

Received: 2015.06.30  
Accepted: 2016.04.01  
Published: 2016.08.17

## Dziąsło jako nowe źródło komórek macierzystych w obrębie jamy ustnej o dużej dostępności i o potencjalnym znaczeniu w leczeniu regeneracyjnym

Gingiva as a new and the most accessible source of mesenchymal stem cells from the oral cavity to be used in regenerative therapies

Bartłomiej Górski

Zakład Chorób Błony Śluzowej i Przyzębia, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

### Streszczenie

Od odkrycia komórek macierzystych szpiku kostnego (BMMSCs) wielu badaczy skoncentrowało się na poszukiwaniu innych, łatwiej dostępnych źródeł mezenchymalnych komórek macierzystych (MSCs). Odnaleziono i wyizolowano komórki zdolne do samoodnawiania swojej puli, potencjale różnicowania w kierunku różnych linii komórkowych i zdolnościach immunomodulacyjnych z zębów, więzadła ozębnowego i dziąsła. MSCs z jamy ustnej obejmują m.in. komórki macierzyste miazgi zębów (DPSCs), z ludzkich zębów mlecznych (SCHED), komórki macierzyste więzadła ozębnowego (PDLSCs), wierzchołkowej części brodawki zębowej (SCAP), komórki macierzyste woreczka zębowego (DFCs) i dziąsła (GMSCs). Obecnie jesteśmy świadkami olbrzymiej i stale rosnącej liczby badań naukowych prowadzonych na komórkach macierzystych z jamy ustnej. Doświadczenia *in vitro*, na modelach zwierzęcych *in vivo* oraz badania przedkliniczne wykazały, że MSCs z jamy ustnej mogą znaleźć zastosowanie w stomatologii i medycynie regeneracyjnej. Jest wiele dowodów naukowych, które potwierdzają zdolności tych komórek do regeneracji rogówki, miazgi zębów, ubytków przyzębnych, defektów tkanki kostnej, chrząstki, ścięgien, nerwów, mięśni i komórek śródbłonna, jak również poprawy stanu klinicznego w przypadku schorzeń o tle immunologicznym i immunologiczno-zapalnym. W artykule omówiono najnowsze doniesienia naukowe dotyczące biologii i potencjału MSCs z jamy ustnej oraz możliwości ich zastosowania w terapii komórkowej, inżynierii tkankowej i medycynie regeneracyjnej. Szczegółowo omówiono GMSCs, które są źródłem o największej dostępności i najmniej obciążającej procedurze pobrania, a do tej pory nie zostały dobrze scharakteryzowane.

Słowa kluczowe:

mezenchymalne komórki macierzyste • komórki macierzyste dziąsła • terapia komórkowa • regeneracja tkankowa

### Summary

Since the discovery of bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs), many researchers have focused their attention on new sources of mesenchymal stem cells (MSCs). Consequently, MSCs that display self-renewal capacity, multidifferentiation potential and immunomodulatory properties have been isolated from human oral tissues, including tooth, periodontal ligament,

and gingiva. Oral MSCs involve dental pulp stem cells (DPSCs), stem cells from exfoliated deciduous teeth (SHED), periodontal ligament stem cells (PDLSCs), dental follicle stem cells (DFCs), stem cells from apical papilla (SCAP) and gingival stem cells (GMSCs). Current research on oral stem cells is expanding at an unprecedented rate. That being the case, a plethora of in vitro differentiation assays, immunodeficient animal transplantations and preclinical trials have demonstrated that these cells exhibit strong potential for both regenerative dentistry and medicine. Oral MSCs have proved their capability to repair cornea, dental pulp, periodontal, bone, cartilage, tendon, neural, muscle and endothelial tissues without neoplasm formation as well as to treat inflammatory diseases and immune disorders. This article describes the current understanding of oral MSCs and their prospective applications in cell-based therapy, tissue engineering and regenerative medicine. Special attention is placed on GMSCs as they are easily accessible and may be obtained in a convenient and minimally invasive way.

**Keywords:** mesenchymal stem cells • gingival mesenchymal stem cells • cell-based therapy • tissue regeneration

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?CID=1214383>

**Word count:** 3625  
**Tables:** 3  
**Figures:** –  
**References:** 114

**Adres autora:** dr n.med. Bartłomiej Górski, Zakład Chorób Błony Śluzowej i Przyzębia, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Miodowa 18, 00-246 Warszawa; e-mail: bartek\_g3@tlen.pl

**Wykaz skrótów:** **ALP** – fosfataza zasadowa; **ABMSCs** – komórki macierzyste kości wyrostka zębodołowego; **AMBN** – ameloblastyna; **BMP** – białko morfogenetyczne kości; **BMSCs/BMMSCs** – komórki macierzyste szpiku; **CD** cząsteczki – CD antygeny; **CFU-Fs** – komórki fibroblastyczne zdolne do tworzenia hodowli; **CHS** – alergja kontaktowa; **CIA** – indukowane zapalenie stawów; **DFCs** – komórki macierzyste woreczka zębowego; **DMP** – białko matrycy zębiny; **DPSCs** – komórki macierzyste miążgi zęba; **EDTA** – kwas etylenodiaminotetraoctowy; **EMD** – pochodne matrycy szklawiny; **FGF** – czynnik wzrostu fibroblastów; **G-CSF** – czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów; **GFAP** – kwaśne białko włóknikowe; **GMSCs** – komórki macierzyste działo, **HGF** – czynnik wzrostu hepatocytów; **HIF** – czynnik indukowany hipoksją; **IDO** – 2,3-dioxygenaza indoleaminy; **IL** – interleukina; **IFN-γ** – interferon γ; **MCP** – białko chemotaktyczne monocytów; **LV** – lentiwirus; **MMP** – metaloproteinaza matrycy zewnątrzkomórkowej; **MR** – receptor mannozy; **MSCs** – mezenchymalne komórki macierzyste; **OCN** – osteokalcyna; **OPN** – osteopontyna; **PBMCs** – obwodowe komórki jednojądrzaste krwi; **PDL** – więzadło ożębnowe; **PDLSCs** – komórki macierzyste więzadła ożębnowego; **PDSCs** – komórki macierzyste okostnej; **PDT** – czas podwojenia; **PGE** – prostaglandyna; **PGFs** – polipeptydowe czynniki wzrostu; **SCAP** – komórki macierzyste wierzchołkowej części brodawki zębowej; **SHED** – komórki macierzyste z ludzkich zębów mlecznych; **TGF** – transformujący czynnik wzrostu; **TNF** – czynnik martwicy nowotworu; **TSCL** – rak płaskonabłonkowy kolczystokomórkowy języka; **VEGF** – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu.

## CHARAKTERYSTYKA I RODZAJE MEZENCHYMALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Somatyczne komórki macierzyste znajdują się w tkankach dorosłych organizmów i charakteryzuje je zdolność do samoodnawiania swojej puli (self-renewal capacity) oraz potencjał różnicowania w komórki określonej tkanki czy narządu [90]. Ich główną rolą jest udział w miejscowych procesach naprawczych i regeneracyjnych. Ukierunkowane tkankowo komórki macierzyste można wyizolować z różnych miejsc: ze szpiku kostnego, z mięśni szkieletowych, z tkanki chrzęstnej, z błony

maziowej, z tkanki tłuszczowej, z wątroby i z płuc, z tkanki mięśnia sercowego czy też z mleka ludzkiego, ale występują w tkankach w stosunkowo niewielkiej ilości [55].

Źródłem komórek macierzystych, które wzbudza największe zainteresowanie badaczy jest z całą pewnością szpik kostny, zawierający komórki macierzyste hematopoetyczne (krwiotwórcze) i komórki macierzyste niehematopoetyczne (mezenchymalne komórki macierzyste) [4]. Duża plastyczność mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego (BMSCs – Bone Marrow

Stem Cells, BMMSCs – Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells) jest tak imponująca, że przez niektórych autorów są traktowane jako komórki pluripotencjalne, które mogą różnicować się nie tylko w tkankę, z której pochodzą, ale także w komórki i tkanki wywodzące się z innych listków zarodkowych w procesie zwanym transdyferencją [9].

Trudności związane z izolacją BMSCs sprawiły, że zaczęto poszukiwać nowych źródeł MSCs o większej dostępności i mniej obciążającym dla pacjenta sposobie pozyskania. International Society for Cell Therapy (ISCT) w 2006 r. przedstawiło trzy warunki, których spełnienie pozwala określić, czy dana komórka może być włączona do puli mezenchymalnych komórek macierzystych (MSCs – mesenchymal stem cells) [20]. Pierwszym z nich jest zdolność przylegania do podłoża (plastic adherence), kolejnym występowanie na błonie komórkowej specyficznej kombinacji antygenów powierzchniowych: CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD11b<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD79α<sup>-</sup>, HLA klasy II – i ostatnim potencjał różnicowania w kierunku co najmniej trzech linii komórkowych *in vitro* (osteoblastów, adipocytów, chondroblastów). Linie komórkowe MSCs pozwalają na pozyskanie pojedynczych fibroblastycznych komórek o wydłużonym kształcie z centralnie umiejscowionym jądrem komórkowym zdolnych do formowania hodowli – CFU-Fs, a ich potencjał wzrostowy i proliferacyjny określa się za pomocą różnic w czasach podwojenia (PDT – population doubling time) [7]. Specyficzne warunki prowadzenia hodowli komórkowych i wykorzystanie odpowiedniej stymulacji, powodują różnicowanie MSCs w odmienne linie komórkowe, służące do oceny potencjału różnicowania *in vitro*.

