KOMÓRKI MACIERZYSTE WIĘZADŁA OZĘBNOWEGO – KROK BLIŻEJ W KIERUNKU ROZWIKŁANIA TAJEMNICY REGENERACJI TKANEK PRZYZĘBIA, CZYLI CO JUŻ WIEMY I NA JAKIE PYTANIA NALEŻY JESZCZE ODPOWIEDZIEĆ

PERIODONTAL LIGAMENT STEM CELLS – ONE STEP CLOSER TO SOLVE A RIDDLE OF PERIODONTAL TISSUE REGENERATION, WHAT WE ALREADY KNOW AND WHAT QUESTIONS REMAIN UNANSWERED

Bartłomiej GÓRSKI

Zakład Chorób Błony Śluzowej i Przyzębia, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie: Całkowita regeneracja biologiczna i funkcjonalna tkanek przyzębia nie jest dzisiaj w pełni osiągalna, dlatego w centrum uwagi znajduje się potencjalne użycie w tym celu komórek macierzystych. Komórki macierzyste więzadła ozębnowego (hPDLSC) mają cechy takie jak samoodnawianie, zdolność do nieograniczonej ilości podziałów i do różnicowania oraz charakter immunomodulacyjny. Cechy te są podobne (lub nawet większe) do właściwości mezenchymatycznych komórek macierzystych szpiku kostnego, jednak sposób ich izolacji jest mniej obciążający dla pacjenta. Komórki te mają unikalną zdolność do różnicowania w kierunku cementoblastów i odtwarzania zmineralizowanego cementu korzeniowego, jak też do fibroblastów i produkcji włókien kolagenowych o wysoko zorganizowanej, trójwymiarowej strukturze. Znany schemat izolacji, hodowli i identyfikacji komórek macierzystych więzadła ozębnowego czyni je najlepszym źródłem materiału nie tylko do badań naukowych, ale także do zastosowania w klinice w terapii komórkowej i bioinżynierii tkankowej. Jednak pewne aspekty biologiczne, technologiczne i kliniczne ciągle wymagają rozwiązania. Celem pracy jest charakterystyka komórek macierzystych więzadła ozębnowego, ze szczególnym uwzględnieniem ich potencjału różnicowania do komórek charakterystycznych fenotypowo dla danej dojrzałej tkanki podczas stosowania właściwej stymulacji. Na podstawie przeglądu piśmiennictwa przedstawiono najnowsze wyniki badań, które pozwolą na lepsze zrozumienie biologii tych komórek oraz możliwości ich wykorzystania dla celów stomatologicznych i ogólnomedycznych w przyszłości.

Słowa kluczowe: komórka mezenchymatyczna, komórki macierzyste więzadła ozębnowego, regeneracja przyzębia, różnicowanie

Summary: Many different techniques for periodontal treatment have been failed to result in successful tissue regeneration, thus to overcome this limitation, tissue regeneration using stem cells is now being studied. Periodontal ligament stem cells present stem cell characteristics, including self-renewal, proliferative, multilineage differentiation and immunomodulatory capabilities that are similar (or even greater) to those of bone marrow mesenchymal stem cells, but can be obtained using less invasive methods. They also possess a particular potential to differentiate into cementoblastst producing mineral cementum-like tissues and fibroblasts that form three-dimensional fibrous connective tissues. A solid protocol for the isolation, culture and characterisation of periodontal ligament stem cells is on hand, rendering this the most promising candidates not only for basic research, but also for clinical application in cell-based therapies and tissue bioengineering. However, various biological, technical and clinical hindrances remain to be addressed. The aim of this article is to assess the extraction and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells and to evaluate their ability to differentiate into distinct cell types when grown under certain conditions. We here provide a thorough and extensive review about new findings in this field and discuss how these cells are supposed a good perspective of future in the clinical dentistry and general medicine.

Key words: differentiation, mesenchymal cell, periodontal ligament stem cells, periodontal regeneration

Wykaz stosowanych skrótów: 5-Aza – 5-aza-2'-deoksycytydyna; AB – błękit alcjański; ACAN – agrekan; ALP – fosfataza zasadowa; APSCs – komórki macierzyste wierzchołkowej części brodawki zębowej; BMP – białko morfogenetyczne kości (BMP-2, BMP-6, BMP-7); BMMSCs – mezenchymtyczne komórki macierzyste szpiku kostnego; BMSCs – komórki macierzyste szpiku; BSP- kostna sialoproteina; CD cząsteczki – CD antygeny, CD markery; CFU-Fs – komórki fibroblastyczne zdolne do tworzenia kolonii; Col I – kolagen typu I; ConA – konkanawalina; CT – pożywka kondycjonowana; DFSCs – komórki macierzyste woreczka zębowego; DMP1 – białko matrycy zębiny 1; DPSCs – komórki macierzyste miazgi zębów stałych; EGF – epidermalny czynnik wzrostu; ERR α – związany z estrogenem receptor α; ESCs – embrionalne komórki macierzyste; FBS – płodowa surowica cielęca; FGF-2 – czynnik wzrostu fibroblastów 2; GAG – glikozaminoglikany; G-CSF – czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów; GMSCs – mezenchymatyczne komórki macierzyste dziąsła, GTR – sterowana regeneracja tkanek; HA/TCP-hydroksyapatyt/ fosforan trójwapniowy; HGF – czynnik wzrostu hepatocytów; hPDLSCs – ludzkie komórki macierzyste więzadła ozębnowego; IDO – 2,3-dioksygenaza indoleaminy; IFN-γ – interferon γ; ihPDLSCs – komórki macierzyste zapalnie zmienionŁego więzadła ozębnowego; IL-1β – interleukina 1β; iPSCs – indukowane komórki pluripotencjalne; α-MEM – podłoże α-MEM; MHC – główny układ zgodności tkankowej; MLR – mieszana reakcja limfocytów; MMP2 – metaloproteinaza matrycy zewnątrzkomórkowej 2; MSCs – mezenchymatyczne komórki macierzyste; NF-200 – neurofilament 200; NF-κB – czynnik jądrowy κB; OCN – osteokalcyna; OPN – osteopontyna; PBMNCs – komórki jednojądrzaste krwi obwodowej; PD-1 – białko programowanej śmieci komórki 1; PDL – więzadło ozębnowe; PDLSC-Ips – komórki macierzyste zapalnie zmienionego więzadła ozębnowego; PDLSCs – komórki macierzyste więzadła ozębnowego; PDT – czas podwojenia; PGE2- prostaglandyna 2; PGFs – polipeptydowe czynniki wzrostu; PL – lizat płytkowy; PPARγ – receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów γ; PRP – osocze bogatopłytkowe; RT-PCR – rekacja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkryptazą; SCAP – komórki macierzyste wierzchołkowej części brodawki zębowej; TGF-β1 – transformujący czynnik wzrostu β1; TGF-β3 – transformujący czynnik wzrostu β3; TNF-α – czynnik martwicy nowotworu α.

WSTĘP

Choroby przyzębia należą do grupy chorób społecznych, są szeroko rozpowszechnione w populacji ludzkiej i stanowią duże wyzwanie dla systemów opieki zdrowotnej, o czym świadczą przeprowadzone w 2012 roku badania epidemiologiczne, które objęły losowo wybranych dorosłych Polaków [27]. Zapalenie przyzębia (periodontitis) rozwija się w wyniku zakłócenia równowagi pomiędzy oddziaływującymi na tkanki przyzębia drobnoustrojami płytki nazębnej, a mechanizmami obronnymi gospodarza. Celem leczenia zapalenia przyzębia jest zatrzymanie progresji zmian, mechaniczna i chemiczna kontrola czynnika infekcyjnego i regeneracja utraconych struktur tkankowych (więzadła ozębnowego, cementu korzeniowego, kości wyrostka zębodołowego, tkanki łącznej dziąsła). Kluczowe jest także odtworzenie prawidłowych połączeń pomiędzy odbudowanymi elementami tkankowymi, w szczególności włókien Sherpey'a które łączą włókna ozębnej z cementem korzeniowym (ang. *cementum-ligament-bone interfaces*). Profil gojenia (reparacja/ regeneracja) jest determinowany przez typ komórek, które jako pierwsze uzyskają dostęp do ubytku kostnego w procesie nazywanym „wyścigiem komórkowym", dlatego stosowane współcześnie leczenie periodontologiczne bazuje na technikach sterowanej regeneracji tkanek – GTR (ang. *Guided Tissue Regeneration*). Niestety GTR wciąż ma wiele ograniczeń i nie umożliwia całkowitego odtworzenia utraconych tkanek przyzębia, co zostało potwierdzone badaniami histologicznymi i jest szeroko omówione w literaturze tematu [19, 22, 46, 48, 67, 88].

