasty. Prowadzi to do odizolowania miazgi zęba od ogniska chorobowego, jednak ubytki w zmineralizowanych tkankach zęba, utracone na skutek toczącego się procesu próchnicowego oraz wstępnego postępowania leczniczego, nie są odbudowywane. Odkładanie zębiny wtórnej i reparacyjnej trwa przez cały okres życia osobniczego, wobec czego pierwotne odontoblasty, które mają określony czas życia, muszą zostać zastąpione przez kolejne komórki odontoplastopodobne. Komórki te wyróżniają się z populacji komórek progenitorowych (Dental Pulp Stem Cells, DPSC), których rezerwuar znajduje się w okolicach nisz okołonaczyniowych w miazdze zęba. Nowo wyróżnicowane „odontoblasty” (ang. *replacement odontoblasts*) zastępują pierwotne komórki zębinotwórcze (ang. *primary odontoblasts*) wyróżnicowane podczas rozwoju zawiązka zęba. Następnie komórki odontoplastopodobne podejmują funkcję tworzenia zębiny wtórnej i reparacyjnej.

Nieco odmienną rolę pełni brodawka wierzchołkowa (ang. *apical papilla*) zlokalizowana na wierzchołku rozwijającego się korzenia zęba, w której rezydują komórki macierzyste (Stem Cells from Apical Papilla, SCAP) będące źródłem pierwotnych odontoplastów (ang. *primary odontoblasts*). 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, komórki macierzyste SCAP zanikają [1].

Metoda z wyboru leczenia ubytków próchnicowych, która pozwala odtworzyć anatomiczny kształt zęba, przy jednoczesnym zachowaniu jego żywotności, polega na usunięciu zdemineralizowanych tkanek i odbudowie zęba materiałem do wypełnień. Niestety jak dotąd, najbardziej udoskonalone metody leczenia nie pozwalają na odbudowę tkanek z odtworzeniem pierwotnego kształtu zęba, a metoda tzw. sterowanej regeneracji tkanek nie została jeszcze wdrożona do standardów leczenia stomatologicznego. Zatem wyzwaniem współczesnej stomatologii jest wprowadzenie leczenia zachowawczego zębów w postaci sterowanej regeneracji tkanek z udziałem komórek progenitorowych, która umożliwiłaby biologiczną odbudowę utraconych tkanek zęba. Taka koncepcja leczenia znacząco polepszy rokowanie utrzymania żywotności zęba, a tym samym wydłuży czas przetrwania zęba w jamie ustnej.

Dotychczas najbardziej szczegółowo przebadano komórki progenitorowe pochodzące ze szpiku kostnego, poszukując jednocześnie alternatywnych, bardziej dostępnych źródeł [2,3]. Doskonałym i stosunkowo łatwym w pozyskaniu okazał się materiał pochodzenia zębowego. Dowiedziono bowiem, że zarówno w miazdze zęba (DPSC) jak i brodawce wierzchołkowej (SCAP) zlokalizowanej na wierzchołku rozwijającego się korzenia zęba, rezydują komórki progenitorowe zdolne pod wpływem stymulacji środowiskowej do różnicowania w kierunku komórek odontoblastopodobnych [2,4].

ODONTOGENEZA.

Zawiązki zębów powstają w wyniku złożonych, wzajemnych interakcji pomiędzy ektodermalnym nabłonkiem wyścielejającym pierwotną jamę ustną, a ektomezenchymą pochodzącą z komórek grzebienia nerwowego. Naprzemienna sygnalizacja ektodermy i ektomezenchymy skutkuje regulacją inicjacji rozwoju zawiązków, morfogenezy zęba, jak

również ostatecznym różnicowaniem odontoblastów i ameloblastów [5,6]. Pod względem morfologicznym rozwój zębów został sklasyfikowany na cztery sekwencyjnie następujące etapy: stadium listewki zębowej, pączka, czapeczki i dzwonu, jednak podział ten nie uwzględnia istotnych funkcjonalnych zmian morfogenetycznych i różnicowania histologicznego.

Pierwszym morfologicznym symptomem zapoczątkowania procesu odontogenezy jest pogrubienie pasma komórek nabłonka wyściełającego pierwotną jamę ustną, z utworzeniem tzw. pierwotnej listewki nabłonkowej. U człowieka pomiędzy 42 a 48 dniem życia płodowego listewka pierwotna ulega podziałowi na listewkę zębową oraz listewkę przedsionkową [1]. Docelowo z dzielących się komórek listewki zębowej, wpuklających się w podścielisko sąsiadującej ektomezenchymy, rozwiną się tkanki zęba pochodzenia ektodermalnego, natomiast z listewki przedsionkowej usytuowanej doprzędnie w stosunku do listewki zębowej powstanie przedsionek jamy ustnej. Na tym etapie rozwoju zawiązków zębów komórki nabłonka pełnią dominującą funkcję wykazując ekspresję cząsteczek sygnalizacyjnych z rodzin BMP, FGF, SHH, TNF wpływających bezpośrednio na komórki ektomezenchymy poprzez indukcję ich intensywnych podziałów [7,8]. W odpowiedzi dzielące się komórki ektomezenchymalne wykazują ekspresję szeregu czynników transkrypcyjnych m.in. *Barx1*, *Dlx1,-2*, *Gli2,-3*, *Lhx6,-7*, *Msx1,-2* oraz *Pax9* [7,9]. Sekwencyjna i wzajemna ścieżka sygnałowa pomiędzy tkanką nabłonkową, a ektomezenchymą prowadzi do powstawania tzw. ektodermalnych plakodów [7]. Plakody formują się w skutek miejscowej proliferacji komórek nabłonka, tworząc lokalne zgrubienia tkanki nabłonkowej zlokalizowane w miejscach rozwoju poszczególnych grup zawiązków zębów (zęby sieczne, kły, przedtrzonowe, trzonowe) [10]. Uważa się, że plakody pełnią funkcję pierwotnego centrum sygnalizacyjnego rozwijającego się zawiązka zęba i wykazują ekspresję białek z rodziny BMP, FGF, SHH, WNT [11]. W wyniku

dalszych podziałów komórek nabłonka listewki zębowej dochodzi do wpuklenia się komórek nabłonka w otaczającą ektomezenchymę, a formująca się struktura przyjmuje charakterystyczną postać pączka zębowego. Jednocześnie w wyniku indukcyjnego wpływu ektodermalnych plakodów zagęszczeniu ulegają komórki ektomezenchymy bezpośrednio przylegające do nabłonka, które w odpowiedzi na docierające z tkanki nabłonkowej sygnały wykazują ekspresję trzech czynników transkrypcyjnych *Msx1*, *Pax9*, *Runx2* [12]. Czynniki *Msx1* jest indukowany przez pochodzące z nabłonka białka z rodziny BMP i FGF podczas gdy *Pax9* i *Runx2* jedynie przez FGF [12-16]. Funkcja, jak również geny aktywowane przez te czynniki transkrypcyjne są przedmiotem intensywnych badań, a ich kluczowa rola w odontogenezie została potwierdzona w doświadczeniach na myszach z wyłączoną odpornością (ang. *knockout mice*), u których dowiedziono, że wyeliminowanie aktywności któregośkolwiek z czynników zatrzymuje rozwój zęba na etapie transformacji stadium pączka w stadium czapeczki [12-14].

Dalszy podział komórek nabłonka z jednoczesną kondensacją ektomezenchymy skutkuje uformowaniem w 14 tygodniu życia płodowego czapeczki, która ograniczona jest nabłonkiem zewnętrznym, wyścielającym wypukłą powierzchnię oraz nabłonkiem wewnętrznym pokrywającym wklęsłą powierzchnię powstałej struktury, nazywanej odtąd narządem szkliwotwórczym [1]. Pomiędzy nabłonkiem wewnętrznym i zewnętrznym narządu szkliwotwórczego obecna jest warstwa siateczkowa (ang. *stellate reticulum*) zbudowana z luźno rozmieszczonych i połączonych ze sobą komórek o kształcie gwiazdzistym.

We wczesnej fazie czapeczki, w obrębie narządu szkliwotwórczego na skutek indukcyjnego działania sygnałów docierających z ektomezenchymy (BMP-4), grupa komórek nabłonkowych zaprzestaje podziałów mitotycznych i tworzy tzw. pierwotny węzeł szkliwny pełniący funkcję tymczasowego centrum sygnalizacyjnego dla procesu

odontogenezy, co potwierdza biosynteza cząsteczek sygnalizacyjnych BMP, FGF, WNT, SHH [7,17,18]. Pierwotny węzeł szkliwny zlokalizowany jest w obrębie zawiązków zębów w miejscu zagięcia narządu szkliwotwórczego i zanim ulegnie procesom apoptozy, w późnej fazie czapeczki, indukuje powstawanie wtórnych węzłów szkliwnych zlokalizowanych na szczytach guzków zawiązków zębów trzonowych, pełniąc kluczową rolę w morfogenezie korony zęba [18,19].

Komórki ektomezenchymy oddzielone są od narządu szkliwotwórczego błoną podstawną, a ich intensywne podziały indukowane są sygnałami docierającymi z pierwotnego węzła szkliwnego. Skutkuje to uformowaniem ektomezenchymalnej brodawki zębowej zlokalizowanej w centralnej części tkanki, z której w kolejnym etapie rozwinię się kompleks miazgowo-zębinowy. Jednocześnie, z ektomezenchymy sąsiadującej z obwodowymi fragmentami narządu szkliwotwórczego, powstanie woreczek zębowy będący macierzystą strukturą dla tkanek przyzębia. Uważa się, że narząd szkliwotwórczy, brodawka zębowa oraz woreczek zębowy stanowią podstawowy kompleks strukturalno-morfologiczny zawiązka zęba [1].

Dalszy wzrost i rozwój zęba prowadzi do kolejnego etapu odontogenezy – stadium dzwonu, w którym korona zęba osiąga swój ostateczny kształt (morfogeneza), a komórki odpowiedzialne za tworzenie twardych tkanek zęba ulegają zróżnicowaniu histologicznemu we właściwe komórki szkliwotwórcze (ameloblasty) i zębinotwórcze (odontoblasty). Po całkowitym uformowaniu korony zęba, z początkiem wyrzynania zębów rozpoczyna się tworzenie korzenia zęba. W miejscu połączenia komórek wewnętrznego i zewnętrznego nabłonka narządu szkliwotwórczego czyli tzw. pętli szyjnej (ang. *cervical loop*) komórki ulegają intensywnym podziałom tworząc dwuwarstwową strukturę tzw. pochewkę nabłonkową Hertwiga (Hertwig's Epithelial Root Sheath, HERS). Pochewka nabłonkowa rozciąga się dookoła rozwijającej się miazgi zęba, oddzielając ją od

woreczka zębowego, a jej cienki i dowierzchołkowo zagięty brzeg, zwany przeponą nabłonkową, zamyka pierwotny otwór wierzchołkowy. W miarę wzrostu i wydłużania HERS dochodzi do jednoczesnego indukowania sąsiadujących ektomezenchymalnych komórek brodawki zębowej do różnicowania w kierunku odontoblastów i tworzenia zębiny korzeniowej [20].

POWSTAWANIE I STRUKTURA ZĘBINY.

Formowanie zębiny rozpoczyna się na etapie transformacji stadium czapeczki w stadium dzwonu. Wzajemne interakcje pomiędzy komórkami wewnętrznego nabłonka narządu szkliwotwórczego, ektomezenchymalnymi komórkami brodawki zębowej oraz zlokalizowanej pomiędzy nimi blaszki podstawnej inicjują komórki ektomezenchymy do różnicowania w kierunku preodontoblastów. Pierwszym symptomem rozpoczęcia procesu różnicowania jest pojawienie się w macierzy brodawki zębowej aperiodycznych włókien o średnicy 15-20 nm i długości 0,5-1 μm ułożonych prostopadle do błony podstawnej [21]. Jednocześnie stale dzielące się komórki ektomezenchymy przyjmują kształt owalny lub okrągły, a w ich cytoplazmie widoczne są rybosomy, lizosomy, szorstkie retikulum endoplazmatyczne i aparat Golgiego, znajdujące się w początkowym stadium rozwoju. Wypustki cytoplazmatyczne różnicujących się komórek łączą się z włóknami aperiodycznymi macierzy brodawki zębowej i błoną podstawną, rozpoczynając tym samym proces różnicowania komórek we właściwe preodontoblasty. Jednak jedynie pojedyncza warstwa komórek połączona z błoną podstawną oddziaływującą z nabłonkiem narządu szkliwotwórczego ulega pełnemu zróżnicowaniu komórkowemu w odontoblasty [22,23]. Następnie wyróżnicowane preodontoblasty ulegają polaryzacji, ciało komórki wydłuża się i przyjmuje kształt cylindryczny. Aparat Golgiego przemieszcza się w kierunku wierzchołkowym, natomiast jądro komórkowe migruje w kierunku podstawnym komórki [21,22].

Ostatecznie zróżnicowane odontoblasty zlokalizowane są na obrzeżu miazgi dojrzałego zęba i tworzą pojedynczą warstwę palisadowo ułożonych, ściśle przylegających do siebie komórek, których kształt zmienia się w zależności od umiejscowienia względem miazgi zęba. W części koronowej komórki zębinotwórcze o kształcie walcowatym są większe (wysokość około 50 μm) w porównaniu z prostopadłościennymi komórkami w środkowej części korzenia [1]. W okolicy wierzchołka korzenia odontoblasty są spłaszczone lub całkowicie zanikają. Budowa morfologiczna dojrzałych odontoblastów odzwierciedla ich aktywność funkcjonalną. Aktywne sekrecyjnie komórki zębinotwórcze mają silnie zaznaczone organella komórkowe w tym pęcherzyki sekrecyjne, rozbudowany aparat Golgiego, retikulum endoplazmatyczne oraz liczne mitochondria, niezbędne do syntezy składników organicznej macierzy pozakomórkowej [21,22].

Za początek formowania zębiny uważa się sekrecję w brodawce zębowej włókien kolagenowych *von Korff'a* o średnicy 0,1- 0,2 μm , co jest równoznaczne z podjęciem funkcji przez w pełni zróżnicowane odontoblasty [24]. Oznacza to, że komórki zębinotwórcze należą ostatecznie do populacji komórek postmitotycznych (terminalnie zróżnicowanych). Włókna *von Korff'a* zbudowane głównie z kolagenu typu I oraz fibronektyny, umiejscowione są pomiędzy odontoblastami i biegną w kierunku wewnętrznego nabłonka narządu szkliwotwórczego. Kolejno, odontoblasty syntetyzują również niewielkie ilości włókien zbudowanych z kolagenu typu III, układających się prostopadle do włókien kolagenowych typu I, a równolegle do przyszłego połączenia szkliwno-zębinowego. Odkładana w ten sposób warstwa niezmineralizowanej macierzy kolagenowej, o zmiennej grubości ok. 10-50 μm , nazywana przezębiną przypomina swoją budową osteoid tkanki kostnej i zlokalizowana jest u podstawy odontoblastów. Przezębina stopniowo ulega mineralizacji, a pierwsze zmineralizowane warstwy są nazywane zębiną płaszczową (ang. *mantle dentin*). Proces mineralizacji postępuje wgłąb zębiny, a granica

pomiędzy obszarem zmineralizowanym i niezmineralizowanym nosi nazwę frontu mineralizacji. Zębina płaszczowa graniczy ze szkliwem i prezentuje nieco odmienną budowę w porównaniu z zębina pierwotną, gdyż w jej obrębie nie występują klasyczne kanaliki zębinowe, a jedynie nieliczne, drobno rozgałęzione *canaliculi* [24].

Na etapie formowania przębiny oraz zębiny płaszczowej, czyli we wczesnym stadium aktywności sekrecyjnej odontoblastów, wykształca się główna wypustka komórkowa odontoblasta tzw. włókno Tomes'a, uznawane za biegun sekrecyjny komórki zębinotwórczej [21]. Jednocześnie z pojawieniem się włókna Tomesa rozpoczyna się proces tworzenia zębiny okołomiazgowej (pierwotnej), której stopniowo odkładane warstwy powodują przesuwanie odontoblastów w kierunku miazgi zęba z równoczesnym wydłużaniem wypustki komórki obecnej w kanalikach zębinowych. Po całkowitym uformowaniu zębiny pierwotnej aktywność odontoblastów pozostaje na relatywnie niskim poziomie, jednak miazga zęba utrzymuje funkcję obronną przez całe życie polegającą na dokomorowym odkładaniu zębiny wtórnej i reparacyjnej. Szacuje się, że czas życia terminalnie zróżnicowanej ludzkiej komórki zębinotwórczej jest ograniczony i wynosi około 750 dni [24]. W tym czasie odontoblast wytwarza warstwę zębiny o grubości około 0,4 μm [24], po czym zastępowany jest przez nowe komórki, które różnicują się z populacji komórek progenitorowych obecnych w niszach okołonaczyniowych miazgi zęba [24,25].

Ostatecznie uformowana zębina jest heterogeniczną, zmineralizowaną tkanką składającą się z 70% materiału nieorganicznego, 20% materiału organicznego i 10% wody (stosunek wagowy). Pod względem objętościowym stosunek ten wynosi kolejno 45%, 33%, 22%. Nieorganiczna macierz zewnątrzkomórkowa zębiny zbudowana jest głównie z kryształów hydroksypaptytu (70%), natomiast macierz organiczna składa się z białek kolagenowych i niekolagenowych. Białka kolagenowe to w większości kolagen typu I

(86%), trymer typu I oraz śladowe ilości kolagenu typu III, V i VI. Pośród białek niekolagenowych zlokalizowanych w strukturze zębiny możemy wyróżnić osteonektynę, osteokalcynę oraz białka z rodziny SIBLING (Small Integrin - Binding Ligand N-linked Glycoproteins) [26]. Uważa się, że niekolagenowe białka zębiny inicjują i regulują proces mineralizacji zębiny, podczas gdy włókna kolagenowe stanowią swoiste „rusztowanie” dla odkładanych kryształów hydroksyapatytów [27].

Spośród białek niekolagenowych budujących organiczną macierz zębiny na szczególną uwagę zasługuje sialofosfoproteina zębiny (*dentin sialophosphoprotein*, DSPP) należąca do rodziny białek SIBLING. DSPP uznane jest za najbardziej specyficzne białko zębiny, gdyż jego synteza w zębinie jest setki razy wyższa, aniżeli w innych tkankach organizmu [28]. Białko DSPP w wyniku posttranslacyjnej modyfikacji ulega rozszczepieniu na białka pochodne tj. sialoproteinę zębiny (*dentin sialoprotein*, DSP) oraz fosfoproteinę zębiny (*dentin phosphoprotein*, DPP) [28,29-31]. Chemiczne właściwości obu białek wykazują znaczące różnice, podobnie jak ilościowy stosunek DPP: DSP wynoszący odpowiednio 10:1, co może wskazywać na odmienną rolę obu białek w procesie mineralizacji zębiny [32].

Białko DPP zwane również fosforyną (*phosphophoryn*, PP) jest najbardziej kwaśnym, hydrofilnym białkiem odkrytym dotąd w ludzkim organizmie (punkt izoelektryczny w okolicy 1,1) [30]. Ta niezwykła właściwość wynika z obecności dużej ilości reszt kwasu asparaginowego (Asp) oraz seryny (Ser), przy czym większość reszt seryny w wyniku modyfikacji postranslacyjnych zostaje wysoce ufosforylowana tworząc fosfoserynę (Pse) [32-35]. W konsekwencji około 500 do 600 końcowych aminokwasów białka DPP tworzy tandemowe sekwencje $(Asp-Pse-Pse)_n$ oraz $(Asp-Pse)_n$ [32]. Biologiczna funkcja białka DPP nie została w pełni poznana, jednak fizyko-chemiczne właściwości sugerują, że powtarzalna i unikalna sekwencja aminokwasów tworzy

uporządkowaną strukturę grup fosforanowych oraz karboksylowych posiadających wysokie powinowactwo do jonów Ca^{2+} [36]. Zatem uważa się, że białko DPP bierze czynny udział w nukleacji i wzroście kryształów hydroksyapatytów w trakcie mineralizacji zębiny [34,37,38]. W badaniach *Huang i wsp.* [39] przeprowadzonych na dwóch ekstraktach pozyskanych z: (1) przębiny i wypustek odontoblastu oraz (2) zmineralizowanej macierzy dojrzałej zębiny wyizolowanych z siekacza szczura, stwierdzono obecność białka DPP jedynie w drugim ekstrakcie (faza nieorganiczna zębiny) podczas gdy białko DSP było obecne w przębinnie/wypustkach odontoblasta. Uzyskane wyniki sugerują, że białko DSP jest związane z inicjacją procesu mineralizacji zębiny podczas gdy białko DPP reguluje proces jej dojrzewania (właściwej mineralizacji) [39,40].