Bogatym rezerwuarem MSCs okazała się jama ustna [21]. Gronthos i wsp. [36] już w 2000 r. pozyskali MSCs z miazgi zębów stałych i nazwali je komórkami macierzystymi miazgi zęba (DPSCs – Dental Pulp Stem Cells). W dalszej kolejności wyizolowano komórki macierzyste z ludzkich zębów mlecznych (SHED – Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth), komórki macierzyste więzadła ozębnego (PDLSCs – Periodontal Ligament Stem Cells), komórki macierzyste woreczka zębowego (DFCs – Dental Follicle Stem Cells), komórki macierzyste kości wyrostka zęboodołowego (ABMSCs – Alveolar Bone Marrow Stem Cells) i komórki macierzyste wierzchołkowej części brodawki zębowej (SCAP – Stem Cells of the Apical Papilla) [63,66,67,78,81]. W ostatnich latach zidentyfikowano nowe źródła komórek macierzystych w obrębie jamy ustnej – dziąsło, w którym odnaleziono GMSCs (GMSCs – Gingival Mesenchymal Stem Cells) oraz okostną, z której wyizolowano PDSCs (PDSCs – Periosteum-derived Stem Cells) [28,65]. MSCs z jamy ustnej można podzielić na „zębowe” (zdolne do tworzenia kompleksów zębinowo-miazgowych), do których zaliczyć należy: DPSCs, SHED i SCAP, a także na „niezębowe” (nie tworzące kompleksów zębinowo-miazgowych): PDLSCs i GMSCs. Jednak dostępność wymienionych komórek także jest ograniczona, SHED, DFCs i SCAP można wyizolować jedynie

na pewnych szczeblach rozwoju organizmu, natomiast pozyskanie DPSCs, PDLSCs, ABMSCs i PDSCs wymaga przeprowadzenia inwazyjnych zabiegów chirurgicznych. W przypadku DPSCs jest to związane z ekstrakcją zębów. Być może w przyszłości problem zostanie rozwiązany dzięki bankom komórkowym, w których komórki macierzyste z zębów mlecznych i stałych wymagających usunięcia, jak również z tkanek otaczających zęby będą mogły być poddane krioprezewacji [3].

Źródłem o największej dostępności MSCs wydaje się dziąsło. W celu wyizolowania GMSCs należy wykonać jedynie zabieg biopsji dziąsła. Jest to co prawda zabieg inwazyjny, ale o bardzo małym zasięgu i minimalnym, praktycznie nieistotnym ryzyku wystąpienia powikłań. Miejsce dawcze goi się bardzo szybko, bez pozostawienia blizny, co jest związane z osłabioną i krótką reakcją zapalną dziąsła, a także z podwyższonego stężenia antyfibrotycznego transformującego czynnika wzrostu  $\beta$ 3 (TGF- $\beta$ 3 – transforming growth factor) w stosunku do stężenia profibrotycznego transformującego czynnika wzrostu  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) [24].

#### KOMÓRKI MACIERZYTE DZIĄSŁA (GMSCs) JAKO NOWY RODZAJ MSCs Z JAMY USTNEJ

Przez wiele lat uważano, że komórki tworzące dziąsło, podobnie jak pozostałe struktury w obrębie jamy ustnej, pochodzą wyłącznie z grzebienia nerwowego, o czym świadczy ekspresja charakterystycznych markerów przez fibroblasty dziąsłowe: nestyny, tubuliny- $\beta$ III, kwaśnego białka włóknienkowego (GFAP – glial fibrillary acid protein) [49,62]. Najnowsze badania naukowe wykazały jednak, że co prawda około 90% MSCs dziąsła ma pochodzenie ektodermalne, ale pozostałe 10% wywodzi się z mezodermy, co świadczy o heterogeniczności tych komórek i może odpowiadać za odmienne właściwości obu subpopulacji [101].

GMSCs wyizolowano przez rozplem fibroblastów dziąsłowych [29] z komórek uwolnionych z dziąsła metodą dezagregacji enzymatycznej [32,48,87,92,109], jak też metodą sortowania magnetycznego (MACS – magnetic activated cell sorting) z wykorzystaniem kuleczek magnetycznych opłaszczonych swoistymi przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko antygenowi STRO-1 [23]. Nie wyjaśniono jeszcze, skąd pochodzą GMSCs, ale najbardziej prawdopodobne wydaje się ich umiejscowienie w niszach okołonaczyniowych [13]. MSCs dziąsła wyizolowano także z tkanek w stanie zapalnym [33].

Komórki macierzyste dziąsła charakteryzują się obecnością typowych dla MSCs markerów powierzchniowych: CD29 (integryna 1), CD44 (receptor kwasu hialuronowego), CD73 (ekto-5'-nukleozydaza), CD90 (Thy-1), CD105 (endoglin), CD 106 (VCAM-1 – vascular cell adhesion molecule-1), CD146 (perivascular cell marker), CD 166 (activated leukocyte cell adhesion molecule), STRO-1 (putative stem cell marker) i niezawierające epitopów: CD14, CD34, CD45, które są charakterystyczne

dla hematopoetycznych komórek macierzystych [87,88,92,105,109]. GMSCs wykazują także wysoką ekspresję markerów typowych dla komórek macierzystych: Oct4 (octamer-binding transcription factor), Sox2, Nanog, Nestyna, SSEA-4 (stage-specific embryonic antigen), CD146 (MCAM – melanoma cell adhesion molecule), CD166, CD271 (receptor neurotrofiny P75) i komórek mezenchymalnych: wimentyna [48]. GMSCs zachowują ekspresję cząsteczek CD aż w 85% po pasażu 16, co świadczy o dużej stabilności hodowli tych komórek [33].

Kolonie GMSCs w mikroskopie świetlnym składają się z wydłużonych komórek, przypominających fibroblasty i są homogenne już w hodowli pierwotnej, w przeciwieństwie do BMSCs, które uzyskują homogenność po 2-3 pasażach, a w koloniach długoczasowych są niestabilne [88]. GMSCs cechuje także większy potencjał wzrostowy i proliferacyjny – ich PDT wynosi  $39,6 \pm 3,2$  godziny w porównaniu z  $80,4 \pm 1,2$  godziny dla BMSCs [88]. Zastosowanie pochodnych matrycy szkliwnej (EMD – enamel matrix derivatives) zwiększało proliferację GMSCs *in vitro* [97]. Czas podwojenia GMSCs jest także krótszy niż PDLSCs [105]. Podobnie zdolność do formowania kolonii GMSCs jest większa niż PDLSCs, ponieważ liczba kolonii po 14 dniach inkubacji wynosiła odpowiednio dla obu linii komórkowych  $23,5 \pm 3,2\%$  i  $12,9 \pm 0,6\%$  ( $P < 0,001$ ), co można tłumaczyć dużymi zdolnościami regeneracyjnymi komórek działu w porównaniu z komórkami ozębnej [32,105]. Potwierdza to także wyższy odsetek GMSCs w fazach S i G2 interfazy (48,4%) w odniesieniu do PDLSCs (19,46%) [32]. Można też przypuszczać, że komórki macierzyste pochodzące z tkanek rozwijających się, które są we wcześniejszych fazach zróżnicowania komórkowego – SCAP, DFCs – będą wykazywały większą zdolność do formowania kolonii niż GMSCs, chociaż obecnie nie dysponujemy żadnymi dowodami naukowymi [86]. Mimo dużej aktywności proliferacyjnej, kariotyp GMSCs po rozplemie *ex vivo* pozostaje niezmienny ( $2n, n=23$ ), co potwierdza dużą stabilność genetyczną tych komórek [88]. GMSCs nie ulegają także transformacji.

GMSCs, pod wpływem odpowiedniej stymulacji i ściśle określonych warunków prowadzenia hodowli, podobnie jak wszystkie MSCs, mogą różnicować w kierunku tkanki kostnej, tkanki tłuszczowej i tkanki chrzęstnej *in vitro* [15,23,27,29,32,33,48,65,92,97,105]. Ferré i wsp. [27] wykazali, że część GMSCs po 3 tygodniach hodowli indukującej potencjał chondrogeniczny wykazywała wysoką ekspresję kadheryny 11, która jest silnym markerem synowocytów. GMSCs mogą różnicować się w kierunku tkanki nerwowej [22,97,101,109] oraz w komórki śródbłonka [109]. GMSCs pochodzące z grzebienia nerwowego są bardziej zdolne do różnicowania w kierunku tkanki chrzęstnej, a w warunkach hodowli promujących potencjał neurogeniczny wykazują wyższą ekspresję markerów charakterystycznych dla tkanki nerwowej: tubuliny- $\beta$ , nestyny i neurofilamentu M, w porównaniu do GMSCC pochodzących z mezodermy [101]. Potencjał neurogeniczny GMSCs *in vitro* zwiększała stymulacja

ultradźwiękami (LIPU – low intensity pulsed ultrasound) [22]. W warunkach hodowli promujących różnicowanie w kierunku endodermalnych linii komórkowych na szkiełkach pokrytych fibronektyną GMSCs wykazywały ekspresję Sox17, Foxa2, CRCX4 i CD31 [109]. GMSCs hodowane na podłożu kondycjonowanym ETGC-CM (embryonic tooth germ cell-conditioned medium) cechowały się podwyższoną ekspresją fosfatazy zasadowej (ALP – alkaline phosphatase), osteopontyny (OPN – osteopontin), kostnej sialoproteiny (BSP – bone sialoprotein) i białka matrycy zębiny (DMP-1 – dentin matrix protein), co świadczy o ich potencjale odontogenicznym [32]. Różnicowanie *in vitro* oraz *in vivo* komórek macierzystych działu i innych MSCs z jamy ustnej przedstawiono w tabeli 1. Natomiast tabela 2 przybliża ekspresję markerów tkankowoswoistych i zmiany zachodzące w morfologii komórek i obrazie kolonii pod wpływem odpowiedniej stymulacji.

Obecnie jest niewiele badań, które porównują potencjał różnicowania GMSCs z potencjałem innych komórek macierzystych. Yang i wsp. [105] wykazali, że potencjał różnicowania PDLSCs jest większy niż GMSCs. Dodanie do hodowli czynnika martwicy nowotworu TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) i IL-1 $\beta$  wpływało w sposób znaczący na zmniejszenie potencjału proosteogenicznego i proadipogenicznego PDLSCs. Podobną inhibicję uzyskano w przypadku GMSCs, jednak była ona słabsza niż w przypadku PDLSCs, co świadczy o tym, że potencjał różnicowania GMSCs jest mniej zależny od zmian zapalnych w środowisku tych komórek. Li i wsp. [58] potwierdzili, że potencjał różnicowania GMSCs pochodzących z tkanek objętych procesem zapalnym jest zmniejszony, przy jednocześnie zwiększonej ekspresji metaloproteiny 1 i metaloproteiny 2 (MMP – matrix metalloproteinases), IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  i kolagenu typu I w porównaniu z GMSCs pochodzącymi ze zdrowych tkanek. Dodanie do hodowli EMD zwiększało potencjał osteogeniczny GMSCs, na co wskazywała zwiększona ekspresja ALP, osteokalcyny (OCN – osteocalcin) i ameloblastyny (AMBN – ameloblastin) [97].