Inżynieria tkankowa jest dyscypliną, która łączy ze sobą implementowane komórki progenitorowe, polipeptydowe czynniki wzrostu – PGFs (ang. *Polypeptide Growth Factors*) oraz rusztowanie podtrzymujące, i znajduje się w centrum dużego zainteresowania jej potencjalnego zastosowania w opracowaniu bardziej przewidywalnych i skutecznych metod leczenia chorób przyzębia [6, 7, 32, 79, 96]. Największe nadzieje wiąże się obecnie z mezenchymatycznymi komórkami macierzystymi o właściwościach multipotencjalnych, które są jednymi z najdokładniej przebadanych komórek ludzkich. Komórki te mają jednocześnie trzy cechy: zdolność przylegania do podłoża (ang. *plastic adherence*), obecność specyficznych antygenów na powierzchni błon komórkowych i zdolność do różnicowania się w kierunku co najmniej trzech linii komórkowych (osteoblastów, adipocytów, chondroblastów) [17]. Poza tym, 95% populacji macierzystych komórek mezenchymalnych charakteryzuje się obecnością cząsteczek: CD105, CD73 i CD90 oraz mniej niż 2% tej populacji może mieć epitopy: CD45, CD34, CD14 lub CD11b, CD79α lub CD19 i HLA klasy II.

Mezenchymtyczne komórki macierzyste były izolowane z różnych narządów i układów, jednak ich pozyskanie jest najprostsze i najmniej obciążające z miazgi zębów (mlecznych i stałych) i z tkanek okołozębowych (dziąsło, ozębna, kość wyrostka zębodołowego, brodawka zębowa, woreczek zębowy) [1, 14, 34, 45, 61, 64, 83, 86, 92]. W tak dużej i zróżnicowanej puli komórek wydaje się, że komórki pochodzące z ozębnej zajmują szczególne miejsce i prezentują swoiste właściwości. Duże zainteresowanie właśnie tą pulą, zainicjowało wiele badań naukowych, których wyniki zostały opublikowane w latach 2012-2013, co rzuciło nowe światło na postrzeganie komórek macierzystych ozębnej, doprowadzając tym samy do lepszego zrozumienia ich biologii. Celem pracy jest charakterystyka ludzkich multipotencjalnych komórek macierzystych więzadła ozębnowego – hPDLSCs (ang. *human Periodontal Ligament Stem Cells*), z uwzględnieniem możliwości dotyczących ich izolacji i hodowli, próba ich porównania z innymi mezenchymatycznymi komórkami macierzystymi, wskazanie potencjalnych możliwości użycia, jak również ciągle obecnych trudności związanych z biotechnologią tych linii, na podstawie przeglądu najnowszego piśmiennictwa. Postęp naukowy i techniczny w tym zakresie jest bardzo duży, zwłaszcza na przestrzeni ostatnich 3-4 lat, i jeśli tempo badań będzie takie jak dotychczas możliwe, że terapia przy użyciu hPDLSCs pozwoli w przyszłości przezwyciężyć „słabe strony" sterowanej regeneracji tkanek i tym bardziej uzasadniony wydaje się przegląd najnowszych badań naukowych w tym zakresie.

MOŻLIWOŚCI POZYSKANIA PDLSCS

Ozębna wypełnia przestrzeń między blaszką zbitą zębodołu a cementem korzeni zęba i zawiera włókna kolagenowe, które tworzą więzadło ozębnowe – PDL (ang. *Periodontal Ligament*) utrzymujące zęby w zębodołach. W ozębnej znajduje się pewna pula komórek macierzystych o właściwościach multipotencjalnych, mogących różnicować się w kierunku osteoblastów, fibroblastów i cementolastów, a tym samym brać udział w regeneracji uszkodzonych tkanek przyzębia. Komórki te po raz pierwszy wyizolowano z powierzchni korzeni usuniętych dolnych zębów trzonowych trzecich w 2004 roku i nazwano komórkami macierzystymi więzadła ozębnowego (PDLSCs) [75]. Źródłem tych komórek są także ściany kostne zębodołów po ekstrakcji, jak również powierzchnie korzeni zębów mlecznych [76, 91]. Najnowsze badania wskazują także na możliwość izolacji aktywnych PDLSCs z zapalnie zmienionych tkanek ozębnej (u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia) [65]. Singhatanadgit i wsp. [77] wyprowadzili klony komórek macierzystych więzadła ozębnowego.

CHARAKTERYSTYKA PDLSCS: ANTYGENY CD, ZDOLNOŚĆ TWORZENIA HODOWLI, POTENCJAŁ WZROSTOWY I PROLIFERACYJNY

Cząsteczki powierzchniowe obecne na błonach komórkowych PDLSCs aktywują specyficzne kaskady ekspresji genów charakterystycznych dla tkanki mezenchymalnej: STRO-1 (ang. *putative stem cell marker*), STRO-3 (ang. *tissue nonspecific ALP*), CD13, CD29 (ang. *integrin-1*), CD 44 (ang. *hyaluronic acid receptor*), CD73, CD90 (Thy-1), CD105 (ang. *endoglin*), CD106 (ang. *vascular cell adhesion molecule-1*), CD146 (ang. *perivascular cell marker*), CD166 (ang. *activated leukocyte cell adhesion molecule*) [14, 34, 44, 65, 68, 82, 97]. PDLSCs wykazują także wysoką ekspresję markerów: (OCT)-4 (ang. *Octamer-binding transcription factor*), (SSEA)-1 (ang. *stage-specific embryonic antigen*), (SSEA)-4, Nanog, Sox2, które są czynnikami transkrypcyjnymi biorącymi udział w utrzymaniu pluripotencjalnego potencjału embrionalnych komórek macierzystych- ESCs (ang. *Embryonic Stem Cells*) i indukowanych komórek pluripotencjalnych- iPSCs (ang. *induced Pluripotent Stem Cells*) [14, 68, 82]. Klony hPDLSCs charakteryzuje także zwiększona ekspresja ICAM1 (ang. *Intercellular Adhesion Molecule 1*), ITGB1 (ang. *Integrin B1*) i TERT (ang. *Telomerase Reverse Transcriptase*) [81]. Do oznaczenia wybranych epitopów prezentowanych na powierzchni komórek, a tym samym do określenie tożsamości tych komórek wykorzystuje się cytometrię przepływową (ang. *flow cytometry*). Xu i wsp. [93] wykazali, że w puli komórek ozębnej komórki STRO-1+/CD146+ stanowią 2,6% (max=7,15%, min=0,13%; n=6). Jednak według Hidaka i wsp. [31] odsetek tych komórek jest mniejsza i wynosi zaledwie 0,07+-0,08%. Inna grupa badaczy zaobserwowała, że odsetek komórek STRO-1+ i CD146+ w ozębnej jest zależny od wieku i jest wyższy u ludzi młodych (ok. 15 roku życia) wynosząc odpowiednio 18,5+-2,6% i 26,8+-2,4%, w porównaniu do starszych pacjentów (ok. 54 roku życia), u których wynosi on analogicznie 3,15+-1,3% i 4,3+-1,8% [97].

Podobnie, jak inne komórki mezenchymatyczne pochodzące z: miazgi zębów stałych – DPSCs (ang. *Dental Pulp Stem Cells*), z wierzchołkowej części brodawki zębowej – APSCs (ang. *Apical Papilla Stem Cells*) /SCAP – (ang. *Stem Cells from Apical Papilla*), z mieszka zębowego – DFSCs (ang *Dental Follicle Stem Cells)*, jak też komórki macierzyste szpiku – BMSCs (ang. *Bone Marrow Stem Cells*), PDLSCs prezentują specyficzne epitopy komórek mezenchymatycznych: CD44, CD90 i CD105, nie posiadając receptorów charakterystycznych dla komórek siateczkowo-śróbłonkowych: CD14 i CD34 [82]. Dokładna analiza immunofenotypowa tej puli komórek jest niezwykle ważna w celu rozszyfrowania i zrozumienia ich programu genetycznego, dlatego takie próby są nieustannie podejmowane. Badania naukowe wykazały, że DPSCS charakteryzuje większa

ekspresja epitopów: CD13, CD166, (SSEA)-4 i niższa ekspresja markera CD9 w porównaniu z PDLSCs [68]. Charakterystykę wybranych mezenchymatycznych komórek macierzystych przedstawiono w tab. 1.