Kolejnym istotnym, niekolagenowym białkiem z rodziny SIBLING, syntetyzowanym przez dojrzałe odontoblasty i zaangażowanym w proces mineralizacji zębiny jest białko macierzy zębinowej 1 (dentin matrix protein 1, DMP1). COOH-końcowe białka DMP1 podobnie jak białko DPP jest całkowicie hydrofilnym, kwaśnym białkiem zbudowanym głównie z kwasu asparaginowego, seryny oraz kwasu glutaminowego, ulegających silnej fosforylacji, co sprzyja przyłączaniu jonów wapnia i tworzeniu minerału hydroksyapatytu [41]. Badanie ekspresji genu *DMP1* prowadzonych na zawiązkach zębów szczura przez *Hao i wsp.* [42] wykazało różnice w poziomie ekspresji tego genu, zależne od stadium różnicowania odontoblastów i etapu tworzenia zębiny. Ekspresja *DMP1* była zainicjowana na etapie aktywności sekrecyjnej odontoblastów, przy czym najwyższy poziom zaobserwowano w spolaryzowanych komórkach zębinotwórczych, w początkowej fazie syntezy zmineralizowanej macierzy zębiny, który znacząco malał po zakończonym procesie odontogenezy i osiągnięciu

dojrzałości komórkowej przez odontoblasty. Powyższe wyniki sugerują że białko DMP1 bierze czynny udział w nukleacji kryształów hydroksyapatytów [42,43].

KOMÓRKI MACIERZyste OBECNE W MIAZDZE ZĘBA I BRODAWCE WIERZCHOŁKOWEJ.

Dotychczas komórki progenitorowe pochodzenia zębowego wyizolowano z miazgi zębów mądrości [2], zębów mlecznych [44], tkanek przyzębia [45], brodawki wierzchołkowej [46] oraz woreczka zębowego [47]. Wyizolowane komórki prezentują szereg cech wspólnych definiujących ich pierwotny charakter, do których należą: zdolność do samoodnawiania (ang. *self-renewal*), tworzenia kolonii z pojedynczej fibroblastopodobnej komórki (ang. *Colony Forming Unit – Fibroblast, CFU-F*) oraz możliwość różnicowania w kierunku licznych linii komórkowych (tzw. charakter multipotencjalny) [2,48,49].

Jednym z najbardziej dostępnych źródeł komórek macierzystych jest miazga zębów mądrości (DPSC) oraz brodawka wierzchołkowa (SCAP) zlokalizowana na szczycie nieuformowanych korzeni trzecich zębów trzonowych, których początek 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 zarówno pochodzące z nich komórki SCAP jak i DPSC znajdują się w bardzo wczesnej fazie zróżnicowania komórkowego [2,4].

ANALIZA PRÓWNAWCZA DPSC vs. SCAP.

W procesie odontogenezy wzajemne oddziaływanie HERS z sąsiadującymi komórkami mezenchymalnymi skutkuje różnicowaniem odontoblastów odpowiedzialnych za tworzenie pierwotnej zębiny korzeniowej. Anatomiczna lokalizacja tych niezróżnicowanych komórek była przedmiotem licznych badań [4,46], ponieważ budowa

brodawki wierzchołkowej odciętej od szczytów nieuformowanych korzeni oceniana w preparacie histologicznym wykazała złożoną strukturę. Brodawka wierzchołkowa zlokalizowana jest obwodowo w stosunku do nabłonkowej diafragmy i leży w bezpośrednim sąsiedztwie miazgi kanałowej, od której oddzielona jest jedynie tzw. warstwą bogatokomórkową. Dla weryfikacji funkcji brodawki wierzchołkowej przeprowadzono doświadczenie, w którym chirurgicznie odcięto brodawkę wierzchołkową od korzenia zęba trzonowego we wczesnym etapie jego formowania z pozostawieniem nienaruszonej miazgi kanałowej [4]. Spowodowało to całkowite zatrzymanie rozwoju korzenia zęba i jednoznacznie potwierdziło wiodący udział mezenchymalnych komórek progenitorowych brodawki wierzchołkowej w rozwoju korzenia, ze szczególnym uwzględnieniem formowania zębiny korzeniowej. Czynny udział komórek brodawki wierzchołkowej w formowaniu zębiny korzeniowej dowodził fakt, że odontoblasty rezydujące w miazdze kanałowej nie podjęły samodzielnie funkcji dalszego tworzenia korzenia zęba [4].

Podobnie jak brodawka wierzchołkowa, miazga zębów stanowi rezerwuar komórek progenitorowych zdolnych do różnicowania w nowe „odontoblasty”, które zastępują odontoblasty pierwotnie wyróżnicowane w procesie odontogenezy. Mezenchymalny charakter komórek progenitorowych pochodzących ze struktur miazgi zęba i brodawki wierzchołkowej zatrzymanych zębów mądrości z nieuformowanymi korzeniami, został potwierdzony obecnością epitopów STRO-1 oraz CD146 [2,4,25,48,50]. Liczne badania dowiodły, że antygen STRO-1 obecny jest na powierzchni prekursorów różnych typów komórek pnia, m.in. osteoblastów i dodatkowo wykazano w badaniach *in vitro*, że jego ekspresja maleje w miarę różnicowania komórek w dojrzałe osteoblasty. Zatem antygen ten uznawany jest za wczesny marker populacji komórek preosteogenicznych [51,52]. Ponadto antygen STRO-1 zlokalizowano w ścianach dużych naczyń krwionośnych oraz

naczyń obecnych w miazdze zęba [25], co sugeruje, że STRO-1 jest wczesnym markerem charakterystycznym dla komórek pochodzenia mezenchymalnego i jednocześnie może wskazywać na pochodzenie komórek DPSC i SCAP z nisz okołonaczyniowych zarówno miazgi zęba, jak i brodawki wierzchołkowej [25,50]. W celu potwierdzenia okołonaczyniowej lokalizacji komórek DPSC i SCAP dodatkowo wykorzystano epitop CD146, którego immunolokalizację stwierdzono w mikrounaczynieniu miazgi zęba [25]. Interesującym pozostaje fakt, że STRO-1 jest związany również z nerwiem (*perineurium*) miazgi zęba i obwodowymi pęczkami nerwowymi, a epitop CD146 z powierzchnią komórek Schwanna, tworzących osłonkę mielinową aksonów. Zatem przypuszcza się, że komórki DPSC i SCAP mogą także rezydować w przestrzeniach okołonerwowych [25,50].

Komórki DPSC obserwowane w mikroskopie świetlnym swoją budową przypominają znacznych rozmiarów fibroblasty o zróżnicowanych (heterogennych) kształtach, od wrzecionowatych do wielokątnych, a w hodowli komórkowej *in vitro* przy osiągniętej niemal całkowitej konfluencji przyjmują kształt sześcienny [53]. Komórki SCAP są nieznacznie mniejsze i prezentują zbliżoną morfologię do DPSC. Posiadają kształt fibroblastów lub gwiazdzisty z licznymi wypustkami cytoplazmatycznymi [52]. W obrazie mikroskopowym komórki macierzyste izolowane z miazgi zęba posiadają centralnie umiejscowione jądro, dobrze rozwinięte szorstkie retikulum endoplazmatyczne oraz znaczną ilość pęcherzyków sekrecyjnych, co dodatkowo odzwierciedla ich aktywność sekrecyjną [2].

Jako pierwszy komórki macierzyste z miazgi zębów ósmych zidentyfikował i opisał *Gronthos i wsp.* w 2000 roku [2]. Opierając się na metodach stosowanych do badań nad najlepiej dotychczas poznanymi komórkami progenitorowymi ze szpiku kostnego, autor ten porównał właściwości obu linii komórkowych. Oprócz różnic wynikających ze źródła pozyskiwanych komórek, a dotyczących potencjału proliferacji i zdolności

tworzenia kolonii, autor wykazał podobieństwo w ekspresji specyficznych markerów dla tkanki kostnej, w tym: kolagenu typu I, fosfatazy alkalicznej (ALP), osteonektyny, osteopontyny i osteokalcyny, co wskazuje na promineralizacyjny charakter komórek BMSC i DPSC [2,54-56]. Wyróżniającą cechą komórek DPSC jest zdolność do regeneracji kompleksu miazgowo – zębinowego, potwierdzona ekspresją jedyne go specyficznego markera zębinowego: sialoproteiny zębiny (DSP). Na podstawie licznych przeprowadzonych badań, udowodniono, że jedynie w określonych warunkach hodowli *in vitro* i *in vivo*, uzyskanych poprzez dodanie do pożywki hodowlanej deksametazonu, β -glicerofosforanu oraz kwasu L-askorbinowego, komórki progenitorowe rezydujące w miazdze zęba zdolne są do różnicowania w kierunku odontoblastów z jednoczesną regeneracją kompleksu miazgowo-zębinowego [2,4].

W badaniach *Gronthosa i wsp.* [2] DSP-pozytywny kompleks miazgowo-zębinowy otrzymano *in vivo* w doświadczeniu, polegającym na wszczepieniu podskórnym myszom poddanych immunosupresji (ang. *immunocompromised mice*) komórek DPSC umieszczonych na nośniku HA/TCP (hydroksyapaptyt/fosforan trójwapniowy). Wybór nośnika oparto na właściwościach osteokondukcyjnych względem komórek macierzystych szpiku kostnego, tym samym na potencjalnie odontokondukcyjnym wpływie na komórki macierzyste miazgi zęba [2,3]. Po ośmiu tygodniach komórki DPSC zróżnicowały się w odontoblasty i wytworzyły zębinę, która obserwowana w świetle spolaryzowanym zawierała wysoce uporządkowaną macierz kolagenową, odkładającą się na powierzchni nośnika HA/TCP, z obecnymi włóknami kolagenu typu I ułożonymi prostopadle do powstałej warstwy odontoblastów oraz tkanką łączną z widocznymi naczyniami krwionośnymi [2,3,48]. Obecne wypustki odontoblastów przebiegały wzdłuż powstałych kanalików tkanki zębinowej [2]. Utworzona zębina wykazywała, obok markerów tkanki kostnej takich jak sialoproteina kości (BSP) oraz osteokalcyna (OC), ekspresję

specyficznego markera dla tkanki zębinowej tj. sialofosfoproteinę zębiny (DSPP) [40]. Nieco odmienne doświadczenie przeprowadził *Batouli i wsp.* [49], który przeszczepił myszom poddanym immunosupresji komórki DPSC naniesione na powierzchnię wytrawionej ludzkiej zębiny. Komórki przeszczepionego „implantu” wytworzyły na powierzchni nośnika DSP-pozytywną tkankę zębinopodobną, która jednak nie posiadała struktury regularnej tkanki zębinowej, a jej obraz histologiczny przypominał zębiny reparacyjną [49].

Innym źródłem mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzenia zębowego jest brodawka wierzchołkowa. Komórki SCAP analogicznie jak DPSC prezentują specyficzne epitopy charakterystyczne dla komórek mezenchymalnych (STRO-1(+), CD146(+)) [50,53]. W badaniach porównujących obie linie komórkowe zdolność komórek izolowanych z brodawki wierzchołkowej do tworzenia kolonii i ich potencjał proliferacyjny okazały się znacząco wyższe w porównaniu z komórkami DPSC, co pośrednio świadczy o ich wyjściowo niższym stopniu zróżnicowania [50]. Hodowla komórek SCAP *in vitro* prowadzona w pożywce zawierającej składniki stymulujące mineralizację, potwierdziła obecność na powierzchni komórek SCAP markerów specyficznych dla tkanki kostnej, w tym: fosfatazy alkalicznej (ALP), sialoproteiny kostnej (BSP), fosfoglikoproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej (MEPE) oraz specyficznego markera zębinowego – sialoproteiny zębiny (DSP) [4]. Zdolność SCAP do różnicowania w kierunku funkcjonalnych odontoblastów została oceniona na modelu zwierzęcym [4]. Komórki wyizolowane z brodawki wierzchołkowej zostały przeszczepione na nośniku HA/TCP *in vivo* myszom poddanym immunosupresji i po ośmiu tygodniach wytworzyły DSP-pozytywną tkankę zębinową o obrazie histologicznym analogicznym jak w przypadku doświadczenia prowadzonego z udziałem komórek DPSC [4]. Porównawcze badania zdolności formowania tkanki zębinowej przez komórki DPSC i SCAP

wyizolowane z tego samego zęba i przeszczepione jednocześnie na nośniku HA/TCP immunosupresyjnej myszy wykazały znacząco większy potencjał regeneracyjny komórek izolowanych z brodawki wierzchołkowej [50].

Oprócz potencjału odontogenicznego komórki macierzyste DPSC i SCAP posiadają zdolność do różnicowania w kierunku neurocytów i adipocytów, co dodatkowo wskazuje na ich multipotencjalny charakter [3,46]. Odpowiednio prowadzone warunki hodowli spowodowały różnicowanie SCAP i DPSC w komórki nerwowe, co potwierdzono ekspresją markerów: GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein) i nestyny, natomiast barwienie czerwieńią olejową O wykazało, że komórki DPSC i SCAP są zdolne do różnicowania w kierunku komórek tłuszczowych [4,48,57-62].

4. UZASADNIENIE I CEL PODJĘTYCH BADAŃ.

Współcześnie leczenie ubytków twardych tkanek zęba dąży do odtworzenia anatomicznego kształtu zęba, przy jednoczesnym zachowaniu jego żywotności. Przed wypełnieniem ubytku odpowiednim materiałem usuwa się zdemineralizowane tkanki zęba. Nie jest to metoda leczenia wykorzystująca ideę sterowanej regeneracji tkanek, tym samym odtworzenie pierwotnego kształtu zęba nie jest perfekcyjne. Obecnie w dziedzinie stomatologii dostrzega się konieczność biologicznej odbudowy utraconych tkanek zęba z udziałem komórek progenitorowych w procesie sterowanej regeneracji tkanek. Uważa się, że taka metoda leczenia przyczyni się do przedłużenia żywotności zęba, a w konsekwencji do wydłużenia czasu jego przetrwania w jamie ustnej. W związku z powyższym celowa wydaje się ocena możliwości pozyskiwania i hodowli komórek macierzystych, które po odpowiedniej stymulacji byłyby zdolne do odtworzenia poszczególnych utraconych tkanek zęba. Biorąc pod uwagę duże potrzeby populacji w zakresie leczenia ubytków tkanek zęba pochodzenia próchnicowego i niepróchnicowego, istotne staje się również pytanie, które źródło pozyskiwania komórek macierzystych będzie lepsze i dlaczego.

Celem niniejszej pracy była ocena porównawcza hodowli *in vitro* komórek macierzystych izolowanych z miazgi (DPSC) i brodawki wierzchołkowej (SCAP) całkowicie zatrzymanych zębów mądrości z nieuformowanymi korzeniami, ze szczególnym uwzględnieniem ich potencjału różnicowania w kierunku funkcjonalnych odontoblastów.

5. MATERIAŁ I METODY

5.1. Materiał badań.

Materiał do badań stanowiły miazga zęba oraz brodawka wierzchołkowa pozyskiwane z całkowicie zatrzymanych trzecich zębów trzonowych pochodzących od tego samego pacjenta, a usuwanych ze wskazań ogólnomedycznych w Poradni Chirurgii Stomatologicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Badaniami zostali objęci pacjenci obojga płci, w przedziale wiekowym 16 – 20 lat (średnia wieku 18,3 lat), którzy wyrazili pisemną zgodę na wykorzystanie materiału do planowanych badań. Materiał pobrano od 14 pacjentów (6 kobiet i 8 mężczyzn) zakwalifikowanych na podstawie dostarczonego badania radiologicznego.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (NKEBN/173/2011).

5.2. Izolacja miazgi zęba oraz brodawki wierzchołkowej.

Po zabiegu odontektomii, z pobranego zęba odcinano brodawkę wierzchołkową (Ryc.1), a następnie z powierzchni korzenia zdrapywano pozostałości włókien ozębnej. Ząb 2-krotnie przemywano roztworem 70% alkoholu etylowego oraz płukano 5-krotnie w PBS. Po przecięciu zęba na granicy szkliwno-zębinowej (Ryc.2), wyłuszczano miazgę komorową. Zarówno miazgę jak i brodawkę wierzchołkową przenoszono do standardowej pożywki α MEM.



Rycina 1. Obrazy chirurgicznie usuniętych, całkowicie zatrzymanych zębów mądrości po przeprowadzonym zabiegu izolacji brodawki wierzchołkowej. Widoczne korzenie o niezakończonym rozwoju, z których odcięto brodawkę wierzchołkową.



Rycina 2. Obraz całkowicie zatrzymanego zęba trzonowego, przeciętego na wysokości szyjki zęba, po zabiegu izolacji miazgi.

5.3. Izolacja komórek DPSC i SCAP.

Celem uzyskania lepszej dostępności enzymów trawiennych, miazgę zęba oraz brodawkę wierzchołkową rozdrobniono przy użyciu skalpela, a następnie poddawano trawieniu roztworem dyspazy w stężeniu 4mg/ml i kolagenazy typu I w stężeniu 3mg/ml, rozpuszczonych w standardowej pożywce hodowlanej α MEM. Trawienie trwało 45 min. w temperaturze 37°C. Kolejno dodawano pożywkę α MEM z 15% zawartością surowicy bydlęcej (FBS) i całość wirowano 10 min. \times 1200 rpm. Supernatant odsysano, a osadzone komórki przesączano przez filtr o średnicy porów 70 μ m (Milipore) celem eliminacji niestrawionej tkanki oraz uzyskania hodowli 1-warstwowej. Przesącz komórkowy zawieszano w pożywce hodowlanej.

5.4. Hodowle komórkowe.

Komórki DPSC i SCAP hodowano w pożywce α MEM uzupełnionej surowicą bydlęcą (15%) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), L-glutaminą 2% (Invitrogen) oraz 100 U/ml penicyliny i 100 mg/ml streptomycyny (Invitrogen). Pożywka grupy doświadczalnej została wzbogacona składnikami stymulującymi mineralizację. 10nM deksametazon dodawano celem stymulowania proliferacji, 10mM β -glicerofosforan celem stymulowania mineralizacji, natomiast 50 μ g/ml kwas L-askorbinowy miał na celu stymulację tworzenia macierzy zewnątrzkomórkowej.

Pożywkę zmieniano co 3 dni, po uprzednim płukaniu komórek roztworem soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS). Komórki inkubowano w temperaturze 37°C, atmosferze 5% CO₂. Po osiągnięciu przez komórki 80% konfluencji, hodowlę rozsiewano do kolejnych butelek. Przeprowadzenie doświadczenia zaplanowano na 6 tygodni stymulacji środowiska hodowlanego. Ostatecznie porównano wszystkie parametry

grupy kontrolnej i doświadczalnej po 6 tygodniach stymulacji i porównywano pomiędzy sobą oraz w stosunku do grupy wyjściowej (pasaż 5).

5.5. Sortowanie komórek na obecność receptorów STRO-1; CD146; CD34; CD45.

Mezenchymalny fenotyp komórek obu linii komórkowych DPSC i SCAP został określony metodą MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) z użyciem magnetycznego separatora (MagCelect Magnet, R&D Systems Inc., USA). Pozytywne sortowanie komórek przeprowadzano z użyciem przeciwciał przeciwko ludzkiemu receptorowi błonowemu STRO-1 oraz CD146, natomiast komórki hematopoetyczne i leukocyty eliminowano sortowaniem negatywnym z użyciem przeciwciał przeciwko receptorom CD34 i CD45.

Procedurę sortowania przeprowadzano po odsączeniu pożywki i dwukrotnym płukaniu hodowli w PBS. Hodowlę komórkową zrywano z podłoża z użyciem 0,25% trypsyny (Invitrogen). Kolejno komórki wirowano przez 3 min. × 1200 rpm, a następnie zawieszano w ilości 1×10^6 w 1 ml buforu reakcyjnego (PBS + 0,5% BSA + 2mM EDTA). Zawiesinę komórek poddano procedurze sortowania na obecność receptorów STRO-1, CD146 (sortowanie pozytywne), a następnie jednoczasowej procedurze sortowania na obecność CD34, CD45 (sortowanie negatywne).

5.5.1. Selekcja pozytywna komórek z użyciem przeciwciał przeciwko STRO-1 i CD146.

Do zawiesiny komórek w buforze reakcyjnym dodano przeciwciała anty STRO-1 lub anty CD146 w stężeniu $1 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ komórek i inkubowano 15 min. w temperaturze 2-8°C. Następnie zawiesinę komórek uzupełniono o 100 μl ferrofluidu sprzężonego z przeciwciałem przeciwko mysiemu IgG (MagCelect Goat Anti-Mouse IgG Ferrofluid (GAM-FF), R&D Systems Inc., USA) i ponownie inkubowano 15 min. w temperaturze

2-8°C. W końcowym okresie inkubacji komórki przenoszono do 50 ml tuby i płukano w 15 ml buforu reakcyjnego, a następnie wirowano 8 min.×300 g. Supernatant zbierano, rozcieńczano w 2 ml buforu reakcyjnego i umieszczono w magnetycznym separatorze (MagCelect Magnet, R&D Systems Inc., USA). Czas inkubacji wynosił 6 min. w temperaturze pokojowej. Po inkubacji supernatant usuwano, a komórki związane z ferrofluidem o fenotypie STRO-1(+) lub CD146(+) płukano 2-krotnie w buforze reakcyjnym, a następnie wysiewano do pożywki. Procedurę powtórzono pierwotnie dla komórek STRO-1 pozytywnych, a następnie CD146 pozytywnych, tak że ostateczna populacja posiadała fenotyp STRO-1(+), CD146(+).