Po podskórnej implantacji myszom poddanym immunosupresji GMSCs formowały tkankę łączną włóknistą przypominającą działo [33]. Natomiast, gdy GMSCs były poddane uprzedniej inkubacji w warunkach promujących potencjał osteogeniczny, a następnie implantowane podskórnie myszom na odpowiednim nośniku (materiał kośćozastępczy), wytwarzały po 8-10 tygodniach tkankę zmineralizowaną przypominającą kość [88,105]. Zorin i wsp. [114] jako rusztowanie i nośnik dla GMSCs wykorzystali materiał ceramiczny (OCP – octacalcium phosphate ceramic). Jednak w literaturze tematu można znaleźć także doniesienia, które negują wytwarzanie kości przez implantowane GMSCs w warunkach *in vivo* [109].

Wang i wsp. [92] wykazali, że po implantacji GMSCs na nośniku kolagenowym szczurom, w obrębie sztucznie wypręparowanych ubytków kostnych w żuchwie docho-

**Tabela 1.** Charakterystyka komórek macierzystych dżdźała (GMSCs) w porównaniu z innymi wybranymi mezenchymalnymi komórkami macierzystymi (MSCs) – markery powierzchniowe, potencjał różnicowania *in vitro* i *in vivo*

Rodzaj komórek macierzystych	Markery powierzchniowe	Potencjał różnicowania	Piśmiennictwo
GMSCs	CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166, STRO-1, OCT4, SOX2, SSEA4	<i>In vitro</i> : osteogeniczność, adipogeniczność, chondrogeniczność, neurogeniczność, różnicowanie do odontoblastów i śródbłnka  <i>In vivo</i> : formowanie tkanki łącznej włóknistej, kości, chrząstki, komórek mięśniowych, regeneracja przyzębia z odtwarzaniem kości, cementu i włókien ożębnej	[36]
			[28]
			[40]
			[35]
			[21]
			[29]
			[22]
			[23]
			[14]
			[93]
		[24]	
		[30]	
		[20,25,26,31,32,41],	
PDSCs	CD73, CD90, CD105, CD166, KDR/Flk1, Flt1, niska ekspresja CD9	<i>In vitro</i> : osteogeniczność, adipogeniczność, chondrogeniczność  <i>In vivo</i> : różnicowanie do osteoblastów i formowanie kości	[12,15,84]
DPSCs	CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166, CD271, OCT3/4, SOX2, SSEA4, STRO-1	<i>In vitro</i> : osteogeniczność, adipogeniczność, chondrogeniczność, neurogeniczność, miogeniczność, różnicowanie do hepatocytów, kardiomiocytów, melanocytów, odontoblastów  <i>In vivo</i> : formowanie kości, komórek tłuszczowych, komórek mięśniowych, komórek nerwowych, regeneracja rogówki oka, formowanie zębiny, tworzą kompleks miazgowo-zębinowy, regeneracja przyzębia z odtwarzaniem kości, cementu i włókien ożębnej	[105]
			[83]
			[95]
			[7]
			[106]
			[110]
			[8,114]
			[108]
			[111]
			[81]
[98]			
[69]			
[33]			
[96]			
[75]			
[94]			
[97]			
[89]			
SHED	CD13, CD29, CD31, CD44, CD56, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166, STRO-1, VEGFR2, VE-kadheryna	<i>In vitro</i> : osteogeniczność, adipogeniczność, chondrogeniczność, neurogeniczność, miogeniczność, różnicowanie do odontoblastów i śródbłnka  <i>In vivo</i> : formowanie kości, regeneracja rogówki, różnicowanie do odontoblastów i śródbłnka, formowanie zębiny, nie tworzą kompleksów miazgowo-zębinowych	[16]
			[67]
			[74]
			[113]
			[107]
			[111]
			[54]
			[10]
[99]			
		[86]	
PDLSCs	CD9, CD10, CD13, CD29, CD 44, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166, STRO-1,STRO-3, OCT3/4, SSEA4, SOX2+	<i>In vitro</i> : osteogeniczność, adipogeniczność, chondrogeniczność, neurogeniczność, miogeniczność, cementogeniczność  <i>In vivo</i> : formowanie kości, chrząstki, regeneracja przyzębia z odtwarzaniem kości, cementu i włókien ożębnej	[83]
			[7]
			[93]
			[12]
			[87]
			[13,33,75]
			[75]
		[31]	

Rodzaj komórek macierzystych	Markery powierzchniowe	Potencjał różnicowania	Piśmiennictwo
SCAP	CD13, CD24, CD29, CD44, CD51, CD56, CD61, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166,	<i>In vitro</i> : osteogeniczność, adipogeniczność, neurogeniczność, formowanie zębiny, różnicowanie do hepatocytów	[78] [68] [13]
		<i>In vivo</i> : formowanie zębiny, tworzą kompleks miazgowo-zębinowy, regeneracja przyzębia z odtwarzaniem cementu i włókien ozębnej	[88] [33]
ABMSCs	CD13, CD29, CD44, CD71, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166	<i>In vitro</i> : osteogeniczność, adipogeniczność, chondrogeniczność	[9]
		<i>In vivo</i> : formowanie kości	
DFCs	CD8b, CD9, CD10, CD13, CD26, CD29, CD44, CD53, CD56, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166, CD271, CD134, STRO-1, OCT4, SSEA4, TRA1-60, TRA1-81, Brn3a, Tuj1, SMA	<i>In vitro</i> : osteogeniczność, adipogeniczność, chondrogeniczność, neurogeniczność, różnicowanie do hepatocytów, cementogeniczność	[34] [80]
		<i>In vivo</i> : formowanie kości, komórek tłuszczowych, regeneracja przyzębia z odtwarzaniem kości, cementu i włókien ozębnej	[11] [33]

dziło do regeneracji tkanki kostnej po 2 miesiącach od implantacji. Potencjał regeneracyjny PDLSCs był większy niż GMSCs, gdy jako nośnik wykorzystano zmodyfikowane mikrosfery alginianowe (RGD – modified alginate microspheres) [69]. Natomiast Fawzy El-Sayed i wsp. [40] implantowali GMSCs na rusztowaniu kolagenowym lub materiale kośćcozastępczym (DBCB) w obrębie ubytków kostnych w przyzębiu i uzyskali pełną regenerację utraconych tkanek, obserwując odtwarzanie kości, cementu i włókien więzadła ozębnego. W jednym z najnowszych badań Xu i wsp. [100] po dożylniej administracji GMSCs myszom C57BL/6J z wyprzeżowanymi ubytkami kostnymi w żuchwie zaobserwowali zjawisko „homingu” komórkowego, ponieważ GMSCs zostały nie tylko zidentyfikowane w ubytkach kostnych, ale również promowały regenerację defektów. Nie w pełni zrozumiałe jest pobudzenie angiogenezy przez GMSCs. Hodowle komórek działają syntetyzując angiogeniczne czynniki wzrostu: naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor), IL-8, białko chemoaktywne monocytów 1 (MCP-1 – Monocyte Chemoattractant Protein 1) i stymulują wzrost komórek śródbłonka *in vitro*. Nie można jednak stwierdzić, czy zdolności te są przypisane GMSCs, fibroblastom dziąsłowym, a może nawet innym komórkom składowym dziąsła.

GMSCs uprzednio poddane inkubacji w obecności deksametazonu, a następnie wszczepiane podskórnie myszom SCID formowały nowotwory mieszane (o składowych wywodzących się z dwóch listków zarodkowych: mezodermy i ektodermy), które zawierały tkankę tłuszczową, komórki mięśni poprzecznie prążkowanych, chrząstkę, tkankę kostną, nabłonkową i nerwową. [62]. Badanie potwierdziło, że GMSCs mogą ulegać różnicowaniu do tkanek pochodzących zarówno z mezodermy, jak też z ektodermy.

Reasumując można stwierdzić, że GMSCs stanowią grupę komórek o możliwościach potencjalnego zastosowania w leczeniu regeneracyjnym. Koncepcja wykorzystania GMSCs budzi duże nadzieje dotyczące ich wykorzystania terapeutycznego nie tylko w leczeniu zapaleń przyzębia (regeneracja ubytków kostnych), ale także chorób ogólnoustrojowych (choroby kości i stawów, schorzenia neurologiczne).

### WŁAŚCIWOŚCI IMMUNOMODULACYJNE GMSCs

Wielu badaczy wykazało, że GMSCs, podobnie jak inne mezenchymatyczne komórki macierzyste, mają właściwości immunomodulacyjne i mogą wyciszać odpowiedź immunologiczną układu odpornościowego [18,19,51,59,60,61,68,74,89,91,103,113,178]. Wyniki tych prac zebrano i przedstawiono w tabeli 3.

Mechanizmy biologiczne determinujące potencjał immunomodulacyjny GMSCs są bardzo złożone. Najogólniej rzecz ujmując, są to wielopłaszczyznowe szlaki syntezy różnorodnych rozpuszczalnych czynników modulujących: 2,3-dioksygenazy indoleaminy (IDO – indoleamine 2,3 – dioxygenase), IL-10, prostaglandyny 2 (PGE2 – prostaglandine 2) i szeroko rozumiane interakcje między GMSCs a komórkami układu immunologicznego: komórkami dendrytycznymi, makrofagami, komórkami tucznyimi, limfocytami T CD8(+) i T(H)-17 [84,87,108]. GMSCs w warunkach *in vitro* sprzyjały polaryzacji fenotypowej makrofagów prozapalnych M1 w kierunku komórek M2 o właściwościach przeciwzapalnych, przez zwiększenie ekspresji receptora mannozy (MR – mannose receptor, CD206) [111]. Komórki M2 charakteryzowały się zmniejszoną synteza IL-6 i TNF- $\alpha$  i zwiększoną ekspresją IL-10. Sekrecja TNF- $\alpha$  na niskim poziomie była związana z zaburzoną aktywnością czynnika transkrypcyjnego

**Tabela 2.** Kierunki różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych (MSCs), czynniki indukcyjne, ekspresja specyficznych markerów, zmiany w hodowli komórek