TABELA 1. Charakterystyka wybranych komórek macierzystych – markery powierzchowne, zdolność tworzenia hodowli – jednostki tworzące kolonie komórek fibroblastycznych (CFU-Fs) – objaśnienia pod tabelą, potencjał wzrostowy i proliferacyjny – czas podwojenia populacji komórek (PDT)
TABLE 1. Characteristics of selected stem cells – cell surface markers, colony forming abilities Colony-Forming

Rodzaj komórek macierzystych	**Markery powierzchowne**	**Zdolność tworzenia kolonii (CFU-Fs)**	**Potencjał wzrostowy i proliferacyjny – PDT**	**Literatura**
PDLSCs	CD9, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166, STRO-1, STRO-3	102+-24* 12,9+-0,6%** 152,8+-27,6***	28,1*	Chen i wsp. 2013 [8], Choi i wsp. 2013[12], Ge i wsp. 2013 [24], Hakki i wsp. 2013 [30], Iwata i wsp. 2010 [34], Kim i wsp. 2012 [42], Kim i wsp. 2012 [44], Liu i wsp. 2013 [52], Park i wsp. 2011 [65], Ponnaiyan i wsp. 2012 [68], Tamaki i wsp. 2013 [82], Wada i wsp. 2009 [90], Yang i wsp. 2013 [95], Zhang i wsp. 2012 [97]
DPSCs	CD13, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166	84+-12*	28,8*	Ponnaiyan i wsp. 2012 [68], Tamaki i wsp. 2013 [82], Wada i wsp. 2009 [82]
APSCs	CD44, CD73, CD90, CD105, STRO-1	140+-21*	28,0*	Chen i wsp. 2013 [8], Tamaki i wsp. 2013 [82]
DFSCs	CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, STRO-3	151+-26*	27,7*	Tamaki i wsp. 2013 [82]
GMSCs	CD29, CD73, CD90, CD105, CD146, STRO-1	23,5+-3,2**	+	Yang i wsp. 2013 [95]
BMSCs	CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, STRO-1, STRO-3	+	32,7*	Iwata i wsp. 2010 [34], Tamaki i wsp. 2013 [82], Wada i wsp. 2009 [90]

* Tamaki i wsp. 2013 [82], CFU-Fs: $1x10^4$ komórek wysiewano na płytkę 100-mm i inkubowano przez 14 dni, jako kolonie traktowano skupiska ≥50 komórek; ** Yang i wsp. 2013 [95], CFU-Fs: $1x10^3$ komórek wysiewano na płytkę 10 cm i inkubowano przez 14 dni, kolonie traktowano skupiska ≥50 komórek; *** Kim i wsp. 2012 [44], CFU-Fs: $1x10^4$ komórek wysiewano na płytkę 100-mm i inkubowano przez 7 dni, kolonie traktowano skupiska ≥50 komórek.

Pozyskanie i izolacja komórek PDLSCs możliwe są przy pomocy znanej i potwierdzonej w wielu badaniach naukowych metody dezagregacji enzymatycznej z wykorzystaniem kolagenazy typu I i dyspazy (ang. *collagenase/dispase-catalyzed enzymatic digestion*) [34, 44, 65, 77, 82, 97]. Komórki te są jednak pozyskiwane w relatywnie małej ilości i szybko tracą potencjał wzrostowy i proliferacyjny, w związku z czym, ich hodowla w laboratorium jest procesem wieloetapowym [58]. Linie komórkowe PDLSCs pozwalają na pozyskanie pojedynczych fibroblastycznych komórek zdolnych do tworzenia hodowli – CFU-Fs (ang. *Colony-Forming Unit Fibroblasts*). W mikroskopie świetlnym komórki te mają wydłużony kształt z centralnie zlokalizowanym jądrem komórkowym i przypominają mezenchymatyczne komórki macierzyste szpiku kostnego – BMMSCs (ang. *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*). Tamaki i wsp. [82] porównali zdolność do tworzenia kolonii (ang. c*olony forming ability*) DPSCs, PDLSCs, APSCs i DFSCs i po 14 dniach zaobserwowali, że największą i statystycznie istotną zdolność wykazują komórki pochodzące z wierzchołkowej części brodawki zębowej i z woreczka zębowego (liczba kolonii wynosiła odpowiednio: dla DPSCs 84+-12, dla PDLSCs 102+-24, dla APSCs 140+-21, dla DFSC 151+-26). Może to być wytłumaczone tym, że DFSCs i APSCs pochodzą z rozwijających się tkanek, a tym samym znajdują się we wczesnej fazie zróżnicowania komórkowego. Najnowsze badanie Chen i wsp. [8] także wykazło, że PDLSCs mają mniejszą zdolność do tworzenia kolonii w porównani z APSCs. Yang i wsp. [95] porównali zdolność do tworzenia kolonii PDLSCs i mezenchymatycznych komórek macierzystych pochodzących z dziąsła – GMSCs (ang. *Gingival Mesenchymal Stem Cells*). Właściwości GMSCs przewyższały pod tym względem PDLSCs (CFU-Fs po 14 dniach wyniosło odpowiednio 23,5+-3,2% i 12,9+-0,6%, p<0,001).

Badania naukowe wykazały, że komórki macierzyste pochodzące z tkanek zębowych i okołozębowych mają wyższy potencjał wzrostowy i proliferacyjny (ang. *proliferative capacity*) niż komórki macierzyste szpiku, na co wskazują różnice w czasach podwojenia – PDT (ang. *Population Doubling Time*) w badaniu Tamaki i wsp. [82]. PDT dla komórek macierzystych pochodzenia zębowego wyniósł od 27,7 do 28,8 godzin (DFSCs: 28,8hrs, APSCs: 28,1hrs, PDLSCs: 28,0hrs, DPSCs: 27,7hrs), natomiast w przypadku BMSCs był równy 32,7 godzin. Według Chen i wsp. [8] PDLSCs mają mniejsze zdolności proliferacyjne niż APSCs. Najnowsze badanie Yang i wsp. [95] porównujące właściwości PDLSCs i GMSCs wykazało większy potencjał proilferacyjny komórek macierzystych pochodzących z dziąsła w porównaniu z PDLSCs. Wraz z wiekiem potencjał wzrostowy i proliferacyjny PDLSCs zmniejsza się [97, 99].

W badaniu Tamaki i wsp. [29] ponad 30% komórek: DPSCs, PDLSCs, DFSCs i APSCs znajdowało się w fazie G2/M cyklu komórkowego, w porównaniu z 20% BMSCs (p<0,05). Z drugiej strony około 60% BMSCs było w fazie G0/G1, w porównaniu z <50% DPSCs, PDLSCs, DFSCs i APSCs [82]. Wyniki te świadczą o tym, że większa liczba komórek macierzystych o zębowym rodowodzie była w trakcie podziałów komórkowych, w porównaniu z komórkami macierzystymi pochodzenia

szpikowego, wśród których dominowały komórki będące w fazie spoczynkowej cyklu. Ta sama grupa badaczy wykazała, że kariotyp komórek macierzystych po rozplemie ex vivo pozostał niezmieniony (2n=46), co świadczy o ich stabilności chromosomalnej [82].

Jak wspomniano wcześniej, PDLSCs w warunkach in vitro stosunkowo szybko tracą potencjał wzrostowy, co utrudnia otrzymanie wystarczającej liczby komórek, dlatego podejmowane są próby odnalezienia czynników wzrostu, które wpływałyby na pobudzenie tego procesu. Hidaka i wsp. [31] wykazali, że stymulacja hodowli przy użyciu czynnika wzrostu fibroblastów 2 – FGF-2 (ang. *Fibroblast Growth Factor 2*) zwiększa potencjał proliferacyjny macierzystych komórek więzadeł przyzębia, dzięki czemu pozwala uzyskać ich większą liczbę, nie wpływając na potencjał różnicowania. Dodatek 20 ng/ml FGF-2 pozwolił na osiągnięcie 15-krotnie większej liczby komórek STRO-1+, CD146+, STRO-1+/CD146+ po 10 dniach hodowli (odpowiednio 1,58+-1,81%, 1,84%+-2,00%, 0,43+-0,64%) w porównaniu z linią bez dodania FGF-2 (odpowiednio 0,13+-0,14%, 0,07+-0,07%, liczba komórek STRO-1+/CD146+ była poniżej poziomu czułości).

W dalszym ciągu trwają poszukiwania najbardziej odpowiedniej pożywki dla hodowli PDLSCs. Najnowsze doniesienia wskazują na podłoże α-MEM (ang. *α Minimum Essential Medium*) jako podłoże z wyboru [37]. Jako dodatek zawierający niezbędne do hodowli białka i czynniki wzrostu powszechnie stosowana jest płodowa surowica bydlęca – FBS (ang. *Fetal Bovine Serum*), co nie jest obojętne w przypadku hodowli komórkowych, ze względu na ryzyko możliwości przeniesienia patogenów (wirusy, priony). Jako preparaty alternatywne dla FBS podaje się PRP (ang. *Platelet Rich Plasma*, osocze bogatopłytkowe) lub PL (ang. *Platelet Lysate*, lizat płytkowy). W tej sytuacji kluczową do rozwiązania kwestią jest dokładne określenie wpływu PL na potencjał wzrostowy i proliferacyjny PDLSCs oraz udoskonalenie innych metod hodowli, które nie wykorzystują surowic zwierzęcych [4, 26, 85]. Wypracowanie optymalnego i jednocześnie bezpiecznego z biologicznego punktu widzenia protokołu procesu technologicznego jest kwestią najwyższej wagi, przed rozpoczęciem badań na próbie ludzkiej.