5.5.2. Selekcja negatywna komórek z użyciem przeciwciał przeciwko CD34 i CD45.

Do zawiesiny komórek w buforze reakcyjnym dodano przeciwciała przeciwko ludzkiemu receptorowi błonowemu CD34 i CD45 w stężeniu $1\mu\text{g}/1\times 10^6$ komórek i inkubowano 15 min. w temperaturze 2-8°C. Następnie zawiesinę uzupełniono o 125 μl ferrofluidu sprzężonego z przeciwciałem przeciwko mysiemu IgG i ponownie inkubowano 15 min. w temperaturze 2-8°C. Pod koniec inkubacji zawiesinę uzupełniono buforem reakcyjnym do objętości 2 ml, umieszczono w magnetycznym separatorze i inkubowano przez 6 minut w temperaturze pokojowej. Komórki związane z ferrofluidem (CD34 i CD45 pozytywne) przyległy do ściany tuby, natomiast pozyskiwany supernatant zawierał komórki nieposiadające epitopów CD34 i CD45.

Zawarte w supernatancie komórki DPSC i SCAP o końcowym fenotypie STRO-1(+), CD146(+), CD34(-), CD45(-) stanowiły materiał do dalszych badań.

5.6. Ilościowa ocena potencjału proliferacji.

Ilościowa ocena potencjału proliferacji, świadcząca o stopniu dojrzałości komórek została zbadana pomiarem szybkości reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę

mitochondrialną polegającej na rozkładzie soli tetrazolowej do formazanu (WST-1). Do doświadczenia użyto zestawu Quick Cell Proliferation Assay Kit (BioVision, Mountain View, CA, USA).

Do studzienek na 96 studzienkowej płytce do hodowli komórkowej w 90 μ l pożywki zawieszono komórki w liczbie 5×10^2 , 1×10^3 , 2×10^3 , 5×10^3 , $7,5 \times 10^3$, 1×10^4 . Komórki inkubowano 24 godziny w temperaturze 37°C , atmosferze 5% CO_2 . Po okresie inkubacji do pożywki dodano 10 μ l preparatu WST-1 (całkowita objętość 100 μ l) i ponownie inkubowano przez 4 godziny w standardowych warunkach. Pożywka (90 μ l) z preparatem WST-1 (10 μ l) bez obecności komórek traktowano jako ślepą próbę. Następnie w spektrofotometrze (Victor3, Perkin Elmer) zmierzono poziom absorpcji światła przy długości fali 450 nm.

Obliczeń dokonano w arkuszu kalkulacyjnym MS Excel®, a wyniki normalizowano do krzywej standardowej. Doświadczenie wykonano 3-krotnie w trzech powtórzeniach.

5.7. Badanie zdolności tworzenia kolonii (CFU-F, *colony forming unit – fibroblast*).

Charakterystyczną cechą komórek pochodzenia mezenchymalnego jest zdolność formowania kolonii z pojedynczej fibroblastopodobnej komórki (CFU-F), którą oceniono barwieniem *Giemsy*.

Do butelki hodowlanej o objętości 25 ml wysiano 1×10^5 komórek zawieszonych w 5 ml pożywki. Po 2 godzinach inkubacji w warunkach standardowych (temp. 37°C , 5% CO_2) hodowlę 2-krotnie płukano w PBS z silnym wstrząsaniem, w celu uzyskania na podłożu jedynie dobrze przyległych komórek. Następnie w grupie doświadczałnej dodawano 5 ml pożywki α MEM wzbogaconej w składniki stymulujące mineralizację (10nM deksametazon, 10mM β -glicerofosforan, 50 μ g/ml kwasu L-askorbinowy) i

hodowano w standardowych warunkach przez 14 dni bez zmiany pożywki. Grupę kontrolną poddano tej samej procedurze, a następnie hodowano w pożywce standardowej α MEM.

Po upływie 14 dni hodowli, pożywkę odsączano, komórki płukano 2-krotnie w PBS i utrwalano w 70% alkoholu etylowym na lodzie przez 20 minut. Etanol odsączano, dodawano 5 ml roztworu *Giemsy* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) i inkubowano przez kolejne 20 minut. Po okresie inkubacji hodowlę 2-krotnie płukano w wodzie destylowanej i pozostawiono do wyschnięcia. Obraz komórek tworzących „wiry” będące efektem powstania populacji pochodzącej z pojedynczej komórki macierzystej oceniono w mikroskopie świetlnym (powiększenie 10 \times) oraz makroskopowo.

5.8. Badanie odkładania złogów mineralnych metodą *von Kossa*.

Komórki w liczbie 1×10^4 wysiewano na 35 mm płytkę do hodowli komórkowych i inkubowano w warunkach standardowych (temp. 37°C, 5% CO₂) w 5 ml pożywki α MEM z dodatkiem składników stymulujących mineralizację. Komórki hodowane w pożywce standardowej α MEM stanowiły grupę kontrolną. Hodowlę prowadzono przez 21 dni zmieniając pożywkę co 3 dni. Po 3 tygodniach hodowli odsączano pożywkę, komórki 2-krotnie płukano w wodzie destylowanej i inkubowano z 5% azotanem srebra przez 30 minut w odległości 25 cm od lampy UV. Po okresie inkubacji, odsączano azotan srebra, a komórki 3-krotnie płukano w wodzie destylowanej. W celu usunięcia wolnych jonów srebra komórki inkubowano przez 3 minuty z roztworem tiosiarczanu sodu, a następnie ponownie płukano w wodzie destylowanej. Tło podbarwiano roztworem czerwieni wapniowej. Po ostatecznym płukaniu i wysuszeniu preparat oceniano w mikroskopie świetlnym pod 10-krotnym powiększeniem.

Złogi soli mineralnych wybarwione azotanem srebra (AgNO_3) w obrazie mikroskopowym uwidoczniono jako drobne, ciemno-zabarwione punkty.

5.9. Badanie aktywności fosfatazy alkalicznej (ALP).

Fosfataza alkaliczna uznawana jest za wczesny marker różnicowania komórkowego, który bierze udział w procesie mineralizacji. W doświadczeniu użyto zestawu QuantiChrom™ Alkaline Phosphatase Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA), który wykorzystuje reakcję hydrolizy fosforanu p-nitrofenylowego, katalizowaną przez ALP, do p-nitrofenolu (żółte zabarwienie, maksymalna absorbcja światła przy długości fali 405 nm) oraz fosforanu.

W celu zbadania aktywności fosfatazy alkalicznej 1×10^4 komórek płukano w PBS i poddano lizie w 0,5 ml 0,2% roztworu Triton® X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), kolejno wirowano 10 minut z prędkością $10000 \times g$ i zbierano supernatant. W pojedynczych studzienkach na 96 studzienkowej płytce umieszczono 50 μl ekstraktu, do którego dodawano 150 μl odczynnika QuantiChrom™ Alkaline Phosphatase. Aktywność enzymu oceniano kolorymetrycznie w spektrofotometrze (Victor3, Perkin Elmer) przy długości fali 405 nm. Odczytu dokonywano 2-krotnie, natychmiast po dodaniu odczynnika do próbki oraz po 4 minutach inkubacji. Obliczeń dokonano w arkuszu kalkulacyjnym MS Excel®, przy użyciu wzoru:

$$\frac{(\text{OD}_{\text{próbki } t_{4\text{min}}} - \text{OD}_{\text{próbki } t_{0\text{min}}}) \times \text{całkowita objętość próbki}}{(\text{OD}_{\text{KALIBRATORA}} - \text{OD}_{\text{WODY DEST.}}) \times \text{objętość ekstraktu} \times t}$$

OD - gęstość optyczna

Aktywność ALP została wyrażona w jednostce $\text{IU/L} = \mu\text{mol}/(\text{L} \times \text{min})$. Doświadczenie przeprowadzono 3-krotnie w trzech powtórzeniach.

5.10. Badanie poziomu wapnia wewnątrzkomórkowego.

Poziom wapnia wewnątrzkomórkowego świadczący o aktywności mineralizacyjnej komórek oceniono z użyciem zestawu QuantiChrom™ Calcium Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA). Do doświadczenia użyto fenylosulfoneftaleiny, tworzącej zabarwiony na niebiesko stabilny kompleks z wolnym wapniem. Intensywność koloru badanych próbek mierzona absorpcją światła przy długości fali 612 nm w spektrofotometrze jest wprost proporcjonalna do koncentracji wapnia w próbce.

Dla oceny poziomu wapnia wewnątrzkomórkowego, 1×10^4 komórek płukano w PBS i poddano lizie w 0,5 ml 0,2% roztworu Triton® X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), wirowano 10 minut, 10000×g, a supernatant zbierano do dalszej analizy. W pojedynczych studzienkach na 96 studzienkowej płytce do hodowli komórkowych umieszczono 5 µl ekstraktu i dodano 200 µl odczynnika QuantiChrom™ Calcium. Dodatkowo zgodnie z protokołem zalecanym przez producenta wykonano krzywą standardową z załączonych do zestawu odczynników. Po 3 minutach inkubacji odczytano poziom absorpcji światła (długość fali 612 nm). Obliczeń dokonano w arkuszu kalkulacyjnym MS Excel®, przy użyciu wzoru:

$$\frac{OD_{\text{PRÓBK}} - OD_{\text{WODY}}}{\text{LINIA TRENDU}}$$

OD_{próbki} - gęstość optyczna badanej próbki.

OD_{wody} - gęstość optyczna wody destylowanej (mierzona w krzywej standardowej).

LINIA TRENDU - obliczona wartość linii trendu krzywej standardowej.

Poziom wapnia wewnątrzkomórkowego został wyrażony w jednostce µg/ml.

Doświadczenie przeprowadzono 3-krotnie w trzech powtórzeniach.

5.11. Izolacja RNA.

Całkowite RNA izolowano z komórek DPSC i SCAP przy użyciu preparatu RNA STAT-60 Kit (Tel-Test Inc., Friedenswood, TX, USA) zgodnie z protokołem zalecanym przez producenta. Do 75 ml butelek do hodowli komórkowych, po odsączeniu pożywki i przepłukaniu w PBS dodano 1 ml RNA STAT-60 i pozostawiono przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie uzupełniono o 0,2 ml chloroformu, wstrząsano przez 15 sek. i pozostawiono w temperaturze pokojowej na 2-3 minuty. Homogenat wirowano przez 5 minut w 12000×g w 4°C, a uzyskaną wodną frakcję (górną) zawierającą RNA przeniesiono do nowej próbki, do której dodano 0,5 ml izopropanolu. Próbkę pozostawiono na 10 minut w temperaturze pokojowej i wirowano w 12000×g przez 5 minut w 4°C. Supernatant usuwano, a do RNA widocznego w postaci białego osadu na dnie próbki dodawano 1ml 75% etanolu i energicznie mieszano w celu oczyszczenia materiału. Próbkę wirowano z prędkością 7500×g w 4°C przez 10 minut, supernatant odsączono, a osadzone na dnie próbki RNA suszono w temperaturze pokojowej, a następnie rozpuszczano w 20 µl jałowej wody destylowanej wolnej od RNaz. Tak przygotowane próbki RNA przechowywano w temp -80°C do dalszych doświadczeń.

5.12. Reakcja odwrotnej transkrypcji PCR (RT-PCR, *reverse transcriptase* PCR).

Przy użyciu matrycowego RNA, przeprowadzono reakcję syntezy komplementarnego DNA (ang. *complementary* DNA, cDNA) przy użyciu zestawu Omniscript RT (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). Reakcję przeprowadzono z użyciem mieszaniny reakcyjnej, której skład przedstawiono w Tabeli nr 1. Następnie próbki umieszczano w termocyklerze Eppendorf, a reakcję przeprowadzono według schematu przedstawionego w Tabeli nr 2. Stężenie uzyskanego cDNA określano na podstawie odczytu absorbancji przy długości fali 260 i 280 nm z użyciem spektrofotometru

(ThermoScientific, USA). Otrzymane cDNA przechowywano w +4°C do dalszych doświadczeń.

Tabela 1. Skład mieszaniny reakcyjnej używanej do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji PCR.

SKŁADNIKI	ILOŚĆ
Bufor × 10	2 µl
dNTP	2 µl
Odwrotna Transkryptaza	1 µl
Inhibitor RN-az	0,25 µl
Starter Oligo (dT)	1 µl
Woda	12,75 µl
mRNA	1 µl
SUMA	20 µl

Tabela 2. Profil czasowo-temperaturowy reakcji odwrotnej transkrypcji PCR.

	TEMPERATURA	CZAS
Przyłączenie startera i wydłużanie cDNA	40°C	60 minut
Denaturacja hybrydu RNA - cDNA	95°C	5 minut

5.13. Ocena ekspresji genów *OC*, *DMP1*, *DSPP* metodą PCR w czasie rzeczywistym (*real-time* PCR).

Ilościowy poziom ekspresji genów badano z użyciem zestawu QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). Barwnik SYBR Green interkaluje w strukturę dwuniciowego DNA i emituje światło o długości fali 530 nm. Poziom ekspresji badanych genów normalizowano w odniesieniu do poziomu cDNA genu referencyjnego

(β -aktyna), co pozwoliło określić wyjściowe stężenie amplifikowanego cDNA z badanych prób na podstawie krzywych standardowych. Doświadczenie przeprowadzono w szklanych kapilarach o objętości końcowej 20 μ l. Startery użyte do przeprowadzenia reakcji przedstawiono w Tabeli nr 3, skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w Tabeli nr 4, a reakcję przeprowadzono według protokołu przedstawionego w Tabeli nr 5.

Tabela 3. Startery użyte do przeprowadzenia reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

GEN	STARTER SENSOWNY	STARTER ANTYSSENSOWNY
<i>OC</i>	5' GCGCAGCCACCGAGACACCA 3'	5' GCTCCAGGGGATCCGGGTAG 3'
<i>DMP1</i>	5' CCTGAGGAGCGTATAGAAGGACCCA 3'	5' CCCTCCCTCGTTCTCCAACGC 3'
<i>DSPP</i>	5'GAAGATGCTGGCCTGGATAA 3'	5' TCTTCTTTCCCATGGTCCTG 3'

Tabela 4. Skład mieszaniny reakcyjnej użytej do reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

SKŁADNIKI	ILOŚĆ
SYBR Green	10 μ l
STARTER SENSOWNY	2 μ l
STARTER ANTYSSENSOWNY	2 μ l
cDNA	1 μ l
WODA	5 μ l
SUMA	20 μl

Tabela 5. Profil temperaturowo - czasowy reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

PREINKUBACJA	1 cykl	15 sekund	95°C
AMPLIFIKACJA	45-55 cykli - ilość cykli zależna od osiągnięcia „plateau” przez amplifikowane produkty w danym nastawieniu		
	Denaturacja	15 sekund	94°C
	Przyłączanie starterów	30 sekund	58°C
	Wydłużanie	40 sekund	72°C
KRZYWA TOPNIENIA	Denaturacja	-	95°C
	<i>Aniling</i>	15 sekund	65°C
	Powolna denaturacja	-	95°C
CHŁODZENIE	1 cykl	∞	4°C

Na podstawie analizy krzywej topnienia identyfikowano produkty, a reakcję uznawano za prawidłową, jeżeli temperatura topnienia produktu odpowiadała temperaturze topnienia jego wzorca. Poziom ekspresji genów badanych normalizowano względem poziomu ekspresji genu referencyjnego (β -aktyna) i obliczano na podstawie stosunku ilości cDNA odczytanych z krzywych wzorcowych do ilości cDNA β -aktyny.

5.14. Analiza statystyczna.

Dla oceny istotności różnic pomiędzy średnimi wynikami w doświadczeniach, wykorzystano test t-Student’a. Istotność statystyczną przyjęto na poziomie $p < 0,05$.

6. WYNIKI.

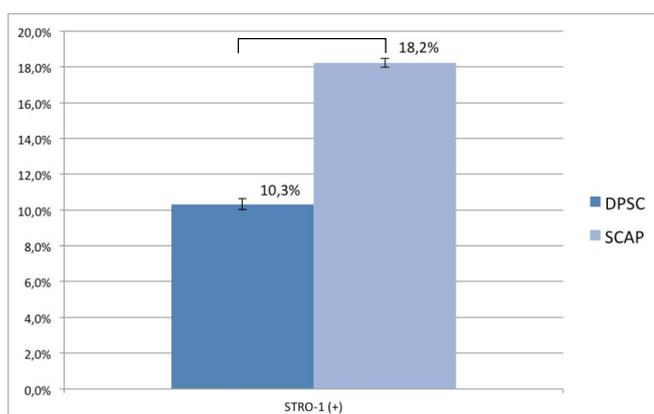
6.1. Ocena mezenchymalnego fenotypu linii komórek SCAP i DPSC.

*

Mezenchymalny fenotyp komórek obu linii SCAP i DPSC został określony metodą MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) z użyciem przeciwciał przeciwko ludzkiemu receptorowi błonowemu STRO-1 oraz CD146 (sortowanie pozytywne), natomiast komórki hematopoetyczne i leukocyty wyeliminowano sortowaniem negatywnym z użyciem przeciwciał przeciwko receptorom CD34 i CD45.

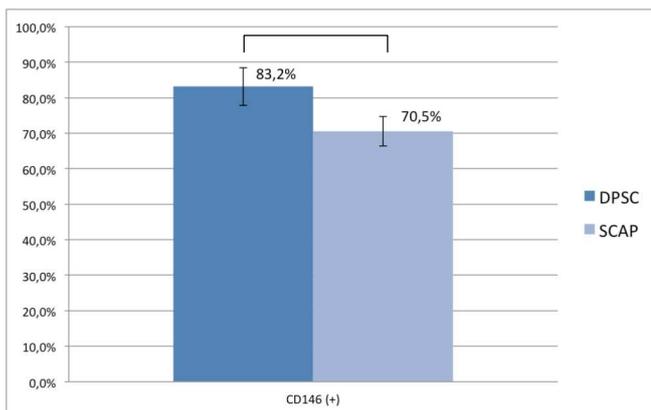
Obecność epitopu STRO-1 stwierdzono na powierzchni komórek obu badanych linii (Ryc.3). Komórki STRO-1(+) w populacji SCAP stanowiły 18,2% ($\pm 1,3\%$), natomiast w populacji DPSC odsetek ten wyniósł 10,3% ($\pm 3,1\%$). Następnie komórki STRO-1(+) poddano selekcji na obecność receptora CD146 (Ryc.4). Zaobserwowano większą liczbę komórek CD146(+) w populacji komórek DPSC: 83,2% ($\pm 6,4\%$), podczas gdy w populacji SCAP było ich mniej: 70,5% ($\pm 5,9\%$).

Komórki o fenotypie STRO-1(+), CD146(+) kolejno poddano jednoczasowej selekcji negatywnej na obecność epitopów CD34 i CD45 (Ryc.5). Przeprowadzona analiza wykazała, że 93,3% ($\pm 2,8\%$) komórek SCAP nie posiadało receptora CD34 i CD45, podczas gdy w populacji DPSC receptorów tych nie posiadało 84,8% ($\pm 2,8\%$) komórek.



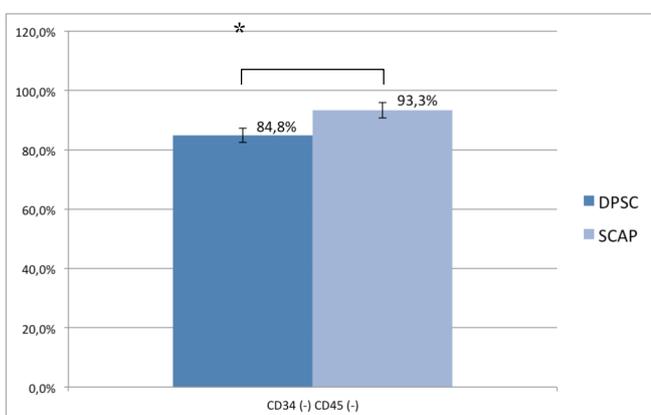
LINIA KOMÓRKOWA	STRO-1(+)
DPSC	10,3% ($\pm 3,1\%$)
SCAP	18,2% ($\pm 1,3\%$)

Rycina 3. Odsetek komórek DPSC i SCAP, prezentujących na powierzchni obecność receptora błonowego STRO-1. Przedstawione wyniki są średnimi z czterech niezależnych doświadczeń \pm SD. * $P < 0,05$.



LINIA KOMÓRKOWA	CD146(+)
DPSC	83,2% (±6,4%)
SCAP	70,5% (±5,9%)

Rycina 4. Odsetek komórek DPSC STRO-1(+) i SCAP STRO-1(+), prezentujących epitop CD146. Przedstawione wyniki są średnimi z czterech niezależnych doświadczeń \pm SD. * $P < 0,05$.