Kierunek różnicowania MSCs	Czynniki indukcyjne	Ekspresja markerów	Zmiany w hodowli komórek	Piśmiennictwo
osteogeniczne	deksametazon, β-glicerofosforan, kwas 2-fosforanowo-L-askorbinowy, białko morfogenetyczne kości 2 – BMP-2, białko morfogenetyczne kości 6 – BMP-6, białko morfogenetyczne kości 7 – BMP-7, białko matrycy zębiny 1 – DMP1, czynnik wzrostu fibroblastów – FGF-2	fosfataza zasadowa – ALP, kolagen typu I – Col I, osteokalcyna – OCN, kostna sialoproteina – BSP, ameloblastyna – AMBN, cbfa-1, Runx2	obecność zewnątrzkomórkowych ognisk mineralizacji po barwieniu alizaryną	[28] [35] [22,23,32,84,85,89,91]
adipogeniczne	indometacyna, hydrokortyzon, izobutylometylksantyna (IBMX)	receptor aktywowany przez proliferatory receptorów peroksydomów γ – PPARγ, białko adipocytarne 2	obecność kropli tłuszczu w cytoplazmie komórek po barwieniu czerwienią oleistą O lub czernią Sudan	[28] [35] [22] [23] [31,32,87,89,93]
chondrogeniczne	transformujący czynnik wzrostu β1 – TGF-β1, transformujący czynnik wzrostu β3 – TGF-β3 białko morfogenetyczne kości 6 – BMP-6	agrekana – ACAN, kolagen typu II – COL II, SOX9	komórki odkładają glikozaminoglikany (siarczan chondroityny, agrekana), których wykrycie umożliwia błękit alcjański; barwienie immunochemiczne uwidocznia kolagen typu II	[28] [114] [23] [87] [31]
neurogeniczne	witamina B12, epidermalny czynnik wzrostu – EGF, czynnik wzrostu fibroblastów – b-FGF, ITS, merkaptofenol β – β-BME	nestyna, βIII-tubulina, kwaśne białko włókienkowe (GFAP), neurofilament 160/200 (NF-M), NF-200, MAP2	barwienie błękitem toluidyny obrazuje komórki morfologicznie podobne do neuronów; barwienie immunohistochemiczne uwidocznia kwaśne białko włókienkowe GAP	[34] [36] [10] [33] [32] [26]
miogeniczne	5-aza-2'-deokscytydyna – 5-Aza	desmina, troponina T, łańcuchy ciężkie miozyny β – BMHC, regulacyjne łańcuchy lekkie miozyny – Myl2	w cytoplazmie komórek widoczne struktury przypominające mikrotubule	[54] [87] [89]
odontogeniczne	podłoże kondycjonowane ETGC-CM, nośnik: HA/TCP, zębina ludzka	fosfataza zasadowa-ALP, kostna sialoproteina – BSP, osteopontyna – OPN, białko matrycy zębiny – DMP	różnicowanie do odontoblastów, odkładanie zębiny, tworzenie kompleksów miazgowo-zębinowych	[66] [83] [67] [22] [70] [7,10,68,69]
cementogeniczne	nośnik: HA/TCP, Bio-Oss®, mikrosfery alginianowe	fosfataza zasadowa-ALP, kolagen typu I – Col I, osteokalcyna – OCN, osteopontyna – OPN, Runx2, kolagen typu III – Col III	różnicowanie do cementoblastów i wytwarzanie cementu korzeniowego obcowłóknistego	[76] [42] [40] [12,25,39,41,78,81,82]

**Tabela 3.** Właściwości immunomodulacyjne mezenchymalnych komórek macierzystych (MSCs) z jamy ustnej

Rodzaj komórek macierzystych	Właściwości immunomodulacyjne	Piśmiennictwo
GMSCs	1) regulowanie syntezy rozpuszczalnych czynników modulujących: IDO, IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$ , PGE2, IFN- $\gamma$ , TSG-6	
	2) inhibicja PBMCs poprzez ekspresję FasL	[60]
	3) pobudzenie polaryzacji fenotypowej makrofagów M1 w kierunku komórek M2 poprzez zwiększenie ekspresji CD206	[59]
	4) inhibicja syntezy cytokin prozapalnych przez komórki tuczne w wyniku sprzężenia zwrotnego TNF- $\alpha$ /PGE2	[58] [55]
	5) aktywacja limfocytów Treg i zmniejszenie syntezy IFN- $\gamma$ i IL-17A, 6) pobudzenie syntezy reaktywnych form tlenu, HIF-1, HIF-2 $\alpha$ i mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej, co zwiększa oporność komórek na apoptozę indukowaną stresem oksydacyjnym	[24] [62] [20]
	7) supresja ogólnoustrojowych procesów zapalnych: zapalenia stawów, CHS, zapalenia jelita grubego, uszkodzeń skóry, zapalenia jamy ustnej indukowanego chemioterapią <i>in vivo</i> na modelu zwierzęcym	[26] [56]
	8) G-MSCFLT indukowały apoptozę komórek nowotworowych TSCC (linii Tca8113 i Cal27) <i>in vivo</i>	
	DPSCs	1) supresja proliferacji limfocytów T oraz aktywacja apoptozy limfocytów T
2) hamowanie podziałów PBMCs przez sekrecję IFN- $\gamma$		[50]
3) upregulacja syntezy TGF- $\beta$ i IL-6		[51]
4) supresja zapalenia jelit <i>in vivo</i> na modelu zwierzęcym		[53]
SHED	1) supresja różnicowania limfocytów Th17 i pobudzenie limfocytów Treg	[54]
	2) supresja ogólnoustrojowych procesów zapalnych związanych z dystrofią mięśniową (GRMD) i toczniem rumieniowatym (SLE) <i>in vivo</i> na modelu zwierzęcym	[52]
PDLSCs	1) synteza rozpuszczalnych czynników modulujących: IDO, TGF- $\beta$ , HGF, IL-6	
	2) indukcja anergii limfocytów T przez syntezę PGE2	[42]
	3) hamowanie proliferacji, różnicowania i migracji limfocytów T przez PD-1, w następstwie limfocyty B wytwarzały zmniejszoną ilość: IgM, IgG, IgA	[46] [47]
	4) PDLSCs z tkanek zmienionych zapalnie miały zmniejszony potencjał immunosupresyjny (osłabiona indukcja limfocytów Treg, supresja różnicowania limfocytów Th17, zmniejszona sekrecja IL-10 i – 17)	[51]
SCAP	1) supresja proliferacji limfocytów T,	
	2) hamowanie mieszanej reakcji limfocytów (MLR)	[43]
DFCs	1) synteza TGF- $\beta$ i supresja PBMCs,	[48]
	2) agoniści TLR3 i TLR4 zwiększały sekrecję TGF- $\beta$ oraz IL-6 przez DFCs	[50]

cyjnego NF- $\kappa$ B p50, a skutkiem wszystkich opisanych procesów była osłabiona infiltracja komórek immunologicznie kompetentnych. Hipoksja nasilała supresorowy wpływ GMSCs na obwodowe komórki jednojądrzaste krwi (PBMCs – peripheral blood mononuclear cells) poprzez ekspresję ligandu Fas (FasL) [47]. W innym badaniu GMSCs inhibowały syntezę cytokin prozapalnych przez komórki tuczne za pomocą sprzężenia zwrotnego TNF- $\alpha$ /PGE2 [84]. GMSCs pochodzące z grzebienia nerwowego prezentowały większą immunosupresyjność, co objawiało się większymi zdolnościami do wywołania apoptozy aktywnych limfocytów T, w porównaniu z GMSCs pochodzącymi z mezodermy [101].

Po dożylniej aplikacji GMSCs obserwowano supresję ogólnoustrojowych procesów zapalnych: zapalenia stawów, alergii kontaktowej (CHS – contact hypersensitivity) i zapalenia jelita grubego na modelach zwierzęcych dzięki modulowaniu przez GMSCs funkcji komórek

immunokompetentnych przez szlak Coxs/PGE2, akumulację limfocytów Treg i wzrost ekspresji IL-10 [10,84,101,109]. Tang i wsp. [87] po dożylniej administracji GMSCs myszom z allotransplantami skóry zaobserwowali wyciszenie odpowiedzi immunologicznej przez upregulację Treg. Podobnie Jiang i wsp. [47] wykazali supresorowy efekt GMSCs na procesy zapalne w obrębie uszkodzonej skóry, zmniejszenie syntezy TNF- $\alpha$  i pobudzenie ekspresji IL-10. Chen i wsp. [10] opisali, że w indukowanym zapaleniu stawów (CIA – collagen induced arthritis) GMSCs *in vivo* aktywowały limfocyty T regulatorowe (Treg) CD4+CD39+FOXP3+ i zmniejszały wytwarzanie cytokin zapalnych: interferonu  $\gamma$  (IFN- $\gamma$  – interferon- $\gamma$ ) i IL-17A. GMSCs brały również udział w syntezie proteiny TSG-6 (tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ -stimulated protein 6), która wpływa modulatorowo na kaskadę cytokin prozapalnych i przyspiesza gojenie tkanek [60]. GMSCs podawane w postaci sferoidów 3D zmniejszały objawy zapalenia jamy ustnej indukowanego chemioterapią u myszy



[61]. U podłoża tych obserwacji leżały: zwiększona synteza reaktywnych form tlenu, czynnika indukowanego hipoksją (HIF-1 – hypoxia-inducible factor) i HIF-2 $\alpha$  oraz mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej, co przyczyniało się do zwiększonej oporności komórek na apoptozę indukowaną stresem oksydacyjnym.

Wyniki najnowszych badań wskazują na właściwości przeciwnowotworowe GMSCs [98]. Xia i wsp. [98] wykazali, że GMSCs *in vitro* migrowały w kierunku komórek nowotworowych raka płaskonabłonkowego koleczystokomórkowego języka (TSCC – tongue squamous cell carcinoma) linii Tca8113 i Cal 27. Po transdukcji TRAIL (TNF- $\alpha$  – related apoptosis-inducing ligand) lentiwirusem (LV) GMSCs indukowały apoptozę komórek nowotworowych. Właściwości te utrzymywały się *in vivo* u myszy po administracji transdukowanych GMSCs wraz z komórkami TSCC. Badanie wskazuje na potencjalne wykorzystanie komórek macierzystych dziąsła jako nośnika w terapii genowej nowotworów.

Być może właściwości immunomodulacyjne, immunosupresyjne i przeciwzapalne GMSCs pozwolą na ich wykorzystanie w terapii komórkowej chorób o tle immunologicznym i immunologiczno-zapalnym w przyszłości.