OKREŚLENIE POTENCJAŁU RÓŻNICOWANIA PDLSCS I EKSPRESJI WYBRANYCH GENÓW

Komórki macierzyste więzadeł przyzębia hodowane w warunkach standardowych (pożywka α-MEM) wykazują wysoką ekspresję markerów specyficznych dla przyzębia brzeżnego: PLAP-1 (ang. *Periodontal Ligament-Associated Protein 1*), S100A4 i scleraxis, w porównaniu z komórkami macierzystymi szpiku (w badaniu Hidaka i ws. [31] BMMSCs wykazywały bardziej nasiloną ekspresję periostyny) [8, 31]. PLAP-1 hamuje BMP-2 (ang. *Bone Marrow Protein*, białko morfogene-

tyczne kości), a tym samym wpływa na utrzymanie przestrzeni ozębnej poprzez supresję różnicownia progenitorowych komórek ozębnej w kierunku osteoblastów [94]. Periostyna uczestniczy w dojrzewaniu i utrzymaniu homeostazy PDL, podczas gdy S100A4 wydaje się być regulatorem negatywnym procesu mineralizacji [39, 62]. Obok markerów przyzębia, PDLSCs prezentują także ekspresję specyficznych markerów komórek mezenchymalnych: wimentyny, komórek tkanki kostnej: kolagenu typu I (Col I), osteokalcyny (OCN), Runx2 (ang. *Runt-related gene 2*), tkanki nerwowej: nestyny, βIII-tubuliny, NF-200 (ang. *Neurofilament 200*), naczyń krwionośnych: CD34 (ang. *vascular endothelial cell marker*), kalponiny (ang. *vascular smooth muscle cell marker*) [8, 31, 82]. W celu określenia poziomu ekspresji genów oraz analizy struktury mRNA wykorzystuje się reakcję łańcuchową polimerazy z odwrotną transkryptazą – RT-PCR (ang. *Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction*).

Warunki prowadzenia hodowli komórkowych poprzez wykorzystanie odpowiedniej stymulacji, powodują różnicowanie PDLSCs w różne linie komórkowe, co służy do oceny potencjału różnicowania (ang. *multilineage differentiation capability*), co zostało przedstawione w tab. 2. Celem indukcji różnicowania w kierunku tkanki kostnej (ang. *osteogenic induction*) jako dodatki stosuje się: deksametazon, β-glicerofosforan i kwas 2-fosforanowo-L-askorbinowy [8, 31, 34, 44, 65, 78, 82, 95]. Barwienie materiału biologicznego po 3 tygodniach alizaryną pozwala na detekcję zewnątrzkomórkowych ognisk mineralizacji (ang. *mineralized nodules*), co świadczy o promineralizacyjnym potencjale komórek. Zmienia się także morfologia stymulowanych PDLSCs, które przybierają kształt gwiaździsty i nieregularny, tworzą skupiska i charakteryzuje je wzrost warstwowy (na początku hodowli komórki charakteryzuje wzrost konfluentny) [8]. Potencjał promineralizacyjny komórek określa się także oceniając obecność fosfatazy zasadowej – ALP (ang. *Alkaline Phosphatase*) oraz poindukcyjny poziom ekspresji markerów specyficznych dla tkanki kostnej (OCN, Runx2, COL1, BSP – ang. *Bone Sialoprotein*). Ekspresja ALP jest największa w początkowych etapach mineralizacji, natomiast OCN jest markerem końcowych faz różnicowania osteoblastów [11, 29]. Indukcję osteogeniczną wykazują także inne komórki macierzyste: BMSCs, DSCs, APSCs, DFSCs [8, 82, 95]. Chen i wsp. [8] wykazali, że indukowane APSCs charakteryzuje silniejsza ekspresja ALP, BSP i OCN i większy potencjał promineralizacyjny niż PDLSCs. Z drugiej strony, PDLSCs mają większy potencjał różnicowania w kierunku tanki kostnej niż GMSCs [95].

Zhang i wsp. [97] udowodnili, że potencjał osteogeniczny PDLSCs maleje wraz z wiekiem organizmu. W innym badaniu zaobserwowano, że zmiany o charakterze zapalnym w środowisku hodowli komórek, indukowane przez dodanie czynnika martwicy nowotworu TNF-α (ang. *Tumor Necrosis Factor A*) i interleukiny 1β- IL-1β wpływały w sposób znaczący na zmniejszenie potencjału proosteogenicznego PDLSCs, poprzez spowolnienie tworzenia ognisk mineralizacji i spadek ekspresji ALP,

OCN, Runx2, COL1 [95]. Co ciekawe, obecność TNF-α i IL-1β spowodowała podobną inhibicję GMSCs, która nie była tak silna jak w przypadku PDLSCs. Pomimo niekorzystnych warunków środowiskowych, obie grupy komórek zachowały potencjał różnicowania w kierunku tkanki kostnej.

TABELA 2. Kierunki różnicowania PDLSCs, czynniki indukcyjne, ekspresja specyficznych markerów
TABLE 2. Multilineage differentiation capability of PDLSCs, inductive factors, expression of specific markers

Kierunek różnicowania PDLSCs	Czynniki indukcyjne	Ekspresja markerów	Literatura
osteogeniczne	deksametazon, β-glicerofosforan, kwas 2-fosforanowo-L-a-skorbinowy, białko morfogenetyczne kości 2 – BMP-2, białko morfogenetyczne kości 6 – BMP-6, białko morfogenetyczne kości 7 – BMP-7, białko matrycy zębiny 1 – DMP1	fosfataza zasadowa -ALP, kolagen typu I – Col I, osteokalcyna – OCN, kostna sialoproteina – BSP, Runx2	Chandrasekaran i wsp. 2013 [3], Chen i wsp. 2013 [8], Hakki i wsp. 2013 [30], Iwata i wsp. 2010 [34], Kim i wsp. 2012 [44], Tamaki i wsp. 2013 [82], Yang i wsp. 2013 [95]
adipogeniczne	indometacyna, hydrokortyzon, izobutylometylksantyna	receptor aktywowany przez proliferatory receptorów peroksysomów γ – PPARγ, białko adipocytarne 2	Iwata i wsp. 2010 [34], Kim i wsp. 2012 [44], Tamaki i wsp. 2013 [82], Yang i wsp. 2013 [95]
chondrogeniczne	czynnik martwicy nowotworu β1 – TGF-β1, czynnik martwicy nowotworu β3 – TGF-β3 białko morfogenetyczne kości 6- BMP-6	agrekan – ACAN, kolagen typu II – COL II, SOX9	Choi i wsp. 2013 [59], Iwata i wsp. 2010 [34], Kim i wsp. 2012 [44], Yang i wsp. 2013 [12]
neurogeniczne	witamina B12, epidermalny czynnik wzrostu – EGF, czynnik wzrostu fibroblastów – b-FGF, ITS, merkaptofenol β – β-BME	nestyna, βIII-tubulina, NF-200	Hakki i wsp. 2013 [30], Tamaki i wsp. 2013 [82]
miogeniczne	5-aza-2'-deoksycytydyna-5-Aza	desmina, troponina T, FZDZ	Martinez i wsp. 2013 [57], Song i wsp. 2012 [78]
cementogeniczne	nośnik hydroksyapatyt/ fosforan trójwapniowy- HA/TCP*, Bio-Oss®**	fosfataza zasadowa-ALP, kolagen typu I – Col I, osteokalcyna – OCN, ostepontyna – OPN, Runx2, kolagen typu III – Col III	Iwata i wsp. 2010 [34], Kim i wsp. 2009 [43], Kim i wsp. 2012 [45], Park i wsp. 2011 [65], Tsumanuma i wsp. 2011 [87], Zhang i wsp. 2012 [97]

*Iwata i wsp. 2010 [34], **Kim i wsp. 2012 [45]