LINIA KOMÓRKOWA	CD34(-) CD45(-)
DPSC	84,8% (±2,8%)
SCAP	93,3% (±2,8%)

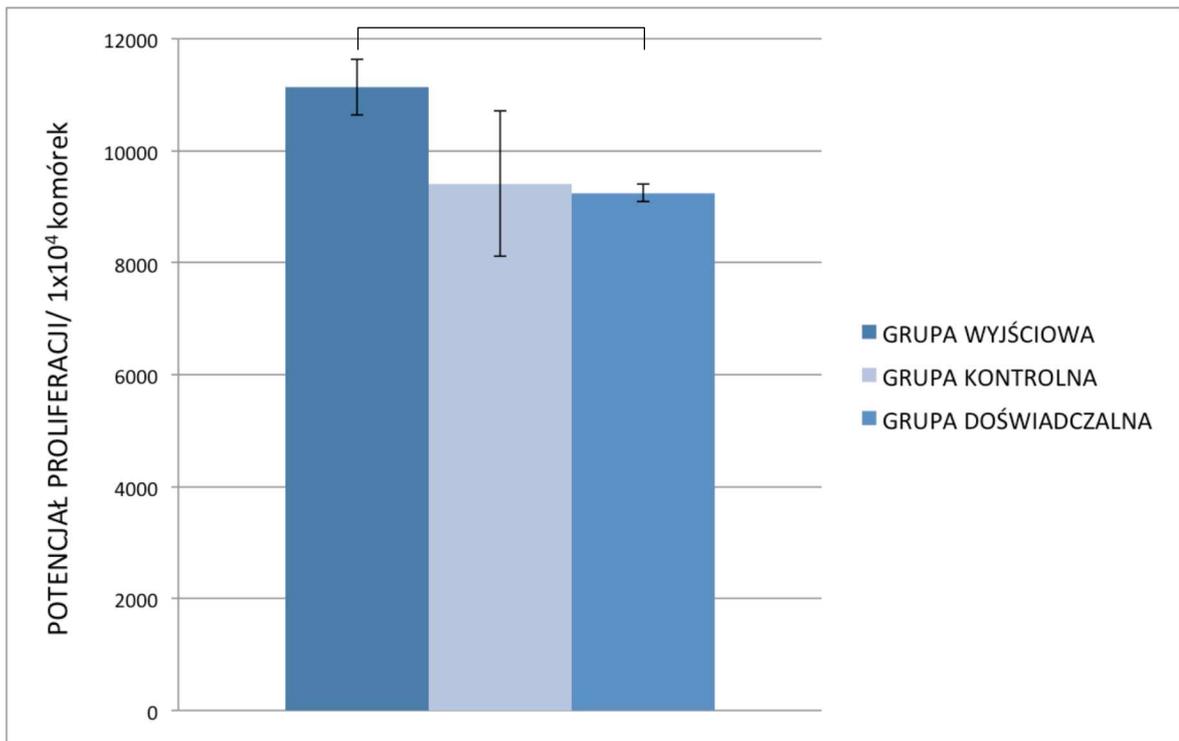
Rycina 5. Odsetek komórek DPSC STRO-1(+) CD146(+) i SCAP STRO1(+) CD146(+), bez epitopu CD34 i CD45. Przedstawione wyniki są średnimi z czterech niezależnych doświadczeń \pm SD. * $P < 0,05$.

6.2. Ocena potencjału proliferacji komórek macierzystych SCAP i DPSC.

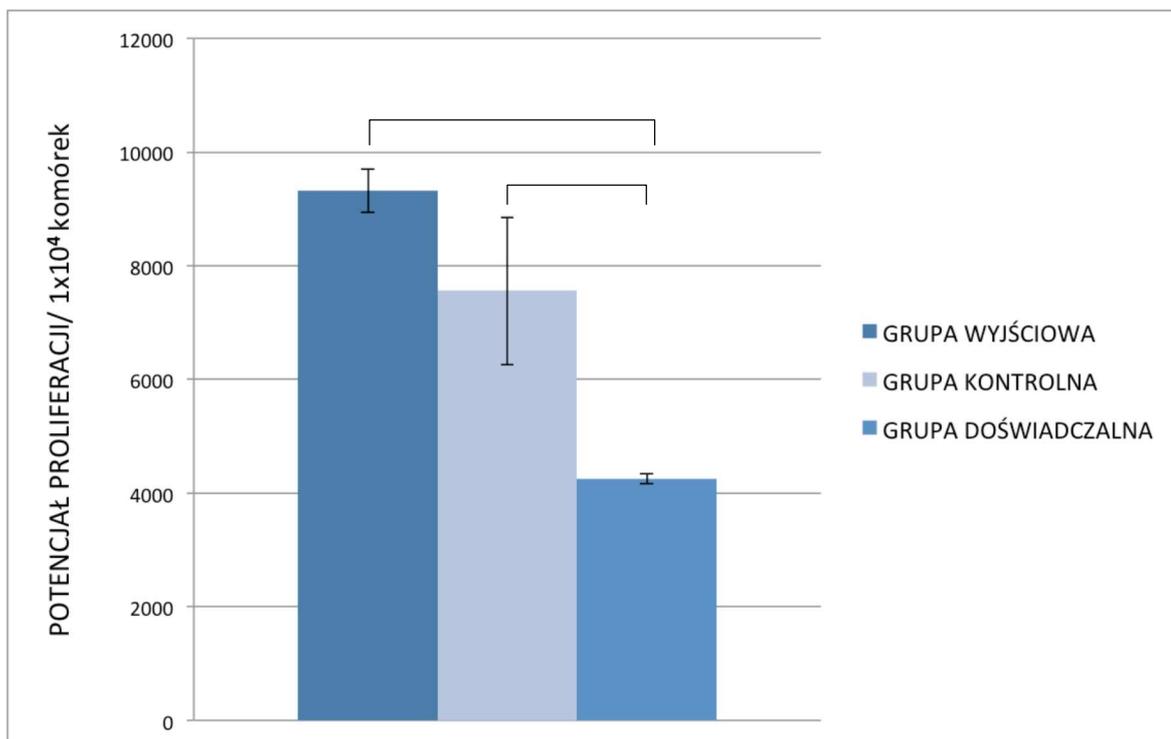
Dla oceny, w jakim stopniu pożywka modyfikowana składnikami stymulującymi mineralizację (deksametazon, β -glicerofosforan, kwas L-askorbinowy) wpływa na potencjał proliferacyjny komórek, zastosowano metodę ilościowej oceny proliferacji, wykorzystującą pomiar szybkości reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę mitochondrialną, polegającą na rozkładzie soli tetrazolowej do formazanu (WST-1).

Komórki izolowane z brodawki wierzchołkowej we wszystkich grupach badawczych (pasaż 5 oraz po 6 tygodniach obserwacji) dzieliły się szybciej w porównaniu

z komórkami pochodzącymi z miazgi zęba (Ryc.6, 7). Szczególny wpływ na wynik doświadczenia miała promineralizacyjna stymulacja środowiska hodowlanego. Komórki grupy doświadczalnej DPSC proliferowały znacznie wolniej w stosunku do DPSC z grupy kontrolnej, natomiast komórki w grupie doświadczalnej SCAP nie wykazywały różnic w szybkości proliferacji w porównaniu z grupą kontrolną SCAP. Zarówno komórki DPSC jak i SCAP wykazywały większy potencjał proliferacyjny na początku doświadczenia (pasaż 5) w stosunku do komórek po czasie obserwacji (6 tygodni). We wszystkich grupach badawczych komórki z brodawki wierzchołkowej dzieliły się szybciej niż komórki pochodzące z miazgi zęba.



Rycina 6. Ocena potencjału proliferacji komórek SCAP. Grupa wyjściowa badanych komórek wykazała największą zdolność proliferacyjną. Po 6 tygodniach stymulacji w grupie doświadczalnej komórek SCAP potencjał proliferacji był nieznacznie mniejszy w stosunku do grupy wyjściowej (pasaż 5) i zbliżony do grupy kontrolnej. Przedstawione wyniki są średnimi z trzech niezależnych doświadczeń \pm SD. * $P < 0,05$.



Rycina 7. Ocena potencjału proliferacji komórek DPSC. Grupa wyjściowa (pasaż 5) badanych komórek wykazała największą zdolność proliferacyjną. W grupie doświadczalnej komórek (po 6 tygodniach stymulacji) potencjał proliferacji był statystycznie istotnie niższy w stosunku do grupy kontrolnej. Przedstawione wyniki są średnimi z trzech niezależnych doświadczeń \pm SD. * $P < 0,05$.

6.3. Ocena zdolności formowania kolonii (CFU-F) komórek macierzystych SCAP i DPSC.

Charakterystyczną cechą komórek pochodzenia mezenchymalnego jest zdolność formowania kolonii pochodzących z pojedynczej fibroblastopodobnej komórki (CFU-F), co pośrednio może świadczyć o stopniu ich dojrzałości i zróżnicowaniu. Wyniki uzyskane w barwieniu *Giemsy* (Ryc.8, 9) wykazały, że komórki DPSC i SCAP są zdolne do tworzenia kolonii, co uwidocznilo się jako obraz tworzących się „wirów”, będących efektem powstania populacji pochodzącej z pojedynczej komórki progenitorowej. Na początku doświadczenia (pasaż 5) w populacji komórek SCAP stwierdzono większą ilość

komórek progenitorowych. Objawiało się to powstaniem liczniejszych i większych kolonii w porównaniu z komórkami DPSC we wszystkich badanych grupach. Na końcu obserwacji (po 6 tygodniach) w grupie doświadczalnej ilość i wielkość tworzących się kolonii komórek SCAP nieznacznie zmalała (Ryc.8 E,F), w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc.8 C,D). Większą dysproporcję w tworzeniu kolonii między grupą doświadczalną i kontrolną zaobserwowano na tym samym etapie doświadczenia w grupie komórek DPSC (Ryc.9 C,D,E,F). W obrazie makroskopowym hodowli komórek SCAP, zaobserwowano 85-90% konfluencję (Ryc.8 B,D,F), podczas gdy hodowla komórek DPSC osiągnęła konfluencję około 60 % (Ryc.9 B,D,F).

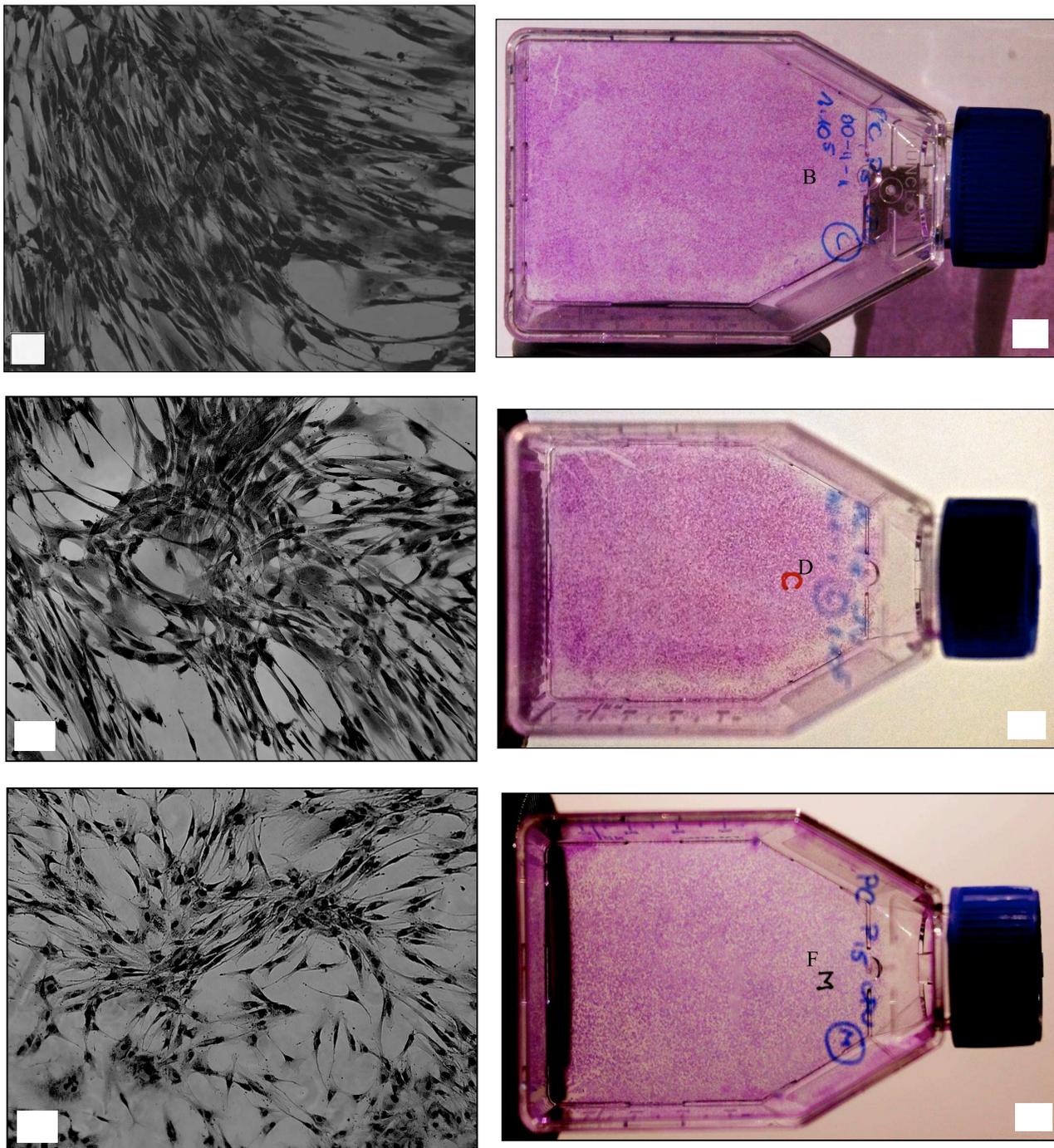
Tabela 6. Sumaryczne zestawienie wyników oceny zdolności tworzenia kolonii (CFU) przez komórki SCAP oraz DPSC.

	GRUPA WYJŚCIOWA¹	GRUPA KONTROLNA²	GRUPA DOŚWIADCZALNA³
SCAP	++++	+++	++
DPSC	+++	++	+

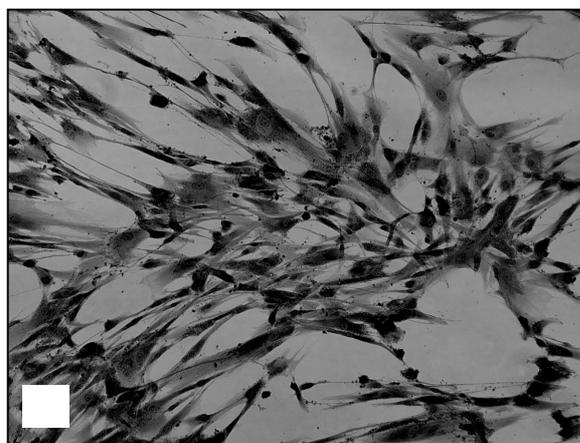
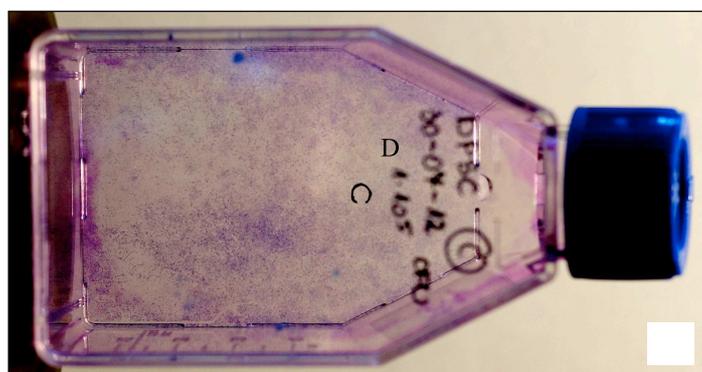
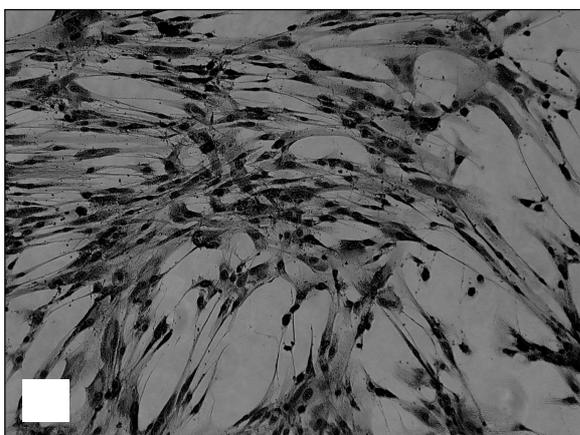
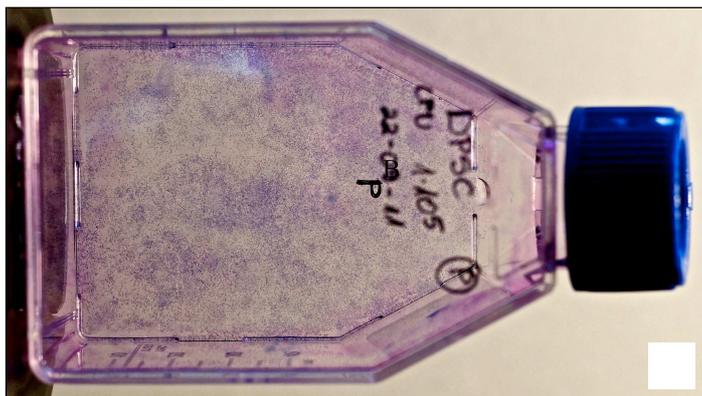
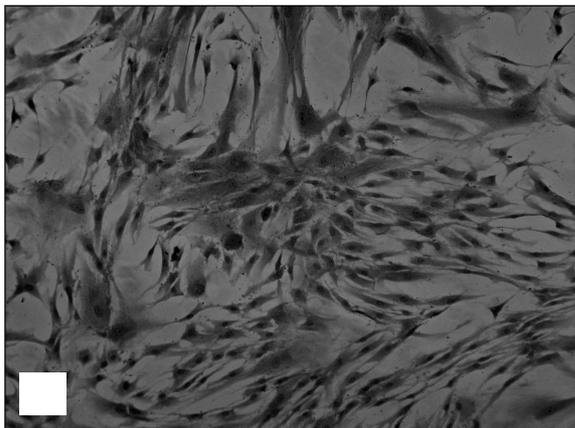
¹ grupa wyjściowa, pasaż 5.

² grupa kontrolna, po 6 tygodniach hodowli w standardowej pożywce.

³ grupa doświadczalna, po 6 tygodniach stymulacji promineralizacyjnej.