#### **MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA KOMÓREK MACIERZYSTYCH Z JAMY USTNEJ W STOMATOLOGII ORAZ W MEDYCYNIE REGENERACYJNEJ**

W stosunku do MSCs, jako narzędzi terapeutycznych, stawiane są bardzo wysokie oczekiwania w postaci nie tylko terapii komórkowej, ale również inżynierii tkankowej i medycyny regeneracyjnej. Wśród niewątpliwych korzyści takiego postępowania należy wymienić pełnowartościową regenerację tkankową bez formowania tkanek bliźnowatych, zmniejszoną chorobowość związaną z preparacją odczynnika biorczej w odniesieniu do pozyskiwania przeszczepów autogenywnych, minimalne ryzyko wystąpienia reakcji autoimmunologicznych i transmisji infekcji.

Dowody naukowe wskazują na nieco odmienne właściwości MSCs z jamy ustnej w odniesieniu do BMSCs, a mianowicie na ich silniejsze ukierunkowanie odontogeniczne w porównaniu z potencjałem osteogenicznym oraz zdolności różnicowania w kierunku komórek nerwowych [46,83]. Cech charakterystycznych komórki te mogą nabywać już na etapie odontogenezy, podczas której złożone oddziaływanie między komórkami ektodermalnymi i ektomezenchymalnymi prowadzi do tworzenia zębów i kształtowania ukierunkowania tkankowego MSCs [8].

Badania naukowe wykazały, że DPSCs, SHED i SCAP zawieszane na odpowiednim nośniku (np. cząsteczki hydroksyapatytu/fosforanu trójwapniowego – HA/TCP, zębina ludzka) po podskórnej implantacji myszom poddanym immunosupresji wytwarzały zmineralizowaną tkankę przypominającą zębinę i tworzyły kompleksy zębinowo-miazgowe po 6-8 tygodniach od implantacji

[5,12,40,56]. SHED nie organizowały jednak funkcjonalnych kompleksów zębinowo-miazgowych [66]. Goller i wsp. [30] potwierdzili, że modyfikacja bloczków zębinowych używanych jako rusztowanie z użyciem kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid) przyczyniała się do poprawy organizacji implantowanych komórek. Większe trudności są związane z regeneracją miazgi zęba ze względu na jej ograniczone unaczynienie, jednak najnowsze doniesienia naukowe wskazują, że jest to możliwe z użyciem DPSCs i SCAP [41,42,71], jak również kompleksów komórkowych (konstrukty miazgi) uzyskanych przez rozplem SHED *in vitro* na rusztowaniach z kwasu polimlekowego z dodatkiem białka morfogenetycznego kości 2 (BMP – bone morphogenetic protein) i TGF- $\beta$ 1 [104]. Uzyskano pełną regenerację miazgi i kompleksu zębinowo-miazgowego w zębach z zakończonym rozwojem korzeni u psów, gdy w miejsce utraconej tkanki implantowane były DPSCs wraz z czynnikiem stymulującym wzrost kolonii granulocytów (G-CSF – granulocyte-colony stimulating factor) [42,71]. DPSCs różnicowały się w funkcjonalne odontoblasty, które cechowała wysoka ekspresja swoistych markerów – enamelizyny i MMP 20.

Niektórzy autorzy udowodnili także, że możliwa jest regeneracja kompletnych korzeni zębów z użyciem MSCs. Sonoyama i wsp. [81] zastosowali w tym celu kompleks SCAP i PDLSCs, natomiast Yang i wsp. [104] DFCs na rusztowaniu TDM (treated dentin matrix). W jednym z najnowszych badań allogenne DPSCs/PDLSCs na nośniku HA/TCP wszczepiane w sztucznie wypreparowane zębodoły u świń umożliwiły prawidłowy rozwój korzeni zębów, które po obciążeniu koronami protetycznymi zachowywały pełną funkcjonalność [96].

Inną możliwością użycia MSCs jest leczenie zapaleń przyzębia, w wyniku których dochodzi do utraty struktur utrzymujących zęby w zębodole: kości wyrostka zębodołowego, wiązadła ozębnego i cementu korzeniowego. Badania naukowe wykazały, że z użyciem PDLSCs na nośniku HA/TCP [78], jak również filmów komórkowych PDLSCs możliwa jest pełna regeneracja tkankowych ubytków periodontologicznych na modelu zwierzęcym [1,18] i ludzkim [26]. Potencjał regeneracyjny PDLSCs nasilał się po inkubacji tych komórek w środowisku zawierającym witaminę C, co prowadziło do zwiększenia aktywności telomerazy [95]. Han i wsp. [38] udowodnili, że SCAP także mają potencjał cementogeniczny *in vitro* oraz *in vivo*. Najnowsze doniesienia wskazują, że wykorzystanie DPSCs oraz DFCs również przyczyniało się do regeneracji kości, wiązadła zębodołowego i cementu korzeniowego po implantacji tych komórek w miejsce defektów tkankowych [37,53,100,107].

W procesach naprawczych i regeneracyjnych kości główną rolę odgrywa waskularyzacja, która poprzedza formowanie tkanki zmineralizowanej. Wszystkie MSCs z jamy ustnej pod wpływem odpowiedniej stymulacji *in vitro* oraz na modelach *in vivo* różnicują się w kierunku tkanki kostnej [11,23,27,28,29,32,33,36,48,50,53,69,76,

79,80,82,86,87,92,97,105,109,112]. d'Aquino i wsp. [14] wykazali, że biokompleksy złożone z DPSCs i nośnika w postaci gąbki kolagenowej umożliwiały regenerację ubytków kostnych w zuchwie w badaniu na ludziach. Potencjał promineralizacyjny komórek macierzystych oraz poindukcyjny poziom ekspresji markerów swoistych dla tkanki kostnej wzrastał pod wpływem stymulacji czynnikiem wzrostu fibroblastów 2 (FGF – fibroblast growth factor) [57]. Jednak gdy potencjał chondrogeniczny *in vitro* jest cechą wspólną wszystkich MSCs, to regenerację tkanki chrzęstnej na modelach *in vivo* obserwowano jedynie w przypadku GMSCs i PDLSCs [92,93]. PDLSCs i GMSCs zanurzone w zmodyfikowanych mikrosferach alginianowych przyczyniały się również do regeneracji ścięgien *in vivo* u myszy i wykazywały ekspresję markerów swoistych dla tej tkanki: Scx, Dcn, Tnmd, Bgy [69].

Komórki macierzyste z jamy ustnej, ze względu na swój rodowód, mogą się różnicować do wyspecjalizowanych komórek układu nerwowego, co zostało potwierdzone w badaniach *in vitro* [15,66,86,99,101]. U zwierząt z dysfunkcjami neurologicznymi, urazami układu nerwowego i zaburzeniami behawioralnymi towarzyszącymi zwirodnieniu chorobie ośrodkowego układu nerwowego, którym administrowano DPSCs [16,54,76,85,93,94,102] zauważono znaczącą poprawę stanu zdrowia. Większość badaczy uważa, że jest to przede wszystkim związane z aktywnością sekrecyjną tych komórek, która powoduje zmiany w mikrośrodowisku, jak również ze złożonymi oddziaływaniami międzykomórkowymi [76,64]. Do tej pory nie ma badań oceniających potencjał neurogeniczny *in vivo* pozostałych MSCs z jamy ustnej.

Omawiana grupa MSCs również tworzy potencjał miogeniczny. Badania naukowe wskazują na zdolność różnicowania SHED w kierunku mięśni gładkich i poprzecznie prążkowanych *in vivo* [52]. U psów i myszy z dystrofią mięśniową, którym podano SHED zauważono znaczącą poprawę stanu klinicznego [51,106]. DPSCs w hodowli z neonatalnymi kardiomiocytami szczurów po 4 tygodniach ulegały różnicowaniu do komórek przypominających kardiomiocyty [2]. U szczurów po zawale mięśnia sercowego iniekcje DPSCs zmniejszały obszar niedokrwienia przez indukcję angiogenezy najprawdopodobniej dzięki sekrecji parakrynych czynników proangiogennych i antyapoptycznych [31]. W cytowanym badaniu nie obserwowano różnicowania przeszczepionych komórek w kierunku śródbłonna, mięśni gładkich, czy też kardiomiocytów. Song i wsp. [80] wykazali potencjał miogeniczny PDLSCs *in vitro*, który był indukowany przez dodatek 5-aza-2'-deoksytydyny, jednak nie został potwierdzony w badaniach *in vivo*.

Poza wyżej opisanym potencjałem różnicowania MSCs z jamy ustnej, ciągle są analizowane nowe możliwości ich zastosowania w innych gałęziach medycyny,

co stanowi bodziec do dalszego prowadzenia badań w tym zakresie, które przynoszą zaskakujące i niezwykle interesujące wyniki. DPSCs i SHED w warunkach *in vitro* wykazywały zdolność do różnicowania w kierunku hepatocytów [43,44]. Obecność w środowisku hodowli siarkowodoru przyczyniała się do zwiększania tego potencjału [73]. Govindasamy i wsp. [35] wykazali, że DPSCs w kulturach *in vitro* mogą ulegać różnicowaniu do agregatów komórkowych przypominających komórki wyspowe trzustki, które wykazywały ekspresję tkankowoswoistych markerów: peptydu C, Pdx-1, Pax4, Pax6, Ngn3, Isl-1. Inni badacze potwierdzili te doniesienia wskazując na podobne właściwości SHED [45]. DPSCs i SHED w odpowiednich warunkach prowadzenia hodowli charakteryzowała ekspresja insuliny, glukagonu, somatostatyny, polipeptydu trzustkowego i  $\alpha$ -amylazy 2a. Wyniki najnowszych badań wskazują, że DPSCs szczurów po transfekcji czynnikami transkrypcyjnymi Pdx1 i Neurog 3 ulegały różnicowaniu w kierunku komórek wytwarzających insulinę *in vitro* [72]. Co więcej, SHED były wykorzystane w celu regeneracji rogówki. Gomes i wsp. [34] po transferze filmów komórkowych SHED na powierzchnię rogówki królików z niedoborem limbicznych komórek macierzystych zaobserwowali zmiany strukturalne i integrację SHED w obrębie otaczających tkanek.

Wyniki przytoczonych badań wskazują na olbrzymią plastyczność MSCs z jamy ustnej, dzięki czemu stanowią uniwersalne źródło komórek, które mogą znaleźć zastosowanie w szeroko rozumianej medycynie regeneracyjnej dotyczącej nie tylko jamy ustnej, ale także tkanek i narządów odległych. Konieczne wydaje się dalsze prowadzenie badań pozwalających na lepsze zrozumienie biologii tych komórek, poszukiwanie optymalnych metod ich izolacji, rozplemu i przechowywania oraz opracowanie bezpiecznych protokołów wykorzystania w klinice.