Ciągle podejmowane są próby mające na celu zwiększenie potencjału osteogenicznego PDLSCs, które polegają na ocenie wpływu różnych warunków hodowli i suplementów, co zostało dogłębnie omówione w przeglądach systematycznych [41, 47]. Wyniki najnowszych badań wskazują na możliwość zastosowania w tym celu, co najmniej kilku grup czynników wzrostu. Czynnikami wzrostu o silnych właściwościach regulujących formowanie kości poprzez stymulowanie ekspresji specyficznych genów są białka morfogenetyczne (BMPs) [18, 38, 42, 69]. Hakki i wsp. [30] porównując wpływ BMP-2, BMP-6, BMP-7 na hodowle PDLSCs zaobserwowali, że wszystkie białka zwiększają potencjał proliferacyjny, potencjał do różnicowania w kierunku osteoblastów, ekspresję transkryptów markerów tkanki kostnej (Runx2, COLI, BSP) i mineralizację, w stopniu zależnym od stężenia (ang. *dose-dependent manner*). Najlepsze właściwości promineralizacyjne wykazało białko BMP-6. Inną molekułą, która stymuluje różnicowanie PDLSCs in vitro w kierunku tkanki kostnej okazało się być białko matrycy zębiny 1- DMP1 (ang. *Dentin Matrix Protein 1*) [3]. DMP1 poprzez indukcję kinazy białkowej aktywowanej w odpowiedzi na mitogeny wpływa na wzrost ekspresji genów: metaloproteinazy matrycy zewnątrzkomórkowej 2 – MMP2 (ang. *Metalloproteinase-2*), ALP, transformującego czynnika wzrostu β1 – TGF-β1 (ang. *Transforming Growth Factor B1*), przyśpieszając tworzenie ognisk mineralizacji. Cai i wsp. [2] wykazali, że jądrowy receptor sierocy związany z estrogenami receptora α- ERRα (ang. *Estrogen-Related Receptor A*) jest sprzężony z procesami indukcji osteogenicznej, a jego ekspresja rośnie na końcowych szczeblach różnicowania PDLSCs w kierunku tkanki kostnej. Transfekcja zrekombinowanego miRNA przeniesionego przez lentiwirusa prowadziła do zmniejszenia ekspresji ALP, OCN, Runx2, osteoponyny – OPN (ang. *Osteopontin*), a tym samym do obniżenia potencjału promineralizacyjnego PDLSCs. Chen i wsp. [5] udowodnili, że transfekcja lentiwirusowa NELL1 (ang. *NEL-Like protein 1*) również może promować różnicowanie PDLSCs w kierunku osteoblastów, poprzez hamowanie ekspresji Msx2. NELL1 jest nowo odkrytym białkiem związanym z kraniosynostozą, które promuje różnicowanie komórek mezenchymatycznych w kierunku tkanki kostnej.

Gdy jako dodatki stosuje się indometacynę, hydrokortyzon i izobutylometylksantynę PDLSCs różnicują się w kierunku adipocytów (ang. *adipogenic induction*) [31, 34, 44, 65, 82, 78, 95]. Obecność kropli tłuszczu w cytoplazmie komórek można potwierdzić po 3 tygodniach hodowli stosując czerwień oleistą O (ang. *Oil red-O*). Stymulowane komórki charakteryzuje też wysoka ekspresja receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów γ – PPARγ (ang. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Γ*) i ekspresja białka adipocytarnego 2 (ang. *adipocyte protein 2*) [65, 95]. Podobne właściwości wykazują też BMSCs, DSCs, APSCs, DFSCs, GMSCs [8, 82, 95]. Zhang i wsp. [97] udowodnili, że potencjał PDLSCs do różnicowania w kierunku tkanki tłuszczowej maleje wraz z wiekiem organizmu. Yang i wsp. [95] wykazali, że środowisko hodowli zawierające TNF-α i IL-1β powoduje zmniejszenie potencjału adipogenicznego.

Pod wpływem odpowiedniej stymulacji (TGF-β3 i BMP-6) PDLSCs ulegają różnicowaniu w kierunku tkanki chrzęstnej (ang. *chondrogenic induction*) [12, 34, 37, 44, 78]. Wymienione czynniki wzrostu promują inicjację chondrogenezy, a w dalszej kolejności w sposób bezpośredni i pośredni regulują różnicowanie i dojrzewanie chondrocytów [84, 70]. Po 14 dniach hodowli zmienia się morfologia komórek, które układają się w dwie warstwy: wewnętrzną (komórki o kształcie okrągłym) i zewnetrzną (komórki o kształcie wrzecionowatym). Barwienie immunochistochemiczne pozwala uwidocznić kolagen typu II. Pod wpływem TGF-β3 i BMP-6 komórki zaczynają także odkładać glikozaminoglikany (siarczan chondroityny, agrekan- ACAN), których identyfikacja jest możliwe przy użyciu błękitu alcjańskiego – AB (ang. *Alcian Blue*) [78]. Dodatek TGF-β3 zwiększał syntezę glikozaminoglikanów – GAG (ang. *Glycosaminoglycans*) o 217%, podczas gdy dodatek BMP-6 o 220% (w porównaniu do hodowli kontrolnej) [12]. Czynniki wykazały efekt synergistyczny i pobudzały syntezę GAG, zwiększając ją o 281% [12]. RT-PCR potwierdziło ekspresję specyficznych markerów tkanki chrzęstnej: SOX9, agrekanu i kolagenu typu II przez indukowane PDLSCs. W tym przypadku połączenie TGF-β3 i BMP-6 także miało efekt synergistyczny (zwiększając ekspresję SOX9 3,97 razy, agrekanu 7,50 razy i kolagenu typu II 23,15 razy) [12]. SOX9 wydaje się odgrywać kluczową rolę w procesie chondrogenezy, ponieważ wpływa na ekspresję innych genów regulatorowych tego procesu: SOX5, SOX6, kolagenu typu II α1 [60]. Choi i wsp. [12] wykazali też, że podłoże zawierające TGF-β3 i BMP zwiększa ekspresję pewnych markerów specyficznych dla osteogenezy: kolagenu typu X i Runx2. PDLSCs wykazały większy potencjał różnicowania w kierunku tkanki chrzęstnej niż GMSCs [95].

Indukcję różnicowania w kierunku tkanki nerwowej (ang. *neurogenic induction*) powoduje dodatek: witaminy B12, epidermalnego czynnika wzrostu – EGF (ang. *Epidermal Growth Factor*), fibroblastycznego czynnika wzrostu – b-FGF (ang. *Basic Fibroblast Growth Factor*) i ITS (ang. *Insulin-Transferrin-sodium-Selenite supplement*) [82]. Po 7 dniach indukcji Tamaki i wsp. [82] zaobserwowali w hodowli PDLSCs w badaniu immunocytochemicznym obecność markerów specyficznych dla komórek tkanki nerwowej (nestyna, βIII-tubulina, NF-200), oraz zmianę morfologii komórek wrzecionowatych w kierunku komórek multipolarnych, przypominających neurony. Tożsame właściwości posiadały tez inne komórki macierzyste: DPSCs, APSCs, DFSCs, BMSCs [82].

Badania naukowe wykazały możliwość indukcji komórek macierzystych miazgi zębów myszy w kierunku tkanki mięśniowej przez dodatek 5-aza-2'-deoksycytydyny – 5-Aza (ang. *5-Aza-2'-deoxycytidine*) [60]. 5-Aza powoduje demetylacje fragmentów DNA, które kodują specyficzne dla tkanki mięśniowej czynniki transkrypcyjne [84]. Song i wsp. [78] udowodnili, że taka indukcja jest możliwa dla ludzkich komórek zrębu więzadła ozębnowego (ang. *PDL stromal cells*), które spełniają wymagania stawiane mezenchymatycznym komórkom macierzystym [17].

TABELA 3. Potencjał różnicowania wybranych komórek macierzystych
TABLE 3. Multilineage differentiation capabilities of selected stem cells

Kierunek różnicowania	PDLSCs	DPSCs	APSCs	DFSCs	GMSCs	BMSCs	Literatura
osteogeniczne	+ ~60% kolonii* >ekspresja ALP, COL1, OCN, Runx2 niż GMSCs***	+	+ >ekspresja ALP, OCN, BSP niż PDLSCs**	+	+	+ ~80% kolonii*	Chandrasekaran i wsp. 2013 [3], Chen i wsp. 2013 [8], Ge i wsp. 2013 [24], Hakki i wsp. 2013 [30], Iwata i wsp. 2010 [34], Kim i wsp. 2012 [44], Park i wsp. 2011 [65], Tamaki i wsp. 2013 [82], Wada i wsp. 2009 [90], Yang i wsp. 2013 [95], Zhang i wsp. 2012 [97]
adipogeniczne	+ ~30% kolonii* >ekspresja PPARγ niż GMSCs***	+	+	+	+	+ ~85% kolonii*	Hakki i wsp. 2013 [30], Iwata i wsp. 2010 [34], Kim i wsp. 2012 [44], Park i wsp. 2011 [65], Tamaki i wsp. 2013 [82], Wada i wsp. 2009 [90], Yang i wsp. 2013 [95], Zhang i wsp. 2012 [97]
chondrogeniczne	+ ~2% kolonii* >ekspresja ACAN, COLII niż GMSCs***	+			+	+ ~30% kolonii*	Choi i wsp. 2013 [12], Hakki i wsp. 2013 [30], Iwata i wsp. 2010 [34], Kim i wsp. 2012 [44], Yang i wsp. 2013 [95],
neurogeniczne	+	+	+	+		+	Hakki i wsp. 2013 [30], Tamaki i wsp. 2012 [82], Tsumanuma i wsp. 2011 [87]
miogeniczne	+	+				+	Martinez i wsp. 2013 [57], Nakatsuka i wsp. 2010 [62], Song i wsp. 2012 [46], Tsumanuma i wsp. 2011 [87]
cementogeniczne	+ 14,37+- 4,38μm****	+	+			+ 7,80+- 2,67μm****	Chung i wsp. 2011 [13], Iwata i wsp. 2010 [34], Kim i wsp. 2012 [42], Kim i wsp. 2009 [43], Li i wsp. 2009 [49], Park i wsp. 2011 [65], Tsumanuma i wsp. 2011 [87], Zhang i wsp. 2012