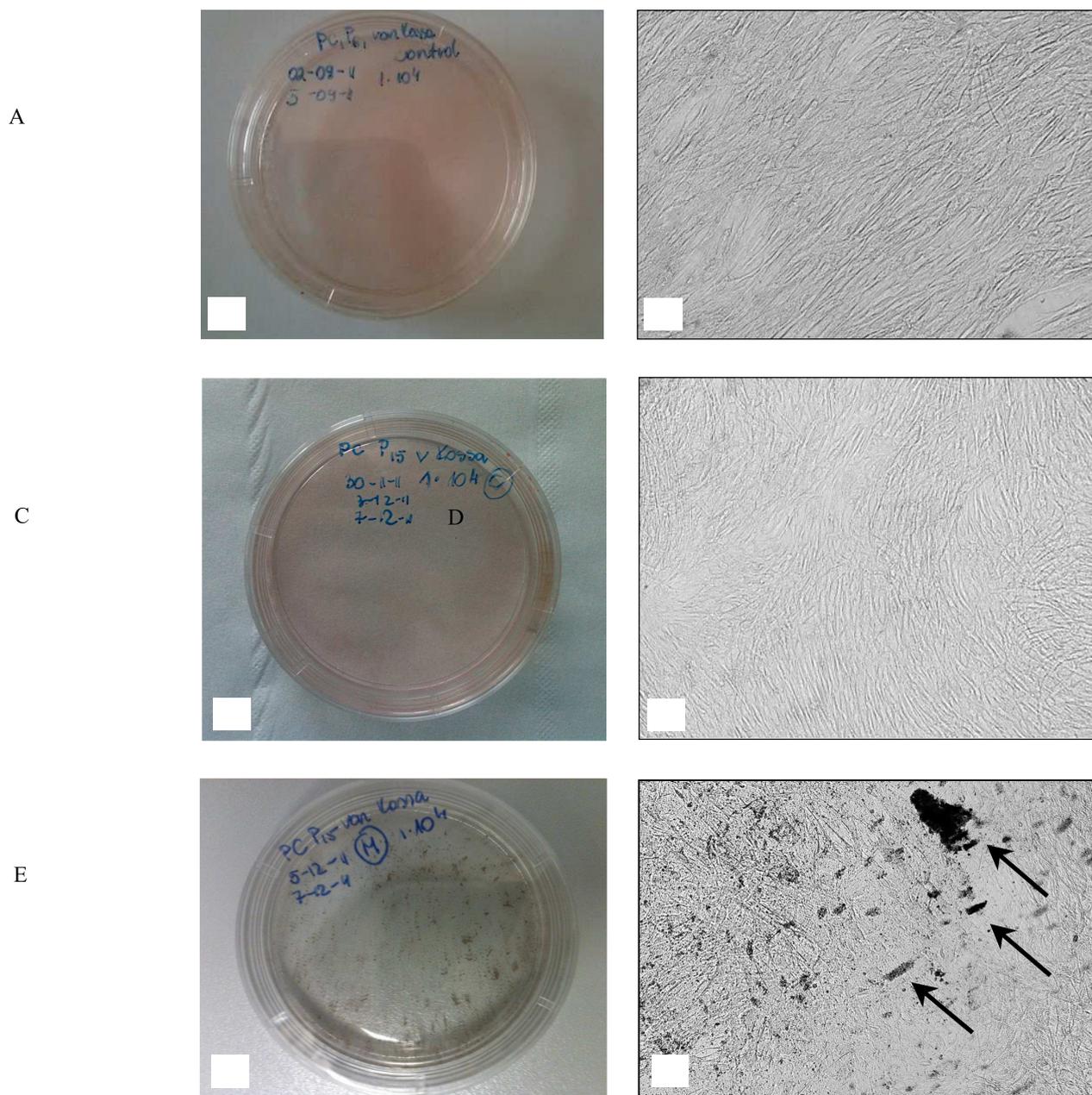
Rycina 8. Obraz mikroskopowy (A,C,E) (powiększenie 10×) oraz makroskopowy (B,D,F) komórek SCAP wybarwionych metodą *Giemsy*. A,B: grupa wyjściowa; C,D: grupa kontrolna; E,F: grupa doświadczalna. Wyjściowa grupa komórek SCAP wykazywała największy potencjał tworzenia kolonii (A,B), osiągając konfluencję 90%. Komórki grupy doświadczalnej dzieliły się nieznacznie wolniej, osiągając konfluencję 80% (E,F) oraz tworząc mniejsze i mniej liczne kolonie w porównaniu z grupą kontrolną (C,D).



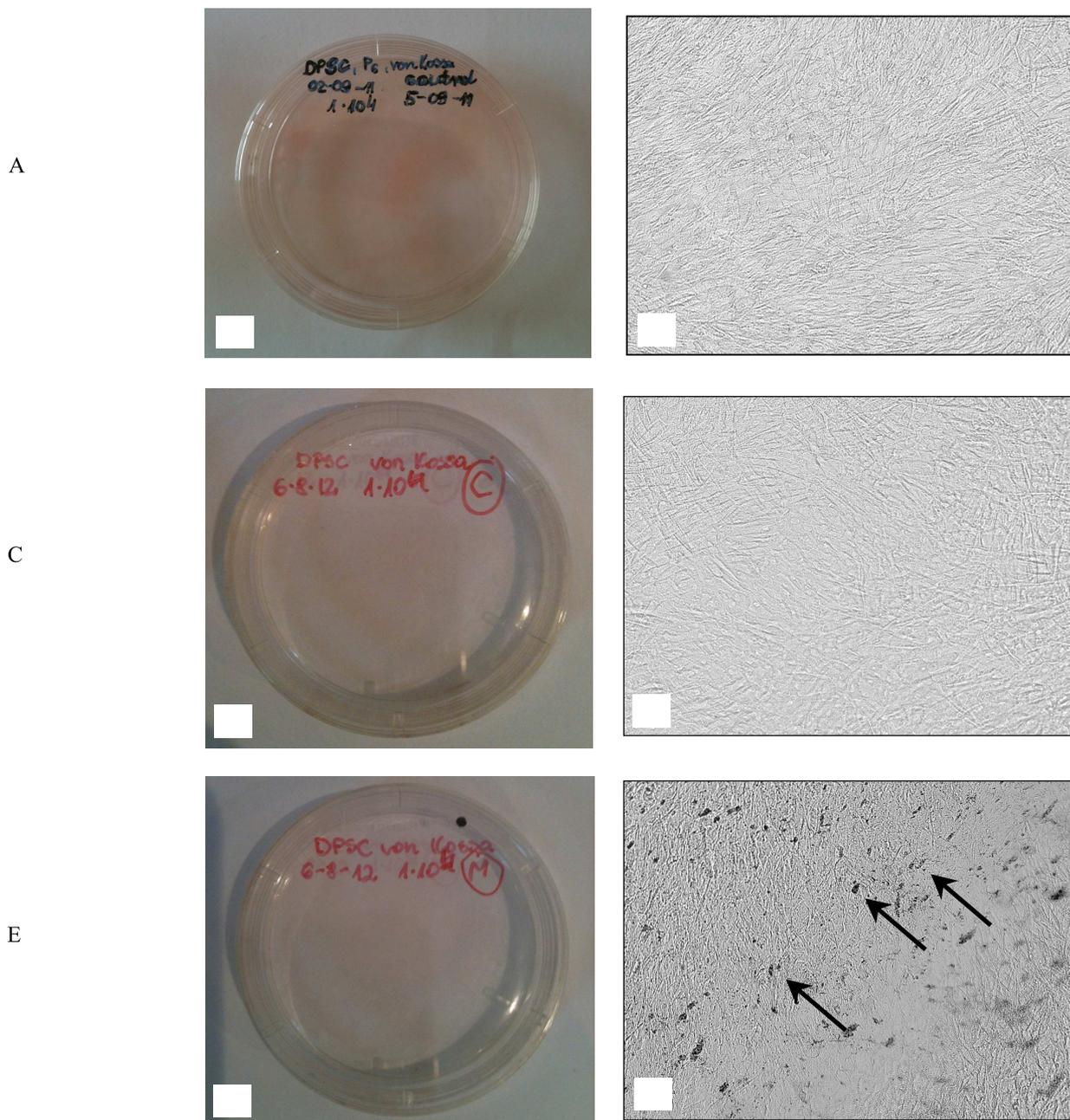
Rycina 9. Obrazy mikroskopowy (A,C,E) (powiększenie 10×) i makroskopowy (B,D,F) komórek DPSC, wybarwionych metodą *Giemsa*. A,B: grupa wyjściowa; C,D: grupa kontrolna; E,F: grupa doświadczalna. Wyjściowa grupa komórek DPSC wykazywała największy potencjał tworzenia kolonii (A,B). Komórki grupy doświadczalnej dzieliły się wolniej, a utworzonych kolonii było mniej (E,F) w porównaniu z grupą kontrolną (C,D).

6.4. Ocena odkładania złogów mineralnych przez komórki SCAP i DPSC – barwienie metodą *von Kossa*.

Cechą określającą pierwotny charakter komórki progenitorowej jest zdolność do różnicowania w liczne linie rozwojowe (charakter multipotencjalny). W celu oceny stopnia różnicowania komórek izolowanych z brodawki wierzchołkowej i miazgi zęba w kierunku odontoblastów oceniono zdolność odkładania złogów mineralnych przez obie linie komórkowe. Złogi soli mineralnych (węglany i fosforany wapnia) powstające w procesie mineralizacji zostały wybarwione azotanem srebra (AgNO_3), który wypiera jony wapniowe ze związków nieorganicznych i zastępuje je jonami srebra, co uwidacznia się w obrazie mikroskopowym i makroskopowym w postaci drobnych, ciemno zabarwionych punktów. Po 21 dniach prowadzonego doświadczenia komórki DPSC i SCAP uzyskały całkowitą konfluencję. W grupie doświadczalnej komórek SCAP barwienie azotanem srebra wykazało obecność utrwalonych soli mineralnych w postaci ciemno zabarwionych punktów, widocznych zarówno w obrazie makroskopowym jak i mikroskopowym (Ryc.10 E,F). Natomiast w obrazie makroskopowym grupy doświadczalnej komórek DPSC złogi soli mineralnych nie były widoczne, jedynie w powiększeniu mikroskopowym zauważalne były drobne ciemno zabarwione punkty (Ryc.11 E,F). W grupie wyjściowej i kontrolnej SCAP oraz DPSC nie zaobserwowano aktywności mineralizacyjnej (Ryc.10 A,B,C,D; Ryc.11 A,B,C,D). Przeprowadzona analiza wykazała zdolność do odkładania zewnątrzkomórkowych złogów mineralnych przez komórki DPSC i SCAP, z przewagą aktywności mineralizacyjnej w komórkach izolowanych z brodawki wierzchołkowej, co wskazuje na aktywność promineralizacyjną komórek pochodzących z grup doświadczalnych obu linii komórkowych.



Rycina 10. Obraz makroskopowy (A,C,E) i mikroskopowy (B,D,F) (powiększenie 10×) komórek SCAP barwionych metodą *von Kossa*. A,B: grupa wyjściowa; C,D: grupa kontrolna; E,F: grupa doświadczalna. Komórki grupy doświadczalnej posiadają zdolność do tworzenia złogów soli mineralnych *in vitro*, widocznych jako ciemno zabarwione punkty (strzałki) (E,F). W grupie wyjściowej (A,B) oraz kontrolnej (C,D) nie stwierdzono obecności złogów mineralnych.



Rycina 11. Obraz makroskopowy (A,C,E) i mikroskopowy (B,D,F) (powiększenie 10×) komórek DPSC barwionych metodą *von Kossa*. A,B: grupa wyjściowa; C,D: grupa kontrolna; E,F: grupa doświadczalna. Komórki grupy doświadczalnej posiadają zdolność tworzenia złogów soli mineralnych *in vitro* (strzałki) (E,F). W grupie wyjściowej (A,B) oraz kontrolnej (C,D) nie stwierdzono obecności złogów mineralnych.

6.5. Ocena aktywności fosfatazy alkalicznej (ALP) w komórkach SCAP i DPSC.

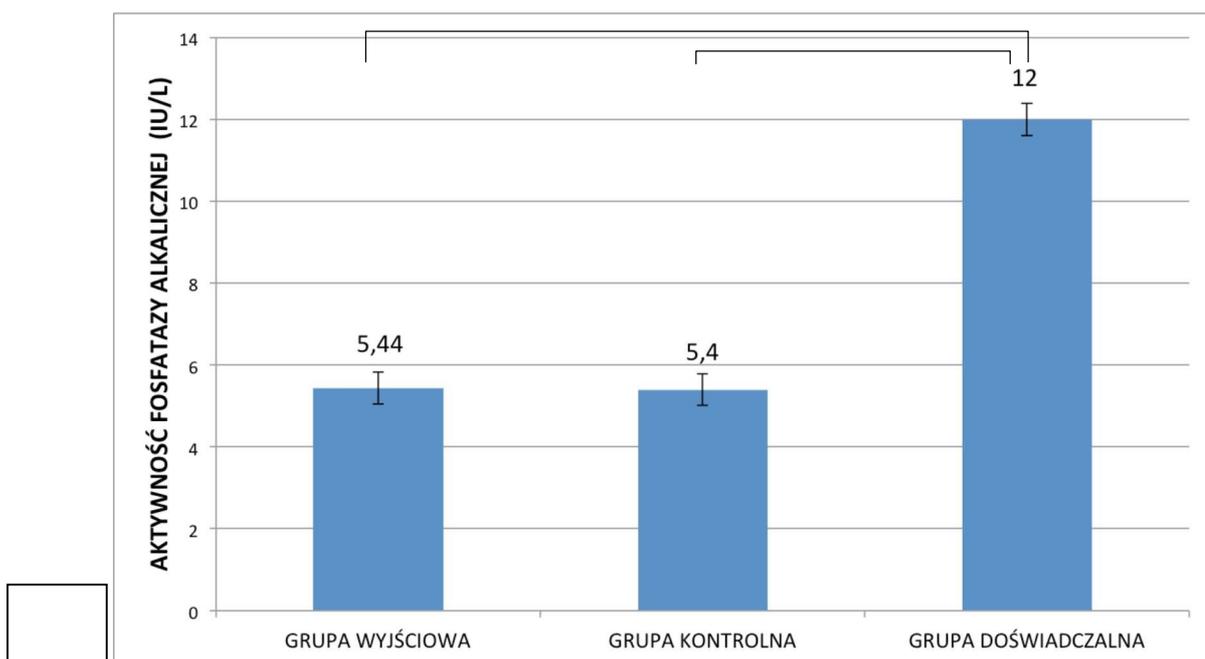
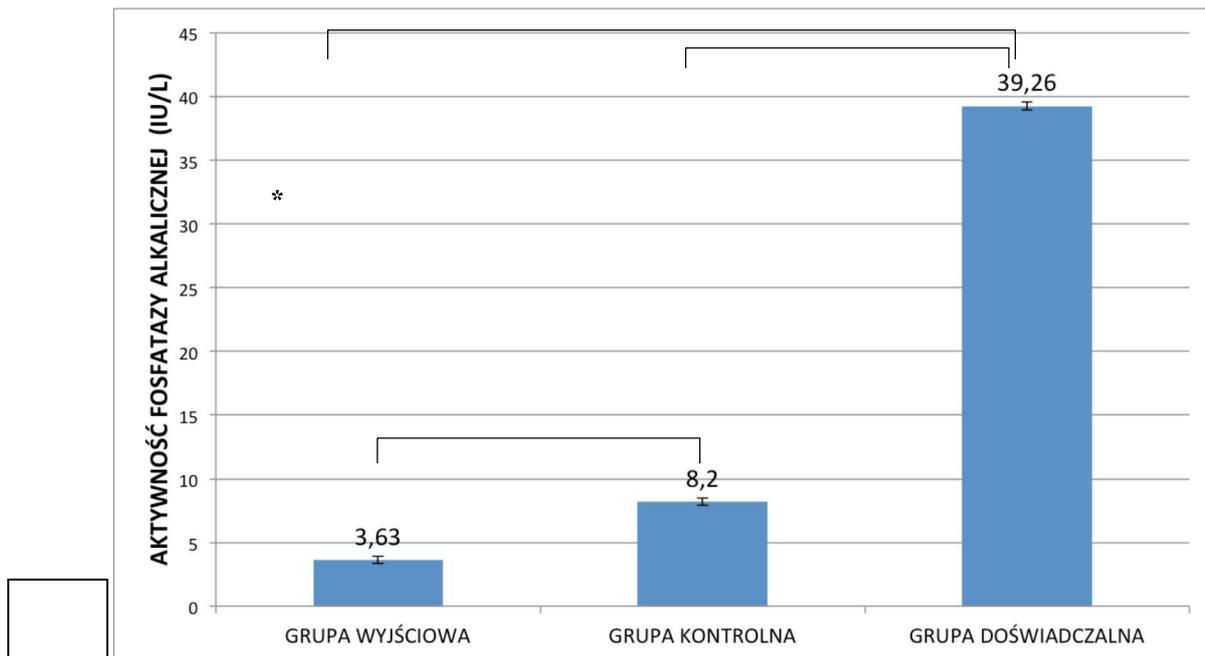
Fosfataza alkaliczna (ALP) uznawana jest za wczesny marker różnicowania komórkowego, który bierze udział w procesie mineralizacji. Hodowla komórek izolowanych z miazgi zęba oraz brodawki wierzchołkowej grupy doświadczalnej prowadzona była w pożywce stymulującej różnicowanie komórek w kierunku funkcjonalnych odontoblastów poprzez dodanie między innymi β -glicerofosforanu. Mechanizm, w którym β -glicerofosforan indukuje proces mineralizacji jest bezpośrednio związany z aktywnością fosfatazy alkalicznej. ALP hydrolizuje β -glicerofosforan, w wyniku czego uwalniane są jony fosforanowe, zaangażowane w proces tworzenia soli mineralnych, głównie fosforanów i węglanów wapnia.

Przeprowadzona analiza wykazała, że aktywność fosfatazy alkalicznej różniła się pomiędzy komórkami DPSC i SCAP. Po czterech minutach inkubacji poziom aktywności ALP w grupie wyjściowej komórek SCAP był najniższy i wynosił 3,63 IU/L ($\pm 0,38$). Nieznaczny wzrost aktywności zaobserwowano w grupie kontrolnej komórek 8,2 IU/L ($\pm 0,55$). Najwyższy poziom aktywności ALP wynoszący 39,26 IU/L ($\pm 0,98$) stwierdzono w grupie eksperymentalnej (Ryc.12A).

Poziom aktywności fosfatazy alkalicznej w komórkach DPSC (Ryc.12B) po czterech minutach inkubacji był najwyższy w grupie doświadczalnej i wynosił 12 IU/L ($\pm 0,17$). W grupie wyjściowej oraz kontrolnej linii DPSC poziom aktywności ALP był porównywalny i wynosił odpowiednio 5,44 IU/L ($\pm 0,38$) i 5,40 IU/L ($\pm 0,61$).

*

*



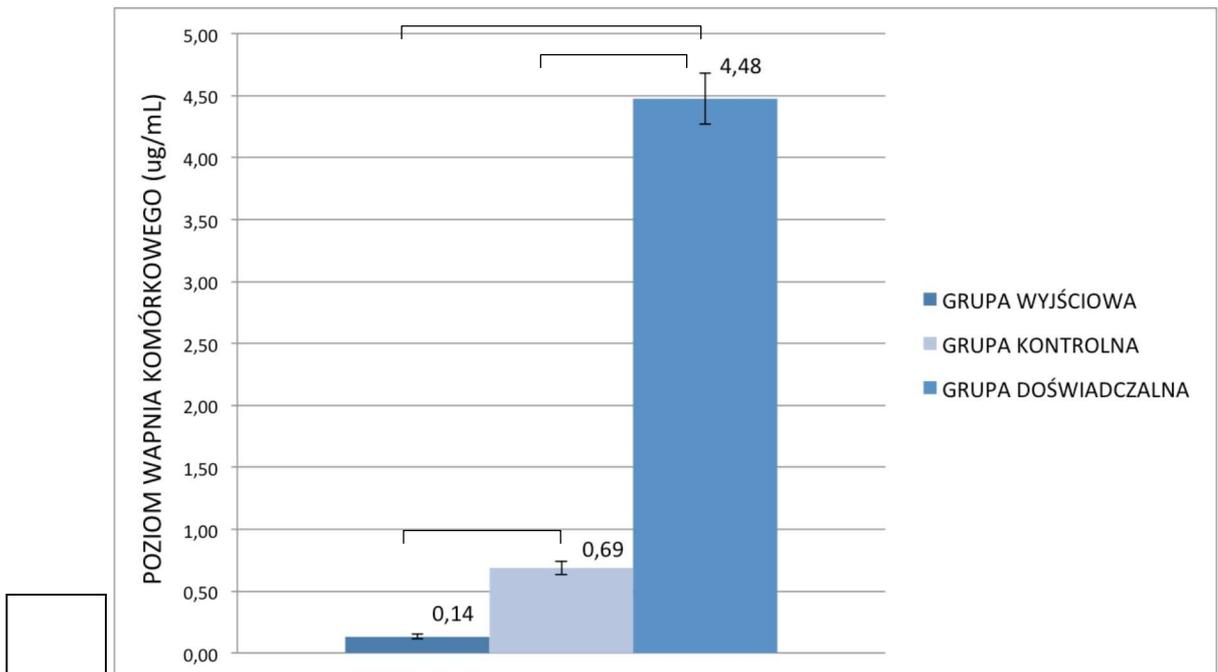
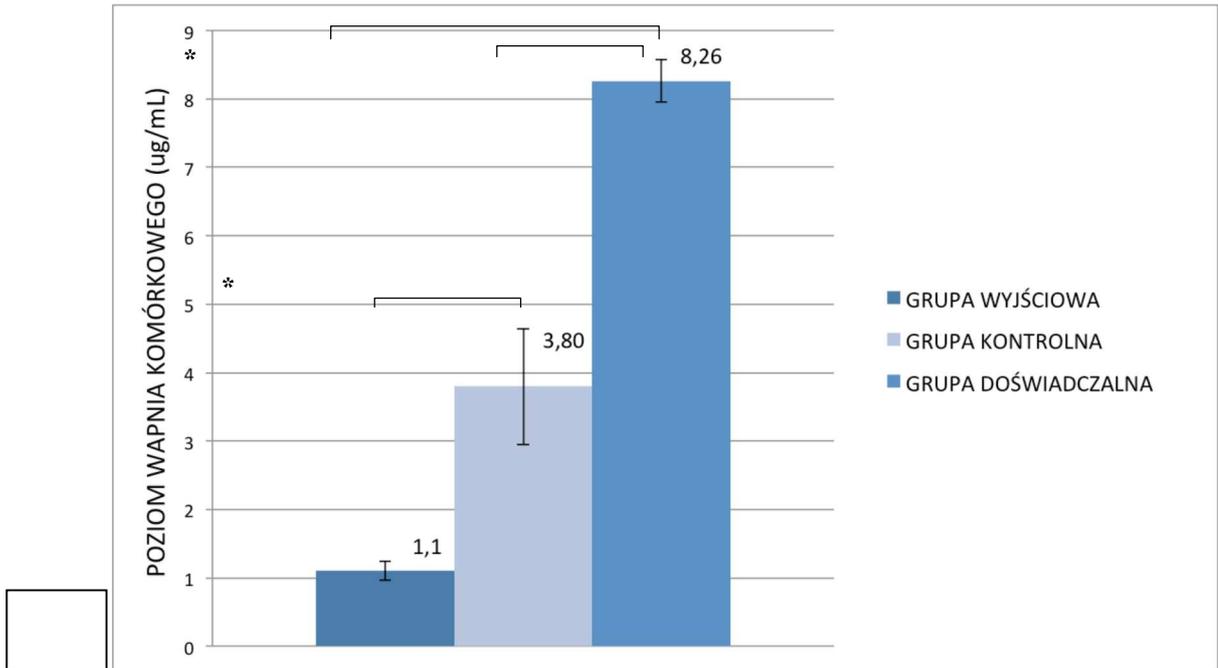
Rycina 12. Aktywność fosfatazy alkalicznej w komórkach SCAP (A) oraz DPSC (B), mierzona na podstawie absorpcji światła przy długości fali 405 nm przez p-nitrofenol, powstający w wyniku reakcji hydrolizy katalizowanej przez ALP. *P<0,05.