## PODSUMOWANIE

MSCs z jamy ustnej mają bardzo duży potencjał regeneracyjny, który może być wykorzystany nie tylko w stomatologii, ale także w różnych dziedzinach medycyny. W tej grupie komórek GMSCs wydają się zajmować szczególną pozycję, ze względu na praktycznie ich nieograniczoną liczbę i łatwość pozyskania. Komórki macierzyste działają charakteryzując dużą stabilność morfologiczną, ale potencjał ich różnicowania nie jest w pełni poznany. Najbardziej są udokumentowane ich zdolności osteogeniczne oraz immunomodulacyjne. W związku z powyższym koncepcja wykorzystania GMSCs w leczeniu zapaleń przyzębia (regeneracja ubytków kostnych), jednostek ogólnoustrojowych (choroby kości i stawów, zaburzenia neurologiczne, schorzenia o tle immunologicznym i immunologiczno-zapalnym) ma przed sobą bardzo interesujące perspektywy.

**PISMIENICTWO**

- [1] Akizuki T., Oda S., Komaki M., Tsuchioka H., Kawakatsu N., Kikuchi A., Yamato M., Okano T., Ishikawa I.: Application of periodontal ligament cell sheet for periodontal regeneration: a pilot study in beagle dogs. *J. Periodontol. Res.*, 2005; 40: 245-251
- [2] Arminán A., Gandia C., Bartual M., García-Verdugo J.M., Lledó E., Mirabet V., Llop M., Barea J., Montero J.A., Sepúlveda P.: Cardiac differentiation is driven by NKX2.5 and GATA4 nuclear translocation in tissue-specific mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.*, 2009; 18: 907-918
- [3] Arora V., Arora P., Munshi A.K.: Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): saving for the future. *J. Clin. Pediatr. Dent.*, 2009; 33: 289-294
- [4] Arvidson K., Abdallah M., Applegate L.A., Baldini N., Cenni E., Gomez-Barrena E., Granchi D., Kassem M., Kontinen Y.T., Mustafa K., Pioletti D.P., Sillat T., Finne-Wstrand A.: Bone regeneration and stem cells. *J. Cell. Mol. Med.*, 2011; 15: 718-746
- [5] Batouli S., Miura M., Brahim J., Tsutsui T.W., Fisher L.W., Gronthos S., Robey P.G., Shi S.: Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J. Dent. Res.*, 2003; 82: 976-981
- [6] Beltran S.R., Svoboda K.K., Kerns D.G., Sheth A., Prockop D.J.: Anti-inflammatory protein tumor necrosis factor- $\alpha$ -stimulated protein 6 (TSG-6) promotes early gingival wound healing: an *in vivo* study. *J. Periodontol.*, 2015; 86: 62-71
- [7] Bianco P., Robey P.G., Simmons P.J.: Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell.*, 2008; 2: 313-319
- [8] Bosshardt D.D., Stadlinger B., Terheyden H.: Cell-to-cell communication – periodontal regeneration. *Clin. Oral Implants Res.*, 2015; 26: 229-239
- [9] Catacchio I., Berardi S., Reale A., De Luisi A., Racanelli V., Vacca A., Ria R.: Evidence for bone marrow adult stem cell plasticity: properties, molecular mechanisms, negative aspects, and clinical applications of hematopoietic and mesenchymal stem cells transdifferentiation. *Stem Cells Int.*, 2013; 2013: 589139
- [10] Chen M., Su W., Lin X., Guo Z., Wang J., Zhang Q., Brand D., Ryffel B., Huang J., Liu Z., He X., Le A.D., Zheng S.G.: Adoptive transfer of human gingiva-derived mesenchymal stem cells ameliorates collagen-induced arthritis via suppression Th1 and Th17 and enhancement of regulatory T cell differentiation. *Arthritis Rheum.*, 2013; 65: 1181-1193
- [11] Choi J.K., Hwang H.I., Jang Y.J.: The efficiency of the *in vitro* osteo/dentinogenic differentiation of human dental pulp cells, periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. *Int. J. Mol. Med.*, 2015; 35: 161-168
- [12] Cordeiro M.M., Dong Z., Kaneko T., Zhang Z., Miyazawa M., Shi S., Smith A.J., Nör J.E.: Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J. Endod.*, 2008; 34: 962-969
- [13] Crisan M., Corselli M., Chen C.W., Péault B.: Multilineage stem cells in the adult: a perivascular legacy? *Organogenesis*, 2011; 7: 101-104
- [14] d'Aquino R., De Rosa A., Lanza V., Tirino V., Laino L., Graziano A., Desiderio V., Laino G., Papaccio G.: Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur. Cell Mater.*, 2009; 18: 75-83
- [15] d'Aquino R., Tirino V., Desiderio V., Studer M., De Angelis G.C., Laino L., De Rosa A., Di Nucci D., Martino S., Paino F., Sampaolesi M., Papaccio G.: Human neural crest-derived postnatal cells exhibit remarkable embryonic attributes either *in vitro* or *in vivo*. *Eur. Cell Mater.*, 2011; 21: 304-316
- [16] de Almeida F.M., Marques S.A., Ramalho B.S., Rodrigues R.F., Cadilhe D.V., Furtado D., Kerkis I., Pereira L.V., Rehen S.K., Martinez A.M.: Human dental pulp cells: a new source of cell therapy in a mouse model of compressive spinal cord injury. *J. Neurotrauma*. 2011; 28: 1939-1949
- [17] Ding G., Liu Y., An Y., Zhang C., Shi S., Wang W., Wang S.: Suppression of T cell proliferation by root apical papilla stem cells *in vitro*. *Cells Tissues Organs*, 2010; 191: 357-364
- [18] Ding G., Liu Y., Wang W., Wei F., Liu D., Fan Z., An Y., Zhang C., Wang S.: Allogeneic periodontal ligament stem cell therapy for periodontitis in swine. *Stem Cells*, 2010; 28: 1829-1838
- [19] Ding G., Niu J., Wei F.: Current understanding of orofacial tissue derived mesenchymal stem cells: an immunological perspective. *Histol. Histopathol.*, 2015; 30: 255-265
- [20] Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D.J., Horowitz E.: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006; 8: 315-317
- [21] Eleuterio E., Trubiani O., Sulpizio M., Di Giuseppe F., Pierdomenico L., Marchisio M., Giancola R., Giammaria G., Miscia S., Caputi S., Di Ilio C., Angelucci S.: Proteome of human stem cells from periodontal ligament and dental pulp. *PLoS One*, 2013; 8: e71101
- [22] El-Bialy T., Alhadlaq A., Wong B., Kucharski C.: Ultrasound effect on neural differentiation of gingival stem/progenitor cells. *Ann. Biomed. Eng.*, 2014; 42: 1406-1412
- [23] El-Sayed K.M., Paris S., Graetz C., Kassem N., Mekhemar M., Ungefroren H., Fändrich F., Dörfer C.: Isolation and characterisation of human gingival margin-derived STRO-1/MACs+ and MACs – cell populations. *Int. J. Oral Sci.*, 2015; 7: 80-88
- [24] Eslami A., Gallant-Behm C.L., Hart D.A., Wiebe C., Honardoust D., Gardner H., Häkkinen L., Larjava H.S.: Expression of integrin  $\alpha\beta 6$  and TGF- $\beta$  in scarless vs. scar-forming wound healing. *J. Histochem. Cytochem.*, 2009; 57: 543-557
- [25] Favzy El-Sayed K.M., Paris S., Becker S.T., Neuschl M., De Buhr W., Sälzer S., Wulff A., Elrefai M., Darhous M.S., El-Masry M., Wiltfang J., Dörfer C.E.: Periodontal regeneration employing gingival margin-derived stem/progenitor cells: an animal study. *J. Clin. Periodontol.*; 2012; 39: 861-870
- [26] Feng F., Akiyama K., Liu Y., Yamaza T., Wang T.M., Chen J.H., Wang B.B., Huang G.T., Wang S., Shi S.: Utility of PDL progenitors for *in vivo* tissue regeneration: a report of 3 cases. *Oral Dis.*, 2010; 16: 20-28
- [27] Ferré F.C., Larjava H., Loison-Robert L.S., Berbar T., Owen G.R., Berdal A., Chérifi H., Gogly B., Häkkinen L., Fournier B.P.: Formation of cartilage and synovial tissue by human gingival stem cells. *Stem Cells Dev.*, 2014; 23: 2895-2907
- [28] Ferretti C., Borsari V., Falconi M., Gigante A., Lazzarini R., Fini M., Di Primio R., Mattioli-Belmonte M.: Human periosteum-derived stem cells for tissue engineering applications: the role of VEGF. *Stem. Cell. Rev.*, 2012; 8: 882-890
- [29] Fournier B.P., Ferre F.C., Couty L., Lataillade J.J., Gourven M., Naveau A., Coulomb B., Lafont A., Gogly B.: Multipotent progenitor cells in gingival connective tissue. *Tissue Eng. Part A*, 2010; 16: 2891-2899
- [30] Galler K.M., D'Souza R.N., Federlin M., Cavender A.C., Hartgerink J.D., Hecker S., Schmalz G.: Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *J. Endod.*, 2011; 37: 1536-1541
- [31] Gandia C., Arminan A., Garcia-Verdugo J.M., Lledó E., Ruiz A., Miñana M.D., Sanchez-Torrijos J., Payá R., Mirabet V., Carbonell-Uberos F., Llop M., Montero J.A., Sepúlveda P.: Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells*, 2008; 26: 638-645
- [32] Gao Y., Zhao G., Li D., Chen X., Pang J., Ke J.: Isolation and multiple differentiation potential assessment of human gingival mesenchymal stem cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014; 15: 20982-20996