* Iwata i wsp. 2010 [34], ** Chen i wsp. 2013 [8],*** Yang i wsp. 2013 [95], ****Tsumanuma i wsp. 2011 [87]

Po 28 dniach hodowli zmieniła się morfologia stymulowanych komórek, a w ich cytoplazmie można było zaobserwować struktury przypominające miotubule i ekspresję desminy. Indukcja PDLSCs w kierunku tkanki mięśniowej także jest możliwa. Potencjał różnicowania wybranych komórek macierzystych przedstawiono w tab. 3.

WŁAŚCIWOŚCI IMMUNOMODULACYJNE PDLSCS

Użycie wszczepów autologicznych komórek macierzystych wyklucza wystąpienie reakcji immunologicznej biorcy. W przypadku komórek allogenicznych takie ryzyko jest realne i może prowadzić do reakcji odrzucenia przeszczepu. Kluczową rolę w tych interakcjach odgrywa główny układ zgodności tkankowej- MHC (ang. *Major Histocompatibility Complex*). Badania naukowe ostatniej dekady, na modelach in vitro i in vivo dowodzą, że BMSCs mają właściwości immunomodulacyjne i mogą wyciszać odpowiedź immunologiczną układu odpornościowego. Mechanizmy molekularne tych procesów są złożone i jedynie częściowo zrozumiałe [36, 80, 98]. To, że PDLSCs wykazują podobne cechy potwierdzono stosunkowo niedawno.

Wada i wsp. [90] postanowili zbadać właściwości immunomodulacyjne komórek macierzystych więzadła ozębnowego stosując w tym celu krwinki jednojądrzaste krwi obwodowej – PBMNCs (ang. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) po nieswoistym pobudzeniu konkanawaliną ConA (ang. *ConA-stimulated PBMNCs)*. PDLSCs inhibowały proliferację PBMNCs w odpowiedzi na stymulację mitogenną i mieszaną reakcję limfocytów – MLR (ang. *Mixed Lymphocyte Reaction*). Autorzy wykazali wzmożoną ekspresję interferonu γ- IFN-γ przez indukowane PBMNCs (co świadczyło o aktywacji tych komórek), która stymulowała PDLSCs do uwalniania molekuł hamujących proliferację PBMNCs na drodze sprzężenia zwrotnego, takich jak: TGF-β1, czynnik wzrostu hepatocytów – HGF (ang. *hepatocyte growth factor*), 2,3-dioksygenaza indoleaminy – IDO. Dodatkowo, pożywki kondycjonowane – CT (ang. *Conditioned Medium*) otrzymane z hodowli PDLSCs w środowisku IFN-γ powodowały częściową supresję proliferacji PBMNCs. Badacze wykazali, że ekspresja IDO jest zależna od IFN-γ, w przeciwieństwie do ekspresji TGF-β1 i HGF, które wydają się być związane z innymi peptydami sygnałowymi. Tożsame właściwości prezentowały także BMSCs i DPSCs.

PDLSCs w kulturze z limfocytami B hamowały proliferację, różnicowanie i migrację komórek odpornościowych (podobnie jak BMSCs) [53]. Proliferacja komórek B była hamowana poprzez białko PD-1 (ang. *Programmed cell Death protein 1*) i jego interakcję z ligandem PD-L1. Białko PD-1 jest inhibitorem TCR-zależnej proliferacji limfocytów, poprzez hamowanie cyklu komórkowego. Pod względem molekularnym proces ten przebiega nieco inaczej w przypadku komórek macierzy-

stych szpiku, mianowicie BMSCs wywołują supresję limfocytów B poprzez interakcję białka PD-1 z ligandem PD-L1 i PD-L2. W badaniu Liu i wsp. [53] zmniejszona była również produkcja immunoglobulin: IgM, IgG, IgA. Ponieważ PDLSCs nie obniżały ekspresji HLA-DR, CD40, CD80 i CD86, tym samym niezmienione pozostały zdolności prezentowania antygenów przez limfocyty B. PDLSCs uwalniały także Il-6, dzięki czemu hamowały apoptozę limfocytów. W dalszej części badania autorzy wszczepiali autogenne i allogenne PDLSCs na nośniku HA/TCP (hydroksyapatyt/fosforan trójwapniowy) w wypreparowane ubytki kostne w przyzębiu świnek morskich, a następnie oceniali immunologiczną rekację humoralną, nie obserwując reakcji odrzucenia. W obu grupach poziom ekspresji markerów specyficznych dla aktywowanych limfocytów B – CD20, CD 25 był porównywalny. W podobnym badaniu na modelu zwierzęcym, Ding i wsp. [15] nie zaobserwowali, aby allogeniczne implanty PDLSCs wywoływały wzmożoną reakcję zapalną limfocytów T. Charakter immunomodulacyjny PDLSCs objawiał się produkcją prostaglandyny E2- PGE2 (ang. *Prostaglandin E2*), która indukowała anergię komórek T.

W 2011 roku Park i wsp. [65] wyhodowali PDLSCs z zapalnie zmienionych tkanek więzadła ozębnowego (ihPDLSCs) wykazując, że komórki te mają zachowany potencjał proliferacyjny, migracyjny i zdolność do różnicowania w kierunku tkanki kostnej i tłuszczowej. Chen i wsp. [9] udowodnili, że indukcja osteogeniczna PDSCs pochodzących z zapalnie zmienionych tkanek jest związana z czynnikiem jądrowym κB – NF-κB (ang. *Nuclear Factor-Kb*), rzucając nowe światło na zrozumienie tego procesu. In vitro na modelu zwierzęcym ihPDLSCs wytwarzały cement korzeniowy, ale komórki macierzyste więzadła ozębnowego pochodzące z tkanek wolnych od stanu zapalnego wykazały statystycznie większe zdolności regeneracyjne. Najnowsze doniesienia wskazują na upośledzone właściwości immunomodulacyjne ihPDLSCs (komórki te w tym badaniu nazwano PDLSC-IPs) [52]. PDLSC-IPs w niewielkim stopniu hamowały proliferację limfocytów T i wykazywały również mniejszy potencjał ochronny w stosunku do przyzębia, który wyrażał się obniżoną stymulacją limfocytów pomocniczych CD4+CD25+FOXP3+ (limfocyty Tregs) i produkcją Il-10, jak również zmniejszoną stymulacja limfocytów Th1 i uwalnianiem IFN-γ, w porównaniu z PDLSCs. Limfocyty Th17 produkują Il-17, która poprzez indukcję ekspresji RANKL prowadzi do aktywacji osteoblastów. W cytowanym badaniu PDLSC-IPs cechowała obniżona supresja limfocytów Th17 w porównaniu z PDLSCs. Wyniki te świadczą o zaburzonych właściwościach immunomodulacyjnych i upośledzonej kontroli procesów osteolitycznych zachodzących w przyzębiu przez komórki macierzyste pochodzące z zapalnie zmienionej ozębnej [23, 51, 74].

Właściwości immunomodulujące komórek macierzystych miazgi zębów i tkanek okołozębowych zostały bardzo dokładnie opisane przez Li i wsp. [50] w 2013 roku.