6.6. Ocena poziomu wapnia w komórkach SCAP i DPSC.

W celu precyzyjnej oceny potencjału mineralizacyjnego komórek SCAP i DPSC, zbadano poziom wapnia wewnątrzkomórkowego. Do przeprowadzenia doświadczenia użyto fenylosulfoneftaleiny, tworzącej zabarwiony na niebiesko stabilny kompleks z wolnym wapniem. Wzrost absorpcji światła o długość fali 612 nm przez barwnik jest wprost proporcjonalny do koncentracji wapnia w badanej próbce.

Przeprowadzona analiza wykazała, że w lizatach komórek SCAP grupy doświadczalnej, stymulowanej środowiskiem promineralizacyjnym poziom wapnia był najwyższy i wyniósł 8,26 $\mu\text{g/ml}$ ($\pm 0,31$), podczas gdy w grupie kontrolnej hodowanej w standardowej pożywce odnotowano 3,80 $\mu\text{g/ml}$ ($\pm 0,85$). Najniższą wynoszącą 1,1 $\mu\text{g/ml}$ ($\pm 0,14$) koncentrację wapnia uzyskano w wyjściowej grupie komórek SCAP (Ryc.13A).

W ekstraktach z komórek DPSC, stężenie wapnia komórkowego było niższe we wszystkich badanych próbkach w porównaniu ze SCAP (Ryc.13B). W grupie wyjściowej odnotowano stężenie na poziomie 0,14 $\mu\text{g/ml}$ ($\pm 0,21$), najwyższy poziom osiągnęła grupa doświadczalna: 4,48 $\mu\text{g/ml}$ ($\pm 0,20$), natomiast w grupie kontrolnej komórek DPSC poziom wapnia wyniósł 0,69 $\mu\text{g/ml}$ ($\pm 0,05$).



Rycina 13. Poziom stężenia wapnia w komórkach SCAP (A) oraz DPSC (B). Przedstawione wyniki są średnimi z trzech niezależnych doświadczeń ± SD. *P<0,05.

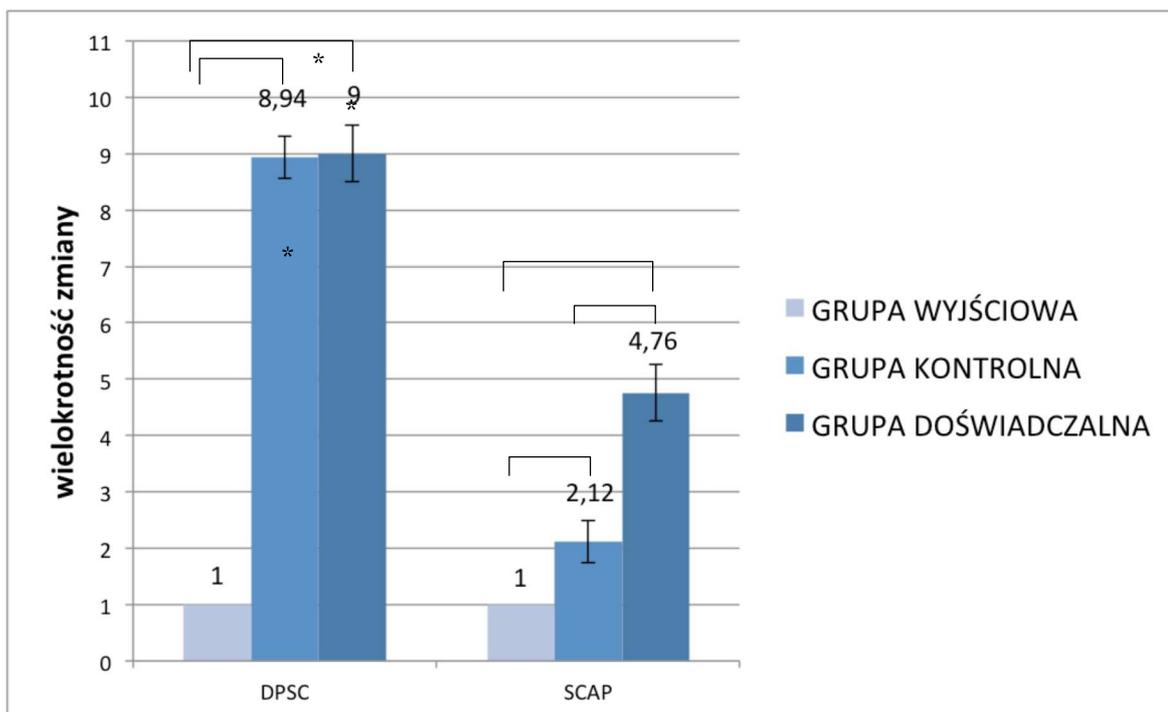
6.7. Poziom ekspresji genów *OC*, *DMP1* oraz *DSPP* w komórkach SCAP i DPSC.

W ostatnim etapie badań przeprowadzono metodą PCR w czasie rzeczywistym analizę ekspresji genów uznanych za markery rozwoju i dojrzewania odontoblastów. Analizie poddano ekspresję genu kodującego białko osteokalcynę (*OC*), która uznawana jest za wczesny marker różnicowania komórkowego, bezpośrednio zaangażowany w proces mineralizacji oraz geny kodujące białko macierzy zębinowej 1 (*DMP1*) oraz sialofosfoproteinę zębiny (*DSPP*), należące do późnych markerów rozwoju i dojrzewania odontoblastów.

Względny poziom ekspresji badanych genów normalizowano względem poziomu ekspresji genu referencyjnego (β -aktyny) i obliczano na podstawie stosunku ilości matrycowego DNA badanego genu do genu β -aktyny.

6.7.1. Ekspresja genu *osteokalcyny*.

Badanie PCR w czasie rzeczywistym potwierdziło ekspresję genu *osteokalcyny* w komórkach miazgi zęba i brodawki wierzchołkowej. Zaobserwowano, że stymulacja promineralizacyjna środowiska hodowlanego wpłynęła na 4,76-krotne zwiększenie ekspresji genu *OC* w linii komórek SCAP oraz 9-krotne zwiększenie w komórkach DPSC w stosunku do grupy wyjściowej (Ryc.14). Analiza ekspresji *OC* w grupach kontrolnych komórek SCAP i DPSC hodowanych w standardowej pożywce, wykazała odpowiednio 2,12-krotny i 8,94-krotny wzrost w porównaniu z grupą wyjściową (Ryc.14).

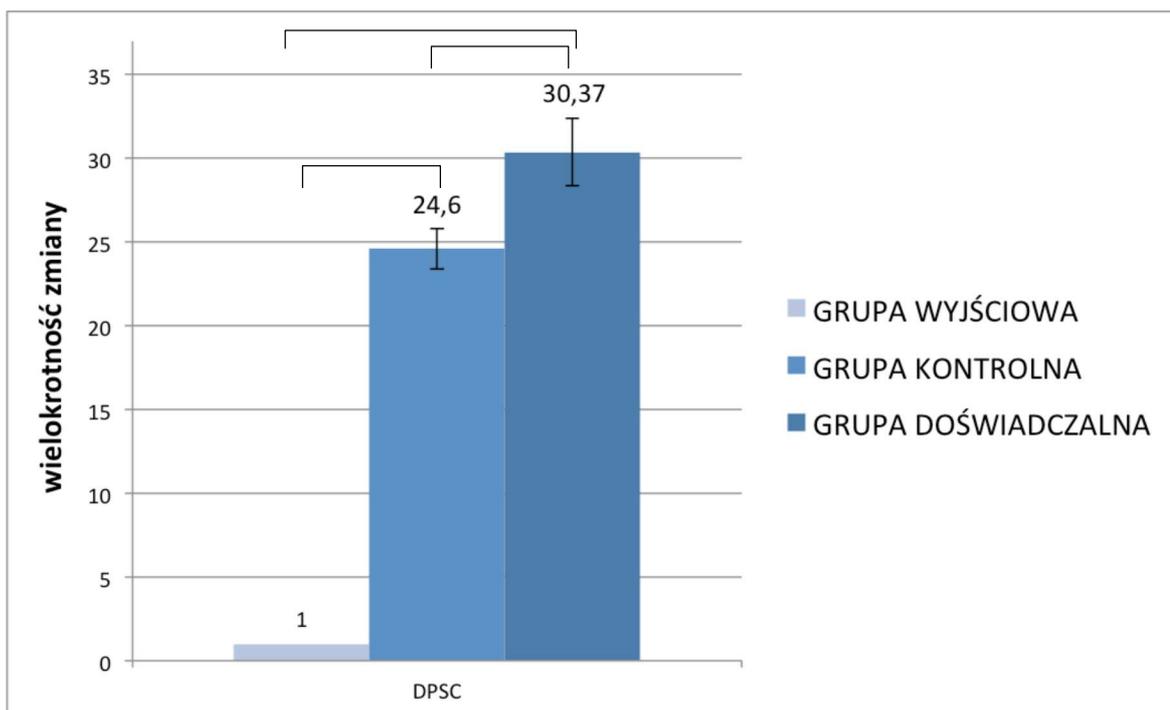


Rycina 14. Ocena wielokrotności zmian ekspresji genu kodującego białko osteokalcynę (*OC*) w linii komórek DPSC oraz SCAP, względem grupy wyjściowej. Zaobserwowano wzrost ekspresji *OC* w obu liniach komórkowych. Przewagę ekspresji *osteokalcyny* zaobserwowano w grupach doświadczalnych komórek DPSC i SCAP. Przedstawione wyniki są średnimi z trzech niezależnych doświadczeń \pm SD. * $P < 0,05$.

6.7.2. Ekspresja genu kodującego białko macierzy zębinowej 1.

Przeprowadzone badanie PCR w czasie rzeczywistym potwierdziło ekspresję genu *DMP1* w komórkach DPSC. Na podstawie dalszej analizy zmian poziomu ekspresji genu *DMP1* można było zauważyć wzrost ekspresji w komórkach DPSC z grupy doświadczalnej oraz kontrolnej względem grupy wyjściowej (Ryc.15). W stymulowanych komórkach DPSC poziom ekspresji *DMP1* wzrósł 30,37-krotnie, podczas gdy w grupie kontrolnej nie poddanej indukcji promineralizacyjnej zaobserwowano 24,6-krotny wzrost ekspresji *DMP1*.

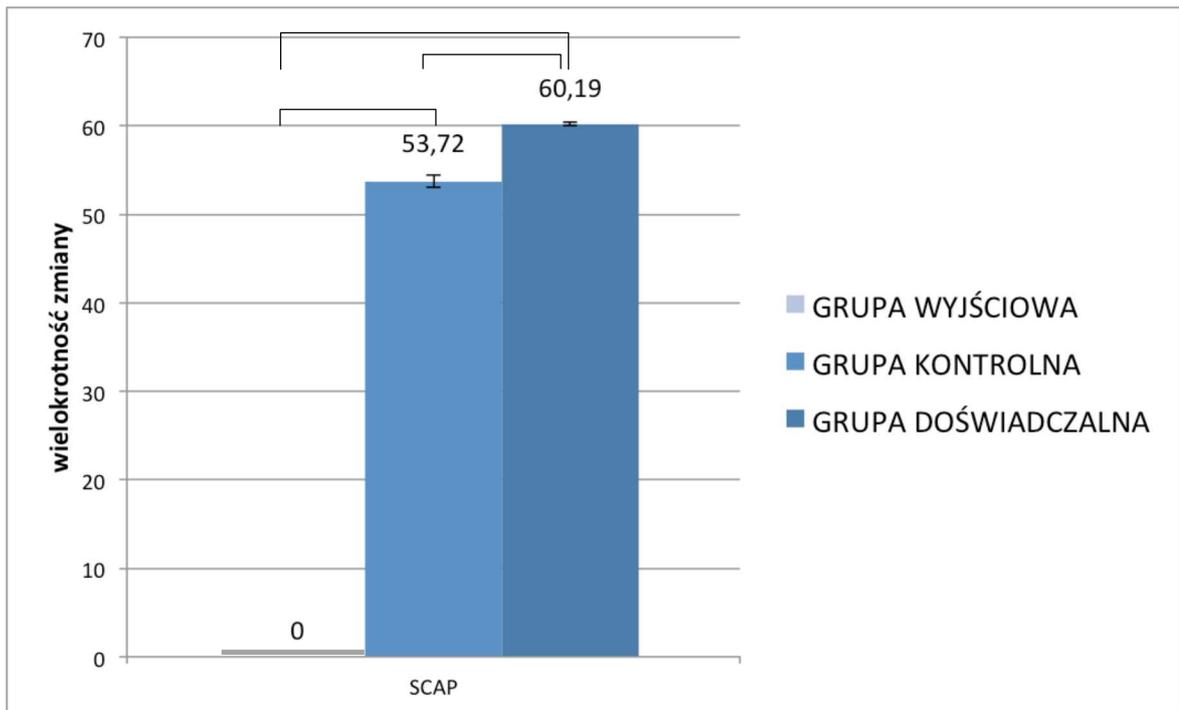
*



Rycina 15. Wielokrotność zmiany ekspresji genu kodującego białko macierzy zębinowej 1 (*DMP1*) w komórkach DPSC. Po sześciu tygodniach hodowli zarówno w grupie doświadczalnej jak i kontrolnej zaobserwowano wzrost ekspresji genu *DMP1*. Większy wzrost nastąpił w grupie doświadczalnej komórek DPSC. Przedstawione wyniki są średnimi z trzech niezależnych doświadczeń \pm SD. * $P < 0,05$.

W grupie wyjściowej komórek SCAP nie stwierdzono ekspresji genu *DMP1*. Po sześciu tygodniach hodowli komórek grupy doświadczalnej oraz kontrolnej zaobserwowano ekspresję *DMP1* w obu badanych grupach, na poziomie odpowiednio 60,19 oraz 53,72 (Ryc.16).

*



Rycina 16. Wielokrotność zmiany ekspresji genu kodującego białko macierzy zębinowej 1 (*DMP1*) w komórkach SCAP. W wyjściowej grupie komórek nie stwierdzono ekspresji tego genu. Po sześciu tygodniach hodowli zaobserwowano ekspresję genu *DMP1*, zarówno w grupie doświadczalnej jak i kontrolnej przy czym wzrost był większy w grupie doświadczalnej (60,19), w porównaniu do grupy kontrolnej (53,72). Przedstawione wyniki są średnimi z trzech niezależnych doświadczeń \pm SD. * $P < 0,05$.

6.7.3. Ekspresja genu kodującego białko sialofosforowe zębiny.

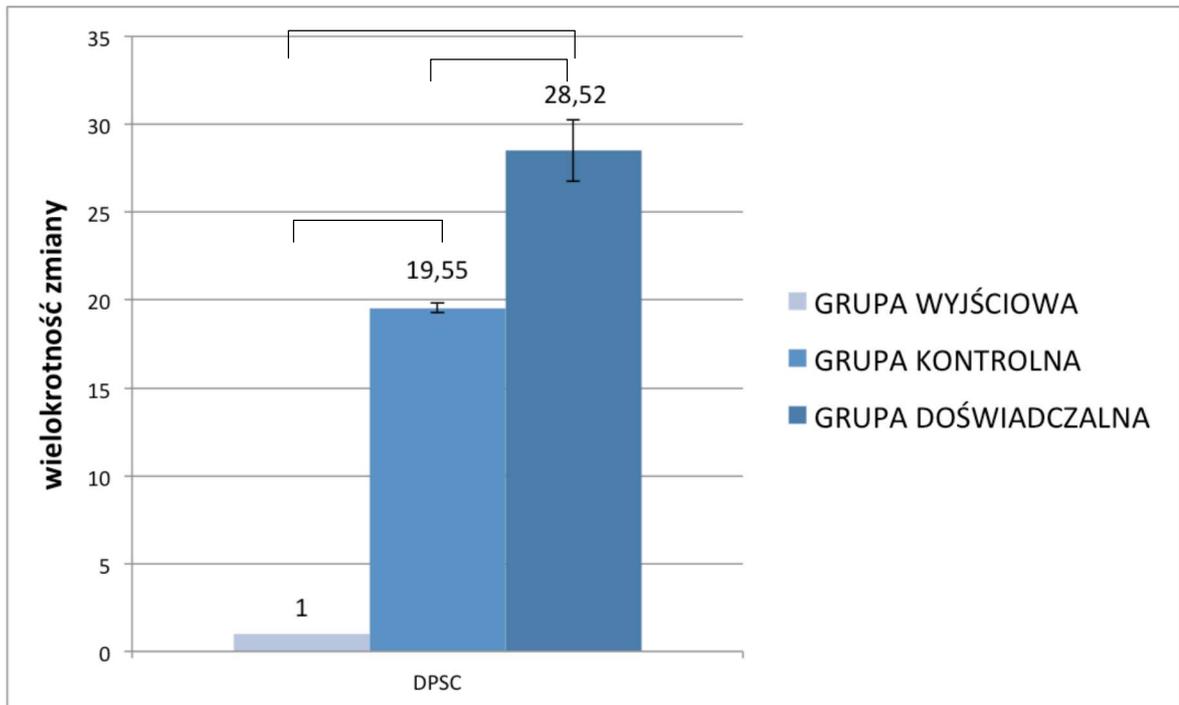
Badanie ekspresji genu kodującego białko sialofosforowe zębiny (*DSPP*) miało na celu ostatecznie wyjaśnić, czy badane komórki uległy zróżnicowaniu w kierunku odontoblastów, ponieważ *DSPP* uznawane jest za jedyny specyficzny marker zębiny.

Analiza PCR w czasie rzeczywistym potwierdziła obecność transkryptu genu *DSPP* w komórkach DPSC. Zaobserwowano, że stymulacja promineralizacyjna środowiska hodowlanego wpłynęła na 28,52-krotne zwiększenie ekspresji genu w grupie doświadczalnej, podczas gdy w grupie kontrolnej wystąpił wzrost o 19,55 w stosunku do wyjściowej grupy komórek (Ryc.17).

*

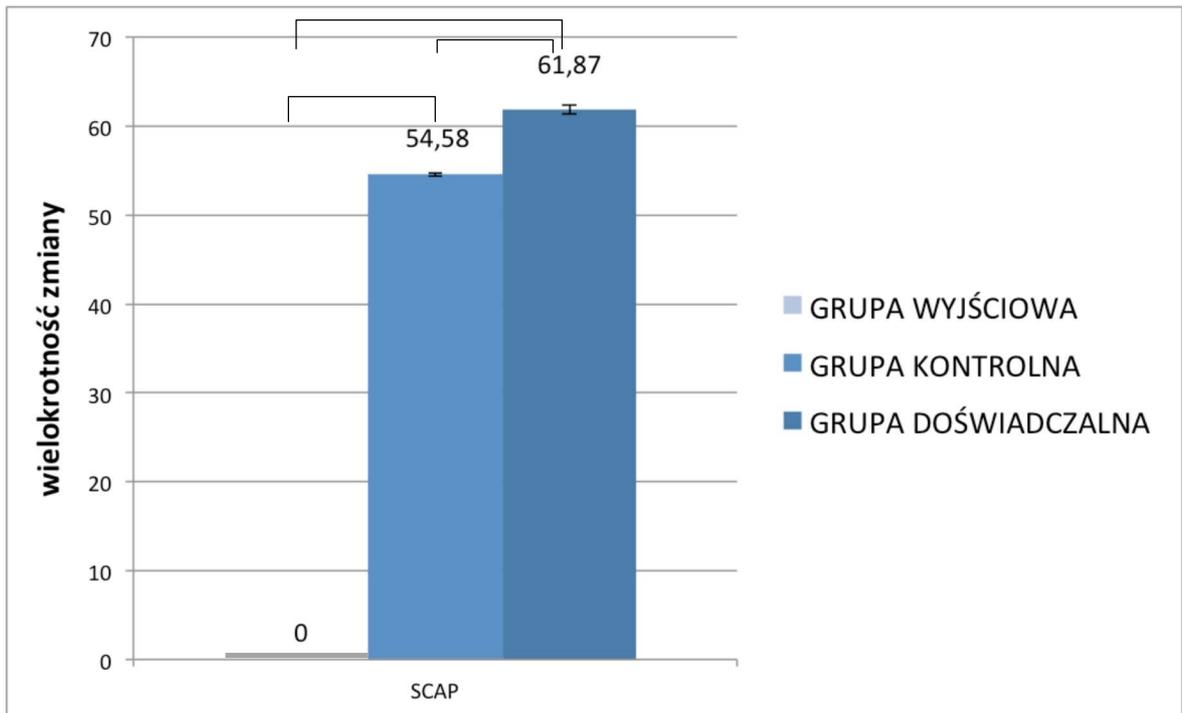
*

Odmiennie wyniki uzyskano w badaniu komórek SCAP. W grupie wyjściowej nie stwierdzono ekspresji genu *DSPP*. Dopiero po okresie sześciu tygodni hodowli komórek zarówno w grupie doświadczalnej jak i kontrolnej zaobserwowano wzrost ilości transkryptu genu *DSPP* do poziomu odpowiednio 61,87 i 54,58. (Ryc.18).