- [33] Ge S., Mroziak K.M., Menicanin D., Gronthos S., Bartold P.M.: Isolation and characterization of mesenchymal stem cell-like cells from healthy and inflamed gingival tissue: potential use for clinical therapy. *Regen. Med.*, 2012; 7: 819-832
- [34] Gomes J.A., Geraldes Monteiro B., Melo G.B., Smith R.L., Cavenaghi Pereira da Silva M., Lizier N.F., Kerkis A., Cerruti H., Kerkis I.: Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp stem cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2010; 51: 1408-1414
- [35] Govindasamy V., Ronald V.S., Abdullah A.N., Nathan K.R., Ab Aziz Z.A., Abdullah M., Musa S., Kasim N.H., Bhonde R.R.: Differentiation of dental pulp stem cells into islet-like aggregates. *J. Dent. Res.*, 2011; 90: 646-652
- [36] Gronthos S., Mankani M., Brahmi J., Robey P.G., Shi S.: Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 13625-13630
- [37] Guo W., Chen L., Gong K., Ding B., Duan Y., Jin Y.: Heterogeneous dental follicle cells and the regeneration of complex periodontal tissue. *Tissue Eng. Part A*, 2012; 18: 459-470
- [38] Han C., Yang Z., Zhou W., Jin F., Song Y., Wang Y., Huo N., Chen L., Qian H., Hou R., Duan Y., Jin Y.: Periapical follicle stem cell: a promising candidate for cementum/periodontal ligament regeneration and bio-root engineering. *Stem Cells Dev.*, 2010; 19: 1405-1414
- [39] Hilken P., Gervois P., Fanton Y., Vanormelingen J., Martens W., Struys T., Politis C., Lambrechts I., Bronckaers A.: Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Res.*, 2013; 353: 65-78
- [40] Huang G.T., Sonoyama W., Liu Y., Liu H., Wang S., Shi S.: The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J. Endod.*, 2008; 34: 645-651
- [41] Huang G.T., Yamaza T., Shea L.D., Djouad F., Kuhn N.Z., Tuan R.S., Shi S.: Stem/progenitor cell-mediated *de novo* regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an *in vivo* model. *Tissue Eng. Part A*, 2010; 16: 605-615
- [42] Iohara K., Murakami M., Takeuchi N., Osako Y., Ito M., Ishizaka R., Utunomiya S., Nakamura H., Matsushita K., Nakashima M.: A novel combinatorial therapy with pulp stem cells and granulocyte colony-stimulating factor for total pulp regeneration. *Stem Cells Transl. Med.*, 2013; 2: 521-533
- [43] Ishkitiev N., Calenic B., Aoyama I., Li H., Yaegaki K., Imai T.: Hydrogen sulfide increases hepatic differentiation in tooth-pulp stem cells. *J. Breath Res.*, 2012; 6: 017103
- [44] Ishkitiev N., Yaegaki K., Calenic B., Nakahara T., Ishikawa H., Mitiev V., Haapasalo M.: Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional features *in vitro*. *J. Endod.*, 2010; 36: 469-474
- [45] Ishkitiev N., Yaegaki K., Kozhuharova A., Tanaka T., Okada M., Mitev V., Fukuda M., Imai T.: Pancreatic differentiation of human dental pulp CD117<sup>+</sup> stem cells. *Regen. Med.*, 2013; 8: 597-612
- [46] Jamal M., Chogle S., Goodis H., Karam S.M.: Dental stem cells and their potential role in regenerative medicine. *J. Med. Sci.*, 2011; 4: 53-61
- [47] Jiang C.M., Liu J., Zhao J.Y., Xiao L., An S., Gou Y.C., Quan H.X., Cheng Q., Zhang Y.L., He W., Wang Y.T., Yu W.J., Huang Y.F., Yi Y.T., Chen Y., Wang J.: Effects of hypoxia on the immunomodulatory properties of human gingiva-derived mesenchymal stem cells. *J. Dent. Res.*, 2015; 94: 69-77
- [48] Jin S.H., Lee J.E., Yun J.H., Kim I., Ko Y., Park J.B.: Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells from gingival connective tissue. *J. Periodontol. Res.*, 2015; 50: 461-467
- [49] Kaltschmidt B., Kaltschmidt C., Widera D.: Adult craniofacial stem cells: sources and relation to the neural crest. *Stem Cell Rev.* 2012; 8: 658-671
- [50] Kawase T., Okuda K., Kogami H., Nakayama H., Nagata M., Sato T., Wolff L.F., Yoshie H.: Human periosteum-derived cells combined with superporous hydroxyapatite blocks used as an osteogenic bone substitute for periodontal regenerative therapy: an animal implantation study using nude mice. *J. Periodontol.*, 2010; 81: 420-427
- [51] Kerkis I., Ambrosio C.E., Kerkis A., Martins D.S., Zucconi E., Fonseca S.A., Cabral R.M., Maranduba C.M., Gaiad T.P., Morini A.C., Vieira N.M., Brolio M.P., Sant'Anna O.A., Migliano M.A., Zatz M.: Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: local or systemic. *J. Transl. Med.*, 2008; 6: 35
- [52] Kerkis I., Kerkis A., Dozortsev D., Stukart-Parsons G.C., Gomes Massironi S.M., Pereira L.V., Caplan A.I., Cerruti H.F.: Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs*, 2006; 184: 105-116
- [53] Khorsand A., Eslaminejad M.B., Arabsolghar M., Paknejad M., Ghaedi B., Rokn A.R., Moslemi N., Nazarian H., Jahangir S.: Autologous dental pulp stem cells in regeneration of defect created in canine periodontal tissue. *J. Oral Implantol.*, 2013; 39: 433-443
- [54] Király M., Kádár K., Horváthy D.B., Nardai P., Rác G.Z., Lacza Z., Varga G., Gerber G.: Integration of neuronally predifferentiated human dental pulp stem cells into rat brain *in vivo*. *Neurochem. Int.*, 2011; 59: 371-381
- [55] Kuçi S., Kuçi Z., Latifi-Pupovci H., Niethammer D., Handgretinger R., Schumm M., Bruchelt G., Bader P., Klingebiel T.: Adult stem cells as an alternative source of multipotential (pluripotential) cells in regenerative medicine. *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, 2009; 4: 107-117
- [56] Lee J.H., Lee D.S., Choung H.W., Shon W.J., Seo B.M., Lee E.H., Cho J.Y., Park J.C.: Odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells induced by preameloblast-derived factors. *Biomaterials*, 2011; 32: 9696-9706
- [57] Lee T.H., Kim W.T., Ryu C.J., Jang Y.J.: Optimization of treatment with recombinant FGF-2 for proliferation and differentiation of human dental stem cells, mesenchymal stem cells, and osteoblasts. *Biochem. Cell Biol.*, 2015; 93: 298-305
- [58] Li N., Liu N., Zhou J., Tang L., Ding B., Duan Y., Jin Y.: Inflammatory environment induces gingival tissue-specific mesenchymal stem cells to differentiate towards a pro-fibrotic phenotype. *Biol. Cell.*, 2013; 105: 261-275
- [59] Li Z., Jiang C.M., An S., Cheng Q., Huang Y.F., Wang Y.T., Gou Y.C., Xiao L., Yu W.J., Wang J.: Immunomodulatory properties of dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *Oral Dis.*, 2014; 20: 25-34
- [60] Liu D., Xu J., Liu O., Fan Z., Liu Y., Wang F., Ding G., Wei F., Zhang C., Wang S.: Mesenchymal stem cells derived from inflamed periodontal ligaments exhibit impaired immunomodulation. *J. Clin. Periodontol.*, 2012; 39: 1174-1182
- [61] Liu O., Xu J., Ding G., Liu D., Fan Z., Zhang C., Chen W., Ding Y., Tang Z., Wang S.: Periodontal ligament stem cells regulate B lymphocyte function via programmed cell death protein 1. *Stem Cells*, 2013; 31: 1371-1382
- [62] Marynka-Kalmani K., Treves S., Yafee M., Rachima H., Gafni Y., Cohen M.A., Pitaru S.: The lamina propria of adult human oral mucosa harbors a novel stem cell population. *Stem Cells*, 2010; 28: 984-995
- [63] Matsubara T., Suardita K., Ishii M., Sugiyama M., Igarashi A., Oda R., Nishimura M., Saito M., Nakagawa K., Yamanaka K., Miyazaki K., Shimizu M., Bhawal U.K., Tsuji K., Nakamura K. i wsp.: Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. *J. Bone Miner. Res.*, 2005; 20: 399-409
- [64] Mead B., Logan A., Berry M., Leadbeater W., Scheven B.A.: Intravitreally transplanted dental pulp stem cells promote neuroprotection and axon regeneration of retinal ganglion cells after optic nerve injury. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2013; 54: 7544-7556