POTENCJALNE WYKORZYSTANIE I PRZYSZŁOŚĆ PDLSCS W STEROWANEJ REGENERACJI TKANEK

Poza wcześniej opisanymi zdolnościami multipotencjalnymi do różnicowania w kierunku tkanki kostnej, tłuszczowej, chrzęstnej, nerwowej i mięśniowej, PDLSCs różnicują się także w kierunku komórek wytwarzających cement korzeniowy, co zostało wykazane na modelach zwierzęcych [34, 45, 65, 95, 97]. Doświadczenia te polegały na podskórnej implantacji myszom poddanym immunosupresji (ang. *immunocompromised mice*) PDLSCs zawieszonych na nośniku, którego funkcję spełniały materiały o właściwościach osteokondukcyjnych, najczęściej były to cząsteczki hydroksyapatytu/ fosforanu trójwapniowego- HA/TCP. Wydaje się, że różnicowanie PDLSCs determinowane było przez użyty materiał wszczepowy. Po 8 tygodniach implantowane komórki wytwarzały zmineralizowaną tkankę podobną do komórkowego cementu korzeniowego, która formowała się na powierzchni materiału wszczepowego. W powiększeniu mikroskopu polaryzacyjnego można było również zaobserwować liczne, ułożone równolegle włókna kolagenowe o wyraźnie zaznaczonej strukturze przestrzennej, a także włókna Sharpey'a, co świadczyło o formowaniu się więzadła ozębnowego. Badanie immunohistochemiczne wykazało obecność w preparatach komórek hMito+, co potwierdziło duży potencjał regeneracyjny implantowanych PDLSCs. Jest to o tyle istotne, że PDLSCs różnicowały się jednocześnie w kierunku cementoblastów, jak też fibroblastów, które brały udział w syntezie kolagenowych włókien więzadła ozębnowego, dzięki czemu tworzyły strukturę trójwymiarową (3D). Dokładny profil tego procesu, z podziałem na cztery fazy, został opisany przez Kima i wsp. [45] w 2012 roku. W pierwszej fazie (3-7 dzień) PDLSCs proliferowały i migrowały w obrębie materiału wszczepowego. W drugiej fazie (2 tydzień) uwidaczniała się tkanka cementopodobna i wysoko zorganizowane włókna kolagenowe. W 4 tygodniu (faza 3) następowała mineralizacja i dojrzewanie cementu oraz różnicowanie włókien Sharpey'a. W ostatniej fazie (8 tydzień) tkanki wykazywały duże zróżnicowanie histologiczne. Różnicujące się komórki charakteryzowała silna ekspresja markerów kości/cementu: ALP, Runx2, OCN, OPN, Col I, Col III. Należy zaznaczyć, że na modelu zwierzęcym in vivo tworzący się cement był cementem komórkowym obcowłóknistym, podczas gdy cement korzeniowy zębów ludzkich składa się głównie z cementu bezkomórkowego obcowłóknistego i komórkowego z włóknami mieszanymi. Badania naukowe wykazały, że komórki macierzyste szpiku kostnego także mogą różnicować się w kierunku cementoblastów [13, 43, 49, 78, 87].

Badania na modelach zwierzęcych potwierdziły duży potencjał regeneracyjny implantów komórkowych autologicznych PDLSCs w leczeniu ubytków kostnych w przyzębiu, który był wyższy niż innych, stosowanych w tym celu komórek macierzystych [15, 35, 43, 54, 63, 66, 87]. Również badanie na modelu ludzkim (n=3) z wykorzystaniem komórek progenitorowych więzadła ozębnowego (ang. *PDL*

progenitors) pozwoliło uzyskać dobre wyniki kliniczne [20]. Jednak możliwości zastosowania PDLSCs nie ograniczają się tylko do leczenia periodontologicznego i szeroko rozumianego biologicznego leczenia stomatologicznego. Ze względu na bardzo duży potencjał proliferacyjny tych komórek mogą być one wykorzystane w innych dziedzinach medycyny, na przykład w ortopedii, reumatologii, immunologii, neurologii, a nawet w regeneracji uszkodzonych włókien mięśniowych serca i zastawek [12, 56, 57, 78, 80, 82, 98]. Obecnie prowadzone są bardzo intensywne badania, mające na celu opracowanie optymalnego sposobu transferu rozmnożonych w warunkach ex vivo PDLSCs, do ubytków kostnych przyzębia biorcy. Analizie podlegają zarówno drogi i sposoby transferu tzw. implantów komórkowych, jak też materiały spełniające rolę potencjalnych nośników rusztowań podtrzymujących, które poza funkcją matrycy, mogłyby także uczestniczyć w sterowaniu procesów proliferacyjnych i różnicowania komórek macierzystych, chociażby dzięki zawartości czynników wzrostu i różnych polipeptydów sygnałowych [24, 25, 28, 40, 59, 72, 73, 87, 89, 100].

W obliczu opisanych właściwości regeneracyjnych PDLSCs na licznych modelach in vivo i in vitro u zwierząt, kolejnym etapem badań będzie ich przeniesienie na model ludzki. Aby można było mówić o pełnym bezpieczeństwie prób klinicznych, pewne krytyczne kwestie muszą zostać wcześniej rozwiązane. Poza już wspomnianymi trudnościami laboratoryjnymi i technicznymi, bioinżynieria PDLSCs stwarza także problemy natury etycznej, jak również ekonomicznej. Przeniesieniem wyników badań naukowych na próby kliniczne, zajmuje się nauka zwana medycyną translacyjną, która w ostatnim czasie zyskała wysoką rangę dyscypliny w pełni autonomicznej [10, 55, 71]. O tym, ze leczenie regeneracyjne z użyciem mezenchymatycznych komórek macierzystych – MSCs (ang. *Mesenchymal Stem Cells*) wychodzi z obszaru science-fiction świadczą wyniki badania opublikowane przez Martinez i wsp. [33]. Autorzy uzyskali całkowitą regenerację miazgi i kompleksu miazgowo-zębinowego w zębach z zakończonym rozwojem korzeni na modelu autologicznym u psów, gdy w miejsce utraconej tkanki implantowane były DPSCs wraz z czynniki stymulującym wzrost kolonii granulocytów – G-CSF (ang. *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*), a obecnie prowadzą badania na próbie ludzkiej.

Zebrane w niniejszym opracowaniu dowody naukowe pozwalają na lepsze zrozumienie biologii i immunologii komórek macierzystych więzadła ozębnowego, wskazując na ich ogromny potencjał, co stanowi niezwykle ciekawy i obiecujący nurt badań. Rozmnożone w warunkach ex vivo komórki macierzyste wyizolowane z miazgi zębów i z tkanek okołozębowych mogą być poddane krioprezerwacji (kriokonserwacji) bez utraty właściwości proliferacyjnych i różnicowania, co może umożliwić powstanie dobrze rozwiniętego systemu banków komórek, które mogłyby być wykorzystane w inżynierii tkankowej i biomedycynie na szeroką skalę [16]. Koniecznością będzie stworzenie także dużych, wieloośrodkowych instytutów badawczych, które zajmą się procesami biotechnologicznymi komórek macierzystych. Tylko czas pokaże, czy tak właśnie będą wyglądać stomatologia i medycyna przyszłości [96].

LITERATURA

[1] Alongi DJ, Yamaza T, Song Y, Fouad AF, Romberg EE, Shi S, Tuan RS, Huang GT. Stem/progenitor cells from inflamed dental pulp retain tissue regeneration potential. Regen Med 2010; **5**: 617-631.

[2] Cai C, Yuan GJ, Huang Y, Yang N, Chen X, Wen L, Wang X, Zhang L, Ding Y. Estrogen-related receptor α is involved in the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human periodontal ligament. Int J Mol Med 2013; **31**: 1195-1201.

[3] Chandrasekaran S, Ramachandran A, Eapen A, George A. Stimulation of periodontal ligament stem cells by dentin matric protein 1 activated mitogen-activated protein kinase and osteoblast differentiation. J Periodontol 2013; **84**: 389-395.

[4] Chen B, Sun HH, Wang HG, Kong H, Chen FM, Yu Q. The effects of human platelet lysate on dental pulp stem cells derived from impacted human third molars. Biomaterials 2012; **33**: 5023-5035.

[5] Chen CY, Liu YJ, Shi SG, Chen FM, Cai C, Li B, Wang J, Shi L, Li Y, Liu ZY, Niu ZY. Osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells expressing lentiviral NEL-like protein 1. Int J Mol Med 2012; **30**: 863-869.

[6] Chen FM, An Y, Zhang R, Zhang M. New insights into into and novel applications of release technology for periodontal reconstructive therapies. J Control Release 2011; **149**: 92-110.

[7] Chen FM, Sun HH, Lu H, Yu Q. Stem cell-deliver therapeutics for periodontal tssue regeneration. Biomaterials 2012; **33**: 6320-6344.

[8] Chen K, Xiong H, Huang Y, Liu C. Comparative analysis of in vitro periodontal characteristics of stem cells form apical papilla (SCAP) and periodontal ligament stem cells (PDLSCs). Arch Oral Biol 2013: **58**: 997-1006.

[9] Chen X, Hu C, Wang G, Li L, Kong X, Ding Y, Jin Y. Nuclear factor-κB modulates osteogenesis of periodontal ligament stem cells through competition with β-catenin singaling in inflammatory microenvironments. Cell Death Dis 2013; **4**: e510; doi:10.1038/cddis.2013.14.