Rycina 17. Wielokrotność zmiany ekspresji genu kodującego sialofosfoproteinę zębiny (*DSPP*) w komórkach DPSC względem grupy wyjściowej. Po sześciu tygodniach hodowli w środowisku odontoindukcyjnym i pożywce standardowej zaobserwowano wzrost ekspresji genu *DSPP*, przy czym większy wzrost nastąpił w grupie doświadczalnej komórek DPSC. Przedstawione wyniki są średnimi z trzech niezależnych doświadczeń \pm SD. * $P < 0,05$.

*



Rycina 18. Wielokrotność zmiany ekspresji genu kodującego sialofosfoproteinę zębiny (*DSPP*) w komórkach SCAP. W wyjściowej grupie komórek nie stwierdzono ekspresji genu *DSPP*. Po sześciu tygodniach hodowli w środowisku stymulującym mineralizację i pożywcze standardowej zaobserwowano ekspresję genu *DSPP*, przy czym na większym poziomie w grupie doświadczalnej (61,87), w porównaniu do grupy kontrolnej (54,58). Przedstawione wyniki są średnimi z trzech niezależnych doświadczeń \pm SD. * $P < 0,05$.

6. DYSKUSJA

Ściśle wyselekcjonowane multipotencjalne komórki progenitorowe o fenotypie STRO-1(+), CD146(+), CD34(-), CD45(-), pochodzące z miazgi i brodawki wierzchołkowej, należą do populacji komórek macierzystych prezentujących wspólne cechy, które definiują ich pierwotny charakter. Należą do nich zdolność do samoodnawiania, tworzenia kolonii oraz możliwość różnicowania w kierunku licznych linii komórkowych [2,48,49]. Do celów obecnego projektu komórki DPSC i SCAP wyekstrahowano z całkowicie zatrzymanych zębów mądrości z nieuformowanymi korzeniami. Przeprowadzona w niniejszej pracy analiza porównawcza komórek DPSC i SCAP udowodniła odmienne właściwości badanych linii komórkowych w poszczególnych doświadczeniach, co prawdopodobnie wynika z wyjściowo różnego stopnia dojrzałości obu badanych grup komórkowych.

Odontoblasty wykształcone w procesie odontogenezy (ang. *primary odontoblasts*) należą do populacji komórek terminalnie zróżnicowanych (post-mitotycznych), a ich czas życia jest ograniczony [24]. Po całkowitym uformowaniu zębiny pierwotnej aktywność odontoblastów pozostaje na niskim poziomie, jednak miazga zęba utrzymuje funkcję obronną i reparacyjną, polegającą na dokomorowym odkładaniu zębiny wtórnej (fizjologicznej i patologicznej). Zatem pierwotne odontoblasty muszą zostać zastąpione przez nowe komórki, zdolne przejąć ich funkcję. Rezerwuarem komórek progenitorowych dla nowo wyróżnicowanych odontoblastów (ang. *replacement odontoblasts*) jest nisza okołonaczyniowa miazgi zębów [25].

Odmianą rolę pełni brodawka wierzchołkowa, w której rezydują komórki progenitorowe, będące źródłem pierwotnych odontoblastów, obecnych jedynie w procesie odontogenezy i odpowiedzialnych za tworzenie pierwotnej zębiny korzeniowej. Wobec powyższego nasuwa się przypuszczenie, że SCAP są niezróżnicowanymi komórkami o

mniej stopniu dojrzałości w porównaniu z DPSC, ponieważ izolowane są z rozwijającej się tkanki i stanowią populację komórek będących prekursorami dla pierwotnych odontoblastów [4,50].

Miazga zębów oraz brodawka wierzchołkowa to struktury heterogenne i jedynie niewielki odsetek populacji posiada cechy komórek macierzystych zdolnych do różnicowania w funkcjonalne odontoblasty. W przeprowadzonym doświadczeniu mezenchymalny charakter komórek progenitorowych pochodzących zarówno z miazgi zęba, jak i brodawki wierzchołkowej potwierdzono obecnością zewnątrzblonowych epitopów STRO-1 oraz CD146, co pozwoliło na wyselekcjonowanie komórek o niskim stopniu zróżnicowania gdyż ekspresja epitopu STRO-1 zanika proporcjonalnie do procesu różnicowania i dojrzewania komórkowego [51,52]. W niniejszej pracy odsetek STRO-1 pozytywnych komórek był znacząco wyższy (18,2%,±1,3) w linii komórkowej SCAP w porównaniu z komórkami DPSC (10,3%,±3,1). Większa ilość niezróżnicowanych, mezenchymalnych komórek macierzystych rezydujących w brodawce wierzchołkowej prawdopodobnie wynika z faktu, że pochodzą one z niezróżnicowanej, silnie proliferującej tkanki, tworzącej rozwijający się korzeń zęba. Tym samym w warunkach fizjologicznych w regionie HERS, z którego pobrano materiał badawczy procesy proliferacji dominują nad różnicowaniem komórkowym, podczas gdy miazga komorowa znajduje się na etapie zakończonej morfo- i histogenezy. Dominację procesów proliferacyjnych nad różnicowaniem komórkowym dowiodło również doświadczenie własne bezpośrednio oceniające ilość proliferujących komórek.

Komórki wyizolowane z brodawki wierzchołkowej wszystkich badanych grup: wyjściowej, kontrolnej i doświadczalnej, dzieliły się szybciej w porównaniu z komórkami odpowiednich badanych grup pochodzącymi z miazgi zęba. Dodatkowo na zdolność proliferacyjną obu linii komórkowych miała wpływ promineralizacyjna stymulacja

środowiska hodowlanego. Komórki obu linii indukowane do różnicowania w kierunku odontoblastów wykazały spadek potencjału proliferacji w porównaniu z grupą kontrolną, podczas gdy największą zdolność proliferacyjną odnotowano w grupach wyjściowych obu badanych linii komórkowych. Dowodzi to, że obserwowany spadek potencjału proliferacji w grupach stymulowanych środowiskiem hodowli jest następstwem przewagi procesu dojrzewania komórek nad procesem proliferacji, a środowisko hodowli istotnie wpływa na różnicowanie komórek, co jest zgodne z obserwacjami innych badaczy [2,4,50,53].

Nieco odmienny charakter diagnostyczny ma obecność na powierzchni błony komórkowej epitopu CD146. Przez wzgląd, że epitop CD146 występuje specyficznie na powierzchni komórek ścian naczyń krwionośnych [25], jego obecność na powierzchni komórek DPSC i SCAP wskazuje na ich okołonaczyniową lokalizację w mezenchymalnych strukturach zęba. Zbliżone wyniki wykazali *Gronthos* i *Shi* [25,44] oceniając lokalizację komórek progenitorowych w miazdze zęba stałego i mlecznego. W obu przypadkach komórki pozyskane w doświadczeniach autorów prezentują epitop CD146. Kolejnym badaczem zajmującym się tym zagadnieniem był *Sonoyama i wsp.* [4]. Autorzy oceniali i porównywali obraz histologiczny brodawki wierzchołkowej z preparatem z miazgi zęba stałego. Szczegółowa analiza wykazała, że brodawka wierzchołkowa zawiera mniej naczyń krwionośnych i elementów komórkowych niż miazga zęba. Wnioski te są zgodne z opisywanym doświadczeniem własnym, w którym stwierdzono obecność większej liczby komórek CD146(+) w miazdze zęba w porównaniu z brodawką wierzchołkową. Obecność epitopów STRO-1 oraz CD146, przy wykluczeniu linii komórek hematopoetycznych i leukocytów CD34(-), CD45(-) wskazuje, że w niszach okołonaczyniowych miazgi zęba, jak i brodawki wierzchołkowej rezydują komórki progenitorowe o mezenchymalnym fenotypie, przy czym brodawka wierzchołkowa stanowi większy rezerwuar komórek macierzystych aniżeli miazga zęba.

Mniejszą dojrzałość komórek izolowanych z brodawki wierzchołkowej potwierdzono również w obecnym doświadczeniu poprzez badanie zdolności formowania kolonii z pojedynczej fibroblastopodobnej komórki. Komórki SCAP wszystkich badanych grup dzieliły się statystycznie istotnie szybciej w porównaniu z komórkami DPSC, czego dowodzą obserwowane w mikroskopie świetlnym bardzo liczne skupiska komórek (wiry), odpowiadające tworzącym się koloniom. Obraz makroskopowy tych samych hodowli komórkowych uwidoczniał niemal całkowitą konfluencję hodowli komórek SCAP z obecnymi drobnymi i licznymi koloniami, natomiast komórki izolowane z miazgi zęba formowały dobrze odgraniczone kolonie, jednak ich ilość była znacząco mniejsza. Te same zależności obserwowano w komórkach obu grup doświadczalnych; Podczas gdy w grupie komórek SCAP hodowanych w pożywce promineralizacyjnej, zaobserwowano nieznacznie mniejszą ilość tworzących się kolonii i stopień konfluencji w porównaniu z grupą kontrolną, w grupie doświadczalnej DPSC zdolność formowania kolonii w stosunku do kontroli była znacząco niższa. Powyższe obserwacje wskazują, że komórki progenitorowe hodowane w środowisku promineralizacyjnym posiadają mniejszy potencjał do samoodnawiania, co pośrednio świadczy o ich większym stopniu zróżnicowania. Jednocześnie zachowanie wysokiego potencjału proliferacji i zdolności tworzenia kolonii przez komórki linii SCAP w porównaniu z DPSC wskazuje na ich niższą dojrzałość komórkową. Obserwacje uzyskane z własnego doświadczenia są zgodne z wynikami *Sonoyamy i wsp.* [4,50], który porównał potencjał proliferacji komórek DPSC i SCAP metodą znakowania jąder bromodeoksyurydyną (BrdU). Autorzy wykazali, że komórki SCAP zdolne są do tworzenia pojedynczych, dobrze widocznych kolonii zarówno w obrazie mikroskopowym jak i makroskopowym wówczas, gdy hodowla komórek z brodawki wierzchołkowej jest prowadzona w wyjściowo niskiej gęstości, co zastosowano również w doświadczeniu własnym. *Sonoyama* sugerował, że szybsze podziały SCAP

mogą wynikać nie tylko z ich wysokiego potencjału proliferacji, ale także z mniejszego wymiaru komórek SCAP w porównaniu z DPSC. Autor uważa, że średnica komórek umożliwia wzrost większej liczby komórek, przed uzyskaniem stanu całkowitej konfluencji prowadzonej hodowli [53].

Jedną z najistotniejszych cech definiujących charakter komórek macierzystych jest zdolność do różnicowania w liczne linie rozwojowe. W celu oceny, czy komórki DPSC i SCAP są zdolne do różnicowania w kierunku odontoblastów, z jednoczesną regeneracją kompleksu miazgowo-zębinowego, badane komórki poddano odpowiedniej stymulacji środowiska hodowlanego. Po trzech tygodniach hodowli komórek w środowisku stymulującym mineralizację, obie linie komórkowe DPSC i SCAP wykazały zdolność do odkładania złogów minerału *in vitro*, co uwidoczniło jako ciemno zabarwione struktury w barwieniu metodą *von Kossa*. Hodowla komórek bez udziału czynników promineralizacyjnych, zarówno grupy wyjściowej jak i kontrolnej, nie wykazała obecności złogów. Zaobserwowane wyniki sugerują, że różnicowanie komórek progenitorowych jest stymulowane przez czynniki środowiskowe i jedynie odpowiednie warunki hodowli, promujące zachowania promineralizacyjne, indukują proces mineralizacji.

Dla potwierdzenia stopnia zróżnicowania komórkowego komórek SCAP i DPSC oraz ich zdolności podjęcia funkcji mineralizacyjnych dla macierzy zewnątrzkomórkowej wykonano analizę koncentracji wapnia wewnątrzkomórkowego. Najwyższy poziom wapnia odnotowano w grupie doświadczalnej komórek izolowanych z brodawki wierzchołkowej, podczas gdy w komórkach DPSC poziom ten był o połowę niższy. Interesującym jest, że koncentracja wapnia wewnątrzkomórkowego wzrosła samoistnie w niestymulowanych grupach kontrolnych obu linii w stosunku do grup wyjściowych, osiągając jednocześnie istotnie niższy poziom względem grup doświadczalnych. Wynik

ten dowodzi, że proces różnicowania komórkowego *in vitro* przebiega w pewnym zakresie niezależnie od środowiska hodowlanego.

Omawiany wynik jest zgodny z obserwacjami innych autorów [63,64,65], którzy dostrzegli różnice w schemacie procesu mineralizacji obu linii komórkowych [53]. Wspomniani autorzy w 3-tygodniowej hodowli komórkowej, prowadzonej w środowisku odontoindukcyjnym, oceniali co 7 dni obecność złogów mineralnych. Przez pierwsze 2 tygodnie komórki DPSC wykazywały znacząco wyższy poziom formowania macierzy zmineralizowanej w stosunku do SCAP, jednak w 3 tygodniu doświadczenia zaobserwowano, że komórki progenitorowe z brodawki wierzchołkowej odkładały znacząco większe ilości tkanki zmineralizowanej. Fakt, że komórki DPSC wykazywały wyższy potencjał promineralizacyjny w porównaniu ze SCAP w ciągu pierwszych dwóch tygodni dowiodło, że komórki DPSC są wyjściowo bardziej zróżnicowane aniżeli komórki SCAP. Zwiększenie potencjału promineralizacyjnego komórek SCAP w trzecim tygodniu doświadczenia wynika z faktu, że komórki te w ostatecznym stopniu zróżnicowały się w funkcjonalne odontoblasty. Wyższy potencjał promineralizacyjny SCAP w stosunku do DPSC w tej fazie doświadczenia wskazuje na większe możliwości odkładania zębiny przez komórki brodawki wierzchołkowej. Opóźnienie wytwarzania złogów mineralnych przez SCAP w porównaniu z DPSC wynikło według autorów z konieczności dłuższego różnicowania komórek SCAP do funkcjonalnych odontoblastów, co pośrednio dowodzi niższego stopnia dojrzałości komórkowej SCAP w stosunku do DPSC [53].

W obecnym doświadczeniu aktywność promineralizacyjna komórek macierzystych izolowanych z miazgi zęba stałego i brodawki wierzchołkowej została dodatkowo potwierdzona w badaniu aktywności fosfatazy alkalicznej (ALP). Fosfataza alkaliczna uznawana jest za wczesny marker różnicowania komórkowego, bezpośrednio zaangażowany w proces mineralizacji. W hodowli komórek *in vitro*, w pożywce

indukującej różnicowanie w kierunku funkcjonalnych odontoblastów, dodanie β -glicerofosforanu miało na celu uzyskanie źródła organicznych fosforanów, które indukują i tworzą zmineralizowaną macierz zewnątrzkomórkową. Rola ALP polega na hydrolizowaniu β -glicerofosforanu w wyniku czego uwalniane są jony fosforanowe, zaangażowane następnie w proces tworzenia złogów mineralnych zbudowanych z fosforanów wapnia. Aktywność ALP jest znaczącym markerem stopnia funkcjonalności odontoblastów, dlatego inni badacze również stosują ten marker dla oceny zróżnicowania komórkowego [59,63,65,66]. W badaniach *Yu i wsp.* [65] oceniono, że aktywność fosfatazy alkalicznej w komórkach DPSC rośnie od pierwszego do dziewiątego pasażu, co sugeruje, że komórki DPSC od początku hodowli *in vitro* różnicują się w odontoblasty. Z kolei *Park i wsp.* [63] w analogiczny sposób ocenił aktywność ALP w komórkach SCAP i wykazał tendencję wzrostową ALP do siódmego dnia hodowli, po czym obserwował jej gwałtowny spadek. Inni autorzy [59,66] badali aktywność ALP w komórkach DPSC metodą kolorymetryczną i wykazali rosnącą aktywność enzymu jedynie do czternastego dnia hodowli. Wzrost aktywności ALP w początkowej fazie różnicowania, z następującym później spadkiem poziomu aktywności enzymu potwierdza rolę ALP jako markera wczesnego stadium różnicowania osteogenicznego [67].

W obecnym doświadczeniu badanie aktywności fosfatazy alkalicznej w wyjściowych grupach komórek z obu linii komórkowych wykazało niższy poziom aktywności enzymu w linii komórek SCAP w porównaniu z DPSC, co pozwala wnioskować o wyjściowo niższym poziomie zróżnicowania SCAP w stosunku do DPSC i potwierdza ten sam wniosek uzyskany w innych doświadczeniach. Jednocześnie komórki SCAP grupy doświadczalnej osiągnęły ponad 10-krotnie wyższy poziom aktywności enzymu w porównaniu do SCAP z grupy wyjściowej, podczas gdy w komórkach DPSC z grupy doświadczalnej poziom aktywności ALP wzrósł jedynie dwukrotnie w stosunku do

grupy wyjściowej komórek DPSC. Ostateczny poziom aktywności ALP w grupie doświadczalnej komórek SCAP był 3-krotnie wyższy aniżeli poziom odnotowany w komórkach DPSC. Tak duża dysproporcja pomiędzy obiema liniami komórkowymi sugeruje, że komórki SCAP prezentują wyższy potencjał proodontoblastyczny, co świadczy o większych możliwościach funkcjonalnych komórek SCAP. Interesującym pozostaje fakt, że w grupie kontrolnej komórek pochodzących z brodawki wierzchołkowej poziom aktywności ALP wzrósł 2-krotnie w stosunku do grupy wyjściowej, natomiast w przypadku komórek DPSC był on porównywalny z grupą wyjściową. Nasuwa to przypuszczenie, że odpowiednio długi czas hodowli SCAP w pożywce standardowej również wpłynął na stopień różnicowania komórkowego grupy SCAP, podczas gdy niestymulowane komórki DPSC zachowały swój wyjściowy fenotyp.

Celem jednoznacznego potwierdzenia obserwacji dotyczących różnic w stopniu różnicowania i dojrzewania komórek SCAP *versus* DPSC, w obydwu liniach komórkowych przeprowadzono badanie ekspresji genów, uznanych za markery różnicowania komórkowego odontoblastów. Analizowano poziom ekspresji *osteokalcyny*, *DMP1* oraz *DSPP*. Osteokalcyna oraz białko macierzy zębinowej 1 (DMP1) uznane są za markery różnicowania komórek w kierunku osteoblastów/odontoblastów, gdyż białka te są bezpośrednio zaangażowane w proces mineralizacji. W pracy badano również poziom ekspresji *sialofosfoproteiny zębiny*, ponieważ DSPP to niekolagenowe białko syntetyzowane przez dojrzałe odontoblasty i uczestniczy w procesie nukleacji oraz mineralizacji kryształów hydroksyapatytów w zębinie. DSPP uznawane jest za jedyne specyficzne białko zębiny, ponieważ jego ekspresja w zębinie jest setki razy wyższa (około 400×), aniżeli w innych tkankach organizmu [28].

Analiza PCR w czasie rzeczywistym potwierdziła ekspresję genu *osteokalcyny* w komórkach z miazgi zęba i brodawki wierzchołkowej, co wskazuje na osteogeniczną

aktywność komórek z obu linii komórkowych, bowiem *OC* uznawana jest za marker ulegający ekspresji na etapie różnicowania komórek w kierunku osteoblastów/odontoblastów, definiując tym samym stopień dojrzałości komórkowej.