- [65] Mitrano T, Grob M.S., Carrión F., Nova-Lamperti E., Luz P.A., Fierro F.S., Quintero A., Chaparro A., Sanz A.: Culture and characterization of mesenchymal stem cells from human gingival tissue. *J. Periodontol.*, 2010; 81: 917-925
- [66] Miura M., Gronthos S., Zhao M., Lu B., Fisher L.W., Robey P.G., Shi S.: SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 5807-5812
- [67] Morszczek C., Götz W., Schierholz J., Zeilhofer F., Kühn U., Möhl C., Sippel C., Hoffmann K.H.: Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.*, 2005; 24: 155-165
- [68] Morszczek C., Völlner F., Saugspier M., Brandl C., Reichert T.E., Driemel O., Schmalz G.: Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation in vitro. *Clin. Oral Investig.*, 2010; 14: 433-440
- [69] Moshaverinia A., Chen C., Xu X., Akiyama K., Ansari S., Zadeh H.H., Shi S.: Bone regeneration potential of stem cells derived from periodontal ligament or gingival tissue sources encapsulated in RGD-modified alginate scaffold. *Tissue Eng. Part A*, 2014; 20: 611-621
- [70] Moshaverinia A., Xu X., Chen C., Akiyama K., Snead M.L., Shi S.: Dental mesenchymal stem cells encapsulated in an alginate hydrogel co-delivery microencapsulation system for cartilage regeneration. *Acta Biomater.*, 2013; 9: 9343-9350
- [71] Murakami M., Horibe H., Iohara K., Hayashi Y., Osako Y., Takei Y., Nakata K., Motoyama N., Kurita K., Nakashima M.: The use of granulocyte-colony stimulating factor induced mobilization for isolation of dental pulp stem cells with high regenerative potential. *Biomaterials*, 2013; 34: 9036-9047
- [72] Nozaki T., Ohura K.: Regulation of miRNA during direct reprogramming of dental pulp cells to insulin-producing cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2014; 444: 195-198
- [73] Okada M., Ishkitiev N., Yaegaki K., Imai T., Tanaka T., Fukuda M., Ono S., Haapasalo M.: Hydrogen sulfide increases hepatic differentiation of human tooth-pulp stem cells compared with human bone-marrow stem cells. *Int. Endod. J.*, 2014; 47: 1142-1150
- [74] Pierdomenico L., Bonsi L., Calvitti M., Rondelli D., Arpinati M., Chirumbolo G., Becchetti E., Marchionni C., Alviano F., Fossati V., Staffolani N., Franchina M., Grossi A., Bagnara G.P.: Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation*, 2005; 80: 836-842
- [75] Rizk A., Rabie A.B.: Human dental pulp stem cells expressing transforming growth factor  $\beta$ 3 transgene for cartilage-like tissue engineering. *Cytotherapy*, 2013; 15: 712-725
- [76] Sakai K., Yamamoto A., Matsubara K., Nakamura S., Naruse M., Yamagata M., Sakamoto K., Tauchi R., Wakao N., Imagama S., Hibi H., Kadomatsu K., Ishiguro N., Ueda M.: Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *J. Clin. Invest.*, 2012; 122: 80-90
- [77] Samee M., Kasugai S., Kondo H., Ohya K., Shimokawa H., Kuroda S.: Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) transfection to human periosteal cells enhances osteoblasts differentiation and bone formation. *J. Pharmacol. Sci.*, 2008; 108: 18-31
- [78] Seo B.M., Miura M., Gronthos S., Bartold P.M., Batouli S., Brahimi J., Young M., Robey P.G., Wang C.Y., Shi S.: Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 2004; 364: 149-155
- [79] Seo B.M., Sonoyama W., Yamaza T., Coppe C., Kikuri T., Akiyama K., Lee J.S., Shi S.: SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Dis.*, 2008; 14: 428-434
- [80] Song M., Kim H., Choi Y., Kim K., Chung C.: Skeletal myogenic differentiation of human periodontal ligament stromal cells isolated from orthodontically extracted premolars. *Korean J. Orthod.*, 2012; 42: 249-254
- [81] Sonoyama W., Liu Y., Fang D., Yamaza T., Seo B.M., Zhang C., Liu H., Gronthos S., Wang C.Y., Wang S., Shi S.: Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One*, 2006; 1: e79
- [82] Sonoyama W., Liu Y., Yamaza T., Tuan R.S., Wang S., Shi S., Huang G.T.: Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J. Endod.*, 2008; 34: 166-171
- [83] Stevens A., Zuliani T., Olejnik C., LeRoy H., Obriot H., Kerr-Conte J., Formstecher P., Bailliez Y., Polakowska R.R.: Human dental pulp stem cells differentiate into neural crest - derived melanocytes and have label-retaining and sphere-forming abilities. *Stem Cells Dev.*, 2008; 17: 1175-1184
- [84] Su W.R., Zhang Q.Z., Shi S.H., Nguyen A.L., Le A.D.: Human gingiva-derived mesenchymal stromal cells attenuate contact hypersensitivity via prostaglandin E2-dependent mechanisms. *Stem Cells*, 2011; 29: 1849-1860
- [85] Taghipour Z., Karbalaie K., Kiani A., Niapour A., Bahramian H., Nasr-Esfahani M.H., Baharvand H.: Transplantation of undifferentiated and induced human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells promote functional recovery of rat spinal cord contusion injury model. *Stem Cells Dev.*, 2012; 21: 1794-1802
- [86] Tamaki Y., Nakahara T., Ishikawa H., Sato S.: In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow. *Odontology*, 2013; 101: 121-132
- [87] Tang L., Li N., Xie H., Jin Y.: Characterization of mesenchymal stem cells from human normal and hyperplastic gingiva. *J. Cell Physiol.*, 2011; 226: 832-842
- [88] Tomar G.B., Srivastava R.K., Gupta N., Barhanpurkar A.P., Pote S.T., Jhaveri H.M., Mishra G.C., Wani M.R.: Human gingiva-derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010; 393: 377-383
- [89] Tomic S., Djokic J., Vasilijic S., Vučević D., Todorovic V., Supić G., Colić M.: Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from dental pulp and dental follicle are susceptible to activation by toll-like receptor agonists. *Stem Cells Dev.*, 2011; 20: 695-708
- [90] Tuan R.S., Boland G., Tuli R.: Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res. Ther.*, 2003; 5: 32-45
- [91] Wada N., Micanin D., Shi S., Bartold P.M., Gronthos S.: Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. *J. Cell Physiol.*, 2009; 219: 667-676
- [92] Wang F., Yu M., Yan X., Wen Y., Zeng Q., Yue W., Yang P., Pei X.: Gingiva-derived mesenchymal stem cell-mediated therapeutic approach for bone tissue regeneration. *Stem Cells Dev.*, 2011; 20: 2093-2102
- [93] Wang J., Wang X., Sun Z., Wang X., Yang H., Shi S., Wang S.: Stem cells from human-exfoliated deciduous teeth can differentiate into dopaminergic neuron-like cells. *Stem Cells Dev.*, 2010; 19: 1375-1383
- [94] Wang J., Wei X., Ling J., Huang Y., Gong Q., Huo Y.: Identification and characterization of side population cells from adult human dental pulp after ischemic culture. *J. Endod.*, 2012; 38: 1489-1497
- [95] Wei F., Qu C., Song T., Ding G., Fan Z., Liu D., Liu Y., Zhang C., Shi S., Wang S.: Vitamin C treatment promotes mesenchymal stem cell sheet formation and tissue regeneration by elevating telomerase activity. *J. Cell Physiol.*, 2012; 227: 3216-3224
- [96] Wei F., Song T., Ding G., Xu J., Liu Y., Liu D., Fan Z., Zhang C., Shi S., Wang S.: Functional tooth restoration by allogenic mesenchymal stem cell-based bio-root regeneration in swine. *Stem Cells Dev.*, 2013; 22: 1752-1762
- [97] Wu S.M., Chiu H.C., Chin Y.T., Lin H.Y., Chiang C.Y., Tu H.P., Fu M.M., Fu E.: Effects of enamel matrix derivative on the proliferation and osteogenic differentiation of human gingival mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.*, 2014; 5: 52

- [98] Xia L., Peng R., Leng W., Jia R., Zeng X., Yang X., Fan M.: TRAIL-expressing gingival-derived mesenchymal stem cells inhibit tumorigenesis of tongue squamous cell carcinoma. *J. Dent. Res.*, 2015; 94: 219-228
- [99] Xiao L., Tsutsui T.: Characterization of human dental pulp cells-derived spheroids in serum-free medium: stem cells in the core. *J. Cell. Biochem.*, 2013; 114: 2624-2636
- [100] Xu Q.C., Wang Z.G., Ji Q.X., Yu X.B., Xu X.Y., Yuan C.Q., Deng J., Yang P.S.: Systematically transplanted human gingiva-derived mesenchymal stem cells contributing to bone tissue regeneration. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2014; 7: 4922-4929
- [101] Xu X., Chen C., Akiyama K., Chai Y., Le A.D., Wang Z., Shi S.: Gingivae contain neural-crest – and mesoderm-derived mesenchymal stem cells. *J. Dent. Res.*, 2013; 92: 825-832
- [102] Yamagata M., Yamamoto A., Kako E., Kaneko N., Matsubara K., Sakai K., Sawamoto K., Ueda M.: Human dental pulp-derived stem cells protect against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice. *Stroke*, 2013; 44: 551-554
- [103] Yamaza T., Kentaro A., Chen C., Liu Y., Shi Y., Gronthos S., Wang S., Shi S.: Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Res. Ther.*, 2010; 1: 5
- [104] Yang B., Chen G., Li J., Zou Q., Xie D., Chen Y., Wang H., Zheng X., Long J., Tang W., Guo W., Tian W.: Tooth root regeneration using dental follicle cell-sheets in combination with a dentin matrix-based scaffold. *Biomaterials*, 2012; 33: 2449-2461
- [105] Yang H., Gao L.N., An Y., Hu C.H., Jin F., Zhou J., Jin Y., Chen F.M.: Comparison of mesenchymal stem cells derived from gingival tissue and periodontal ligament in different incubation conditions. *Biomaterials*, 2013; 34: 7033-7047
- [106] Yang R., Chen M., Lee C.H., Yoon R., Lal S., Mao J.J.: Clones of ectopic stem cells in the regeneration of muscle defects *in vivo*. *PLoS One*, 2010; 5: e13547
- [107] Yu X., Ge S., Chen S., Xu Q., Zhang J., Guo H., Yang P.: Human gingiva-derived mesenchymal stromal cells contribute to periodontal regeneration in beagle dogs. *Cells Tissues Organs*, 2013; 198: 428-437
- [108] Zhang L., Ye J.S., Decot V., Stoltz J.F., De Isla N.: Research on stem cells as candidates to be differentiated into hepatocytes. *Biomed. Mater. Eng.*, 2012; 22: 105-111
- [109] Zhang Q., Nguyen A.L., Shi S., Hill C., Wilder-Smith P., Krasieva T.B., Le A.D.: Three-dimensional spheroid culture of human gingiva-derived mesenchymal stem cells enhances mitigation of chemotherapy-induced oral mucositis. *Stem Cells Dev.*, 2012; 21: 937-947
- [110] Zhang Q., Shi S., Liu Y., Uyanne J., Shi Y., Shi S., Le A.D.: Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J. Immunol.*, 2009; 183: 7787-7798
- [111] Zhang Q.Z., Su W.R., Shi S.H., Wilder-Smith P., Xiang A.P., Wong A., Nguyen A.L., Kwon C.W., Le A.D.: Human gingiva-derived mesenchymal stem cells elicit polarization of m2 macrophages and enhance cutaneous wound healing. *Stem Cells*, 2010; 28: 1856-1868
- [112] Zhang W., Walboomers X.F., Van Kuppevelt T.H., Daamen W.F., Van Damme P.A., Bian Z., Jansen J.A.: *In vivo* evaluation of human dental pulp stem cells differentiated towards multiple lineages. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 2008; 2: 117-125
- [113] Zhao Y., Wang L., Jin Y., Shi S.: Fas ligand regulates the immunomodulatory properties of dental pulp stem cells. *J. Dent. Res.*, 2012; 91: 948-954
- [114] Zorin V.L., Komlev V.S., Zorina A.I., Khromova N.V., Solovieva E.V., Fedotov A.Y., Eremin I.I., Kopnin P.B.: Octacalcium phosphate ceramics combined with gingiva-derived stromal cells for engineered functional bone grafts. *Biomed. Mater.*, 2014; 9: 055005

Autor deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.