Należy zwrócić uwagę, że poziom ekspresji *osteokalcyny* w komórkach DPSC grupy doświadczalnej i kontrolnej był na porównywalnym poziomie, w przeciwieństwie do grupy doświadczalnej komórek SCAP, gdzie obserwowano wyższy poziom ekspresji *OC* w porównaniu do kontroli. Powyższe wyniki wskazują na osiągnięcie przez obie linie komórkowe aktywności mineralizacyjnej. Dodatkowo porównywalny poziom ekspresji ocenianego genu w obu badanych grupach komórek DPSC świadczy o wyjściowo wyższym stopniu zróżnicowania tych komórek w porównaniu do SCAP. Rozważając rolę *OC* w procesie mineralizacji należy domniemywać, że stymulowane w doświadczeniu komórki obu linii komórkowych różnicowały się w kierunku komórek biorących czynny udział w mineralizacji [68]. Jednocześnie uwzględniając źródło pozyskiwania DPSC oraz SCAP różnicowanie to przebiegało prawdopodobnie w kierunku odontoblastów.

Aby ostatecznie wyjaśnić kwestię fenotypu badanych komórek z grup kontrolnych w ocenie uwzględniono poziom ekspresji genów *DMP1* oraz *DSPP*. Analiza PCR w czasie rzeczywistym potwierdziła obecność transkryptów obu genów w grupie wyjściowej populacji komórek DPSC, przy braku ekspresji obu genów w grupie wyjściowej populacji SCAP. Po sześciu tygodniach hodowli obu linii komórkowych w środowisku stymulującym mineralizację oraz w pożywce standardowej, poziom ekspresji *DMP1* i *DSPP* wzrósł w komórkach DPSC, przy czym w grupie kontrolnej odnotowany wzrost był niższy w porównaniu z grupą doświadczalną. Jednocześnie po tym samym 6-tygodniowym okresie inkubacji ekspresja *DMP1* oraz *DSPP* pojawiła się w populacji komórek SCAP zarówno w grupie kontrolnej jak i doświadczalnej. Równocześnie zaobserwowano, że stymulacja promineralizacyjna środowiska hodowlanego spowodowała znacząco wyższą

ekspresję obu genów w grupie doświadczalnej komórek SCAP i DPSC w porównaniu z grupami kontrolnymi. Różnica ta była bardziej wyraźna w grupie komórek SCAP w porównaniu do DPSC.

Przedstawione wyniki jednoznacznie potwierdzają, że komórki izolowane z miazgi zęba oraz brodawki wierzchołkowej ulegają zróżnicowaniu w kierunku funkcjonalnych odontoblastów, wykazując ekspresję późnych markerów różnicowania komórkowego OC, DMP1 oraz DSPP. Interesującym pozostaje zaobserwowana ekspresja tych genów w komórkach grupy kontrolnej hodowanych w pożywce standardowej, co potwierdza, że różnicowanie komórek jest nie tylko stymulowane składnikami promującymi zachowania mineralizacyjne, ale przebiega niezależnie od warunków hodowli z tym, że czas potrzebny na ostateczne różnicowanie komórek jest odpowiednio wydłużony. Tym samym nasuwa się wniosek, że komórki grup kontrolnych DPSC i SCAP są rezerwuarem komórek promotorowych dla odontoblastów i w trybie fizjologicznym ulegają zróżnicowaniu w funkcjonalne odontoblasty.

Obserwacje pochodzące z opisywanego doświadczenia są zgodne z poczynionymi przez innych badaczy prowadzącym doświadczenie *in vivo* [2,3,48,49,57]. Celem oceny proodontoblastycznego potencjału komórek DPSC i SCAP autorzy przeszczepili obie linie komórkowe na nośniku HA/TCP (hydroksyapatyt/fosforan trójwapniowy) myszom poddanym immunosupresji. Po ośmiu tygodniach obserwacji, komórki obu linii zróżnicowały się w funkcjonalne odontoblasty i uformowały kompleks miazgowo-zębinowy, wykazujący obecność markerów tkanki kostnej BSP i OC oraz DSPP. Dodatkowo, zaobserwowano wyższy potencjał funkcjonalny komórek izolowanych z brodawki wierzchołkowej w porównaniu z komórkami z miazgi zęba [50].

Spektrum doświadczeń przeprowadzonych w niniejszej pracy wydaje się wskazywać, że komórki izolowane z brodawki wierzchołkowej prezentują wyższy

potencjał proodontoblastyczny w porównaniu do komórek pochodzących z miazgi zęba, co może wynikać z wyjściowo niższego stopnia zróżnicowania komórek SCAP w hierarchii zębopochodnych komórek multipotencjalnych. Nie bez znaczenia pozostaje również fakt, iż SCAP w warunkach fizjologicznych odpowiedzialne są za tworzenie zębiny pierwotnej, podczas gdy DPSC różnicują się w komórki „zastępcze” dla pierwotnych odontoblastów.

Inżynieria tkankowa, będąca efektem wzajemnego uzupełniania się nauk biologicznych i materiałoznawstwa, stanowi kolejny po transplantacji milowy krok w medycynie. Hodowla *in vitro* pozyskanych komórek multipotencjalnych na odpowiednio spreparowanym, biokompatybilnym podłożu oraz przy właściwej stymulacji czynników środowiskowych w swoim założeniu umożliwia tworzenie żywych tkanek, a nawet narządów *ex vivo*. Stomatologiczna inżynieria tkankowa rozwija się w dwóch zasadniczych kierunkach. Pierwszy z nich koncentruje się na naprawie istniejących ubytków tkanek zęba, przy wykorzystaniu zębopochodnych komórek progenitorowych. Drugi kierunek badań dotyczy regeneracji całych utraconych zębów z wykorzystaniem technik inżynierii tkankowej i komórek macierzystych [69]. Pierwsza koncepcja zakłada hodowlę komórek macierzystych *in vitro* z zastosowaniem nośników polimerowych w celu implantacji *in vivo* w pełni rozwiniętego zęba [70]. Kolejna przewiduje implantację *in vivo* odpowiednio przygotowanego materiału biologicznego zawierającego komórki macierzyste, z których rozwiną się poszczególne tkanki zęba. Wprowadzenie wymienionych metod leczenia wymaga pokonania wielu trudności dotyczących regulacji odpowiedzi organizmu na nieautogenne wszczepy zębopochodne, kontroli procesu regeneracji tkanek, czy też pozyskiwania i przechowywania komórek progenitorowych.

Już dziś wiadomo, że można odtwarzać korony zęba metodą inżynierii tkankowej z wykorzystaniem komórek macierzystych, jeżeli zostaną spełnione dwa zasadnicze kryteria. Pierwsze z nich to odpowiednie środowisko hodowli, np. hodowla *in vitro* lub przeszczep

podskórny. Drugi warunek to stworzenie nośnika zapewniającego trójwymiarową organizację komórek, co umożliwi właściwe ich różnicowanie i zmniejszy ryzyko odrzutu wszczepu [62,70].

Obiecująco przedstawiają się także efekty prób regeneracji korzeni zębów z wykorzystaniem modelu zwierzęcego. Wprowadzenie do zębodołu komórek z miazgi zęba i więzadeł ozębnej naniesionych na bloczki hydroksyapatytu i fosforanu trójwapniowego zaowocowało odtworzeniem korzenia wraz z więzadłami ozębnej [50]. Przeprowadzone pomiary i ocena właściwości mechanicznych wykazała mniejszą odporność korzenia uformowanego w sterowanej regeneracji tkanek na siły zgniatające, w porównaniu z naturalnym korzeniem, jednak był on wystarczająco wytrzymały, aby osadzić na nim funkcjonalną koronę protetyczną [50].

Szybki rozwój inżynierii genetycznej oraz biotechnologii pozwala mieć nadzieję, że efekty prac nad komórkami progenitorowymi pochodzenia zębowego pozwolą na wprowadzenie biomateriałów do standardów klinicznej praktyki stomatologicznej.

7. WNIOSKI.

1. W niszach okołonaczyniowych miazgi zęba i brodawki wierzchołkowej, pozyskiwanych z całkowicie zatrzymanych trzecich zębów trzonowych z nieuformowanymi korzeniami rezydują komórki macierzyste, o mezenchymalnym fenotypie, przy czym brodawka wierzchołkowa stanowi większy rezerwuar komórek progenitorowych dla odontoblastów w porównaniu z miazgą zęba.
2. Analiza hodowli komórek macierzystych *in vitro* wykazała większy potencjał proliferacyjny oraz zdolność tworzenia kolonii przez komórki pochodzące z brodawki wierzchołkowej w porównaniu z komórkami izolowanymi z miazgi zęba stałego, co wskazuje na niższy stopień zróżnicowania histologicznego komórek SCAP.
3. Komórki progenitorowe pochodzące z miazgi zęba i brodawki wierzchołkowej zdolne są do różnicowania w kierunku funkcjonalnych odontoblastów *in vitro*, a hodowla komórek w środowisku promineralizacyjnym *in vitro* wpływa stymulująco na stopień zróżnicowania i dojrzałości komórkowej.
4. Komórki macierzyste pochodzące z brodawki wierzchołkowej prezentują wyższy potencjał proodontoblastyczny i funkcjonalny w porównaniu z komórkami izolowanymi z miazgi zęba.

8. LITERATURA.

1. Nanci A: (2007) Ten Cate's Oral Histology, 7th Edition. Development, Structure and Function. Mosby.
2. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S: (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vivo and in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences USA: 97: 13625-13630.
3. Kacprzyńska E, Maciejewska I: (2011). Komórki macierzyste pochodzenia zębowego. Możliwości zastosowania we współczesnej stomatologii i potencjalne kierunki rozwoju – przegląd piśmiennictwa. Postępy Biologii Komórki tom 38, 3: 467-473.
4. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, Huang GT: (2008). Characterization of apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth - a pilot study. Journal of Endodontics 34: 166-171.
5. Thesleff I, Sharpe PT: (1997). Signaling networks regulating dental development. Mechanism of Development, 67, 111-123.
6. Thesleff I, Vaahtokari, Vainio S, Jowett A: (1996) Molecular mechanism of cell and tissue interactions during early tooth development. The Anatomical Record 245: 151-161.
7. Thesleff I, Nieminenm P: (1996) Tooth morphogenesis and cell differentiation. Current Opinion in Cell Biology 8: 844-850.
8. Thesleff I: (2006). The genetic basis of tooth development and dental defects. American Journal of Medical Genetics, Part A, 140A: 2530-2535.
9. Thesleff I, Tummers M: (2009). Tooth organogenesis and regeneration. (January 31, 2009), StemBook, ed. The Stem Cell Research Community, StemBook, doi/10.3824/stembook.1.37.1, <http://www.stembook.org>.
10. Tucker AS, Sharpe PT: (1999). Molecular genetics of tooth morphogenesis and patterning: the right shape in the right place. Journal of Dental Research, 78: 826-834.
11. Maas R, Bei M: (1997). The genetic control of early tooth development. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine 8: 4-39.

12. Bei M, Maas R: (1998). FGFs and BMP4 induce both Msx1-independent and Msx1-dependent signaling pathways in early tooth development. *Development* 125:4325–4333.
13. Peters H, Neubuser A, Kratochwil K, Balling R: (1998). Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes and Development* 12: 2735–2747.
14. Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I: (1993). Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell* 75: 45–58.
15. Bei M, Kratochwil K, Maas R: (2000). BMP4 rescues a non-cell-autonomous function of Msx1 in tooth development. *Development* 127: 4711-4718.
16. Aberg T, Wang X, Kim J, Yamashiro T, Bei M, Rice R, Ryoo H, Thesleff I: (2004). Runx2 mediates FGF signaling from epithelium to mesenchyme during tooth morphogenesis. *Developmental Biology* 270: 76–93.
17. Thesleff I, Keranen S, Jernvall J: (2001). Enamel knots as signaling centers linking tooth morphogenesis and odontoblasts differentiation. *Advances in Dental Research* 14: 14-18.
18. Maciejewska I: (2009). Wpływ zmian ekspresji genu *TWIST1* i czynnika transkrypcyjnego E2A na różnicowanie i rozwój komórek macierzystych z ludzkich zębów mlecznych i stałych oraz zawiązków zębów u myszy. *Annales Academiae Medicae Gedanensis* tom 29, supplement 4.
19. Jernvall, J, and Thesleff, I: (2000). Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mechanism of Development* 92, 19–29.
20. Thomas HF: (1995). Root formation. *International Journal of Developmental Biology* 39, 231-237.
21. Sasaki T, Garant PR: (1996). Structure and organization of odontoblasts. *The Anatomical Record* 245: 235-249.
22. Ruch JV, Begue-Kirn C: (1995). Odontoblast differentiation. *International Journal of Developmental Biology* 39: 51-68.
23. Kikuchi H, Amano H, Yamada S: (2001). Putative role of basement membrane for dentinogenesis in the mesenchyme of murine dental papillae in vitro. *Cell Tissue Research* 303: 93-107.
24. Linde A, Goldberg M: (1993). Dentinogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 4: 679-728.

25. Shi S, Gronthos S: (2003). Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *Journal of Bone and Mineral Research* 18, 4: 696-704.
26. MacDougall M, Dong J, Acevedo AC: (2006). Molecular basis of human dentin diseases. *American Journal of Medical Genetics*, 140: 2536-2546.
27. Yamakoshi Y: (2008). Dentin Sialophosphoprotein (DSPP) and dentin. *Journal of Oral Biosciences* 50: 33-44.
28. Qin C, Brunn JC, Cadena E, Ridall A, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Nagai N, Butler WT: (2002) The Expression Of Dentin Sialophosphoprotein Gene In Bone. *Journal of Dental Research* 81, 6: 392-394.
29. Tsuchiya S, Simmer JP, Hu JC, Richardson AS, Yamakoshi F, Yamakoshi S: (2011) Astacin proteases cleave dentin sialophosphoprotein (DSPP) to generate dentin phosphoprotein (DPP). *Journal of Bone and Mineral Research*. 26, 220-228.
30. Yamakoshi Y: (2009) Dentinogenesis and Dentin Sialophosphoprotein (DSPP). *Journal of Oral Biosciences*. 51: 134.
31. Yamakoshi Y, Hu JC, Fukae M, Zh H, Simmer JP: (2005) Dentin glycoprotein: the protein in the middle of the dentin sialophosphoprotein chimera. *Journal of Biological Chemistry* 280: 17472-17479.
32. Prasad M, Butler WT, Qin C: (2010). Dentin sialophosphoprotein (DSPP) in biomineralization. *Connective Tissue Research* 51: 404-417.
33. Barron MJ, McDonell ST, MacKie I, Dixon MJ: (2008). Hereditary dentine disorders: dentinogenesis imperfecta and dentine dysplasia. *Orphanet Journal of Rare Disease* 3:31.
34. Suzuki S, Sreenath T, Haruyama N, Honeycutt C, Terse A, Cho A, Kohler T, Muller R, Goldeberg M, Kulkarni AB: (2009). Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biology* 28: 221-229.
35. Maciejewska I, Chomik E: (2012). Hereditary dentine diseases resulting from mutations in DSPP gene. *Journal of Dentistry* 40:542-548.
36. Dong J, Gu TT, Jeffords L, MacDougall M: (2005). Dentin phosphoprotein compound mutation in dentin sialophosphoprotein causes dentinogenesis imperfecta type III. *American Journal of Medical Genetics* 132A: 305-309.
37. Rajpar MH, Koch MJ, Davies RM, Mellody KT, Kielty CM, Dixon MJ: (2002) Mutation of the signal peptide region of the bicistronic gene DSPP affects

- translocation to the endoplasmic reticulum and results in defective dentine biomineralization. *Human Molecular Genetics* 11: 2559-2565.
38. MacDougall M, Simmons D, Luan X, Nydegger J, Feng J, Gu TT: (1997). Dentin phosphoprotein and dentin sialoproteina are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 835-842.
 39. Huang B, Sun Y, Maciejewska I, Qin D, Peng T, McIntyre B, Wygant J, Butler WT, Qin C: (2008). Distribution of SIBLING proteins in the organic and inorganic phases of rat dentin and bone. *European Journal of Oral Sciences* 116: 104-112.
 40. Linde A: (1989). Dentin matrix proteins: composition and possible functions in calcification. *Anatomical Record* 224:154-156.
 41. Butler WT: (1998). Dentin matrix proteins. *European Journal of Oral Scinces* 106: 204-210.
 42. Hao J, Zou B, Narayanan K, George A: (2004). Differential expression patterns of the dentin matrix proteins during mineralized tissue formation. *Bone* 34: 921-932.
 43. He G, Dahl T, Veis A, George A: (2003). Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1. *Nature Materials* 2: 552-528.
 44. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S: (2003). SHED. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 100: 5807-5812.
 45. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J: (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364: 149-155.
 46. Huang GTJ, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S: (2008). The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *Journal of Endodontics* 34: 645-651.
 47. Morsczeck C, Gotz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kuhn U, Mohl C: (2005). Isolation and precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biology* 24: 155-165.
 48. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, Denbesten P, Robey G, Shi S: (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of Dental Research* 81: 531-535.

49. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, Robey G: (2003). Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *Journal of Dental Research* 82: 976-981.
50. Sonoyama W, Liu Y, Fanf D: (2006). Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in Swine. *PLoS ONE* 1(1): e79. doi:10.1371/journal.pone.0000079.
51. Gronthos S, Zannettino AC, Graves SE, Ohta S, Hay SJ, Simmons PJ: (1999). Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. *Journal of Bone and Mineral Research* 14: 47 – 56.
52. Steart K, Walsh S, Screen J, Jefferiss CM, Chainey J, Jordan GR, Beresford JN: (1999). Further characterization of cells expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells. *Journal of Bone and Mineral Research* 14: 1345-1356.
53. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, Geurtsen W: (2011). Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Archives of Oral Biology* 56: 709-721.
54. D'Aguino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, Papaccio G: (2007). Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone and tissue formation. *Cell Death and Differentiation* 14, 6: 1162-1171.
55. Kuo MYP, Lan WH, Lin SK: (1992). Collagen gene expression in human dental pulp cell cultures. *Archives of Oral Biology* 37, 11: 945-952.
56. Mangano C, De Rosa A, Desiderio V, D'Aguino R, Piattelli A, De Francesco F, Tirino V, Mangano F, Pappacio G: (2010). The osteoblastic differentiation of dental pulp stem cells and bone formation on different titanium surface textures. *Biomaterials* 31: 3543-3551.
57. Abey S, Yamaguchi S, Amagasa T: (2007). Multilineage cells from apical pulp of human tooth with immature apex. *Oral Science International* 4: 45-58.
58. Huang GTJ, Gronthos S, Shi S: (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of Dental Research* 88: 792-806.

59. Karaoz E, Dogan B, Aksoy A, Gacar A, Akyuz S, Ayhan S, Genc Z, Yuruker S, Duruksu G, Demircan P, Sariboyaci A: (2010). Isolation and *in vitro* characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochemistry and Cell Biology* 133: 95-112.
60. Kadar K, Kiraly M, Porcsalmy B, Molnar B, Racz GZ, Blazsek J, Kallo K, Szabo EL, Gera I, Gerber G, Varga G: (2009). *Journal of Physiology and Pharmacology* 60: 167-175.
61. Wang S, Mu J, Fan Z, Yu Y, Yan M, Lei G, Tang C, Wang Z, Zheng Y, Yu J, Zhang G: (2012). Insulin-like growth factor 1 can promote the osteogenic differentiation and osteogenesis of stem cells from apical papilla. *Stem Cell Research* 8: 346-356.
62. Petrovic V, Stefanovic V: (2009). Dental tissue – new source for stem cells. *The Scientific World Journal* 9: 1167-1177.
63. Park B, Hah Y, Choi M, Ryu Y, Lee S, Kim D, Kim J, Byun J: (2009). *In vitro* osteogenic differentiation of culture human dental papilla-derived cells. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery* 67: 507-514.
64. About I, Bottero M, Denato P, Camps J, Franquin J, Mitsiadis T: (2000). Human Dentin Production *in vitro*. *Experimental Cell Research* 258: 33-41.
65. Yu J, He H, Tang C, Zhang G, Li Y, Wang R, Shi J, Jin Y: (2010). Differentiation potential of STRO-1(+) dental pulp stem cells changes during cell passaging. *BMC Cell Biology* 11: 32.
66. Koyama N, Okubo Y, Nakao K, Bessho K: (2009). Evaluation of pluripotency in human dental pulp stem cells. *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 67: 501-506.
67. Walsh S, Jefferiss C, Stewart K, Jordan GR, Screen J, Beresford JN: (2000). Expression of the developmental markers STRO-1 and alkaline phosphatase in cultures of human marrow stromal cells: regulation by fibroblast growth factor (FGF)-2 and relationship to the expression of FGF receptors 1-4. *Bone* 27: 185-195.
68. Choo MK, Yeo H, Zayzafoon M: (2009). NFATc1 mediates HDAC – dependent transcriptional repression of osteocalcin expression during osteoblast differentiation. *Bone* 45: 579-589

69. Koussoulakou D, Margaritas L, Koussoulakos S: (2009). A curriculum vitae of teeth: evolution, generation, regeneration. *International Journal of Biological Sciences* 5: 226-243.
70. Yen A, Sharpe P: (2008). Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell and Tissue Research* 331: 359-372.