[10] Chen M-F, Zhao Y-M, Jin Y, Shi S. Prospects for translactional regenerative medicine. Biotechnol Adv 2011; **30**: 658-672.

[11] Choi MH, Noh WC, Park JW, Lee JM, Suh JY. Gene expression pattern during osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells in vitro. J Periodontal Implant Sci 2011; **41**: 167-175.

[12] Choi S, Cho T-J, Kwon S-K, Lee G, Cho J. Chondrogenesis of periodontal ligament stem cells by transforming growth factor-β3 and bone morphogenetic protein-6 in a normal healthy impacted third molar. Int J Oral Science 2013; **5**: 7-13.

[13] Chung VH, Chen AY, Kwan CC, Chen PK, Chang SC. Mandibular alveolar bony defect repair using bone morphogenetic protein 2-expressing autologous mesenchymal stem cells. J Craniofac Surg 2011; **22**: 450-454.

[14] d'Aquino R, Tirino V, Desiderio V, Studer M, De Angelis GC, 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.

[15] Ding G, Liu Y, Wang W, Wei F, Liu D, Fan Z, An Y, Zhang C, Wng S. Allogenic periodontal ligament stem cell therapy for periodontitis in swine. Stem Cells 2010; **28**: 1829-1838.

[16] Ding G, Wang W, Liu Y, An Y, Zhang C, Soi S, Wang S. Effect of cryopreservation on biological and immunological properties of stem cells from apical papilla. J Cell Physiol 2010; **223**: 415-422.

[17] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horowitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 2006; **8**: 315-317.

[18] Dorman LJ, Tucci M, Benghuzzi H. In vitro effects of bmp-2, bmp-7, and bmp-13 on proliferation and differentiation of mouse mesenchymal stem cells. Biomed Sci Instrum 2012; **48**: 81-87.

[19] Esposito M, Grusovin MG, Papanikolaou N, Coulthard P, Worthinghton HV. Enamel matrix derivative (Emdogain) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects. A Cochrane systematic review. Eur J Oral Implantol 2009; **2**: 247-266.

[20] Feng F, Akiyama K, Liu Y, Yamaza T, Wang T-M, Chen J-H, Wang BB, Huang G T-J, Wang, S, Shi S. Utility of PDL progenitors for in vivo tissue regeneration: a report of 3 cases. Oral Dis 2010; **16**: 20-28.

[21] Gao LN, An Y, Lei M, Li B, Yang H, Lu H, Chen FM, Jin Y: The effect of the coumarin-like derivative osthole on the on the osteogenic properties of human periodontal ligament jaw bone marrow mesenchymal stem cell sheets. Biomaterials 2013 Oct 1. pii: S0142-9612(13)01100-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.09.017. [Epub ahead of print]

[22] Gamal AY, Iacono VJ. Enhancing guided tissue regeneration of periodontal defects by using a novel perforated membrane. J Periodontol 2013; **84**: 905-913.

[23] Garlet GP, Cardoso CR, Mariano FS, Claudino M, de Assis GF, Campanelli AP, Avila-Campos MJ, Silva JS. Regulatory T cells attenuate experimental periodontitis progression in mice. J Clin Periodontol 2010; **37**: 591-600.

[24] Ge S, Zhao N, Wang L, Liu H, Yang P. Effects of hydroxyapatite nanostructure on channel surface of porcine acellular dermal matrix scaffold on cell viability and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. Int J Nanomedicine 2013; **8**: 1887-1895.

[25] Ge S, Zhao N, Wang L, Yu M, Liu H, Song A, Huang J, Wang G, Yang P. Bone repair by periodontal ligament stem cell-seeded nanohydroxyapatite-chitosan scaffold. Int J Nanomedicine 2012; **7**: 5405-5414.

[26] Govindasamy V, Ronald VS, Abdullah AN, Ganesan Nathan KR, Aziz ZA, Abdullah M, Zain RB, Kasim NH, Musa S, Bhonde RR. Human platelet lysate permits scale-up of dental pulp stromal cells for clinical applications. Cytotherapy 2011; **13**: 1221-1233.

[27] Górska R, Pietruska M, Dembowska E, Wysokińska-Miszczuk J, Włosowicz M, Konopka T. Częstość występowania chorób przyzębia u osób w wieku 35-44 lat w populacjach dużych aglomeracji miejskich. Dent Med. Probl 2012; **49**: 19-27.

[28] Guarino V, Guaccio A, Ambrosio L. Manipulating co-continuous polymer blends to create PSL scaffolds with fully interconnected and anisotropic pore architecture. J Appl Biomater Biomech 2011; **9**: 34-39.

[29] Guo W, Chen L, Ging K, Ding B, Duan Y, Jin Y. Heterogeneous dental follicle cells and the regeneration of complex periodontal tissues. Tissue Eng Part A 2012; **18**: 459-470.

[30] Hakki SS, Bozkurt B, Hakki EE, Kayis SA, Turac G, Yilmaz I, Karaoz E. Bone morphogenetic protein-2, -6, and -7 differently regulate osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2013 Jul 13. doi: 10.1002/jbm.b.32988. [Epub ahead of print].

[31] Hidaka T, Nagasawa T, Shirai K, Kado T, Furuichi Y. FGF-2 induces proliferation of human periodontal ligament cells and mainains differentiation potentials of STRO-1+/CD146+ periodontal ligament cells. Arch Oral Biol 2012; **57**: 830-840.

[32] Hynes K, Menicanin D, Gronthos S, Bartold M. Clinical utility of stem cells for periodontal regeneration. Periodontol 2000 2012; **59**: 203-227.

[33] 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.

[34] Iwata T, Yamato M, Zhang Z, Mukobata S, Washio K, Ando T, Feijen J, Okano T, Ishikawa I. Validation of human periodontal ligament-derived cells as a reliable source for cytotherapeutic use. J Clin Periodontol 2010; **37**: 1088-1099.

[35] Ji YM, Jeon SH, Park JY, Chung JH, Choung YH, Choung PH. Dental stem cell therapy with calcium hydroxide in dental pulp capping. Tissue Eng Part A 2010; **16**: 1823-1833.

[36] Jones BJ, Brooke G, Atkinson K, Mc Taggart SJ. Immunosppression by placental indoleamine 2,3-dioxygenase: A role for mesenchymal stem cells. Placenta 2007; **28**: 1174-1181.

[37] Jung IH, Kwon BS, Kim SH, Shim HE, Jun CM, Yun JH. Optimal medium formulation for the long-term expansion and stemness maintenance of periodontal ligament stem cells. J Periodontol. 2013; **84**: 1434-1444.

[38] Kang SW, Bae JH, Park SA, Kim WD, Park MS, Ko YJ, Jang HS, Park JH. Combination therapy with BMP-2 and BMSCs enhances bone healing efficacy of PCL scaffold fabricated using the 3D plotting system in a large segmental defect model. Biotechnol Lett 2012; **34**: 1375-1384.

[39] Kashima TG, Nishiyama T, Shimazaki M, Kii I, Grigoriadis AE, Fukayama M, Kudo A. Periostin, a novel marker of intramembranous ossification, is expressed in fibrous dysplasia and in c-Fos-overexpressing bone lesions. Hum Pathol 2009; **40**: 226-237.

[40] Kelm JM, Fussenegger M. Scaffold-free cell delivery for use in regenerative medicine. Adv Drug Deliv Rev 2010; **62**; 753-754.

[41] Khojasteh A, Behnia H, Dashti SG, Stevens M. Current trends in mesenchymal stem cell application in bone augmentation: a review of the literature. J Oral Maxillofac Surg 2012; **70**: 972-982.

[42] Kim HK, Kim JH, Park DS, Park KS, Kang SS, Lee JS, Jeong MH, Yoon TR. Osteogenesis induced by a bone forming peptide from the prodomain region of BMP-7. Biomaterials 2012; **33**: 7057-7063.

[43] Kim SH, Kim KH, Seo BM, Koo KT, Kim TI, Seol YJ, Ku Y, Rhyu IC, Chung CP, Lee YM. Alveolar bone regeneration by transplantation of periodontal ligament stem cells and bone marrow stem cells in a canine periimplant defect model: a pilot study. J Periodontol 2009; **80**: 1815-1823.

[44] Kim SS, Kwon D-W, Im I, Kim Y-D, Hwang D-S, Holliday LS, Donatelli RE, Son W-S, Jun E-S. Differentiation and characteristics of undifferentiated mesenchymal stem cells originationg from adult premolar periodontal ligaments. Korean J Orthod 2012; **42**: 307-317.

[45] Kim YT, Park JC, Choi SH, Cho KS, Im GI, Kim BS, Kim CS. The dynamic healing profile of human periodontal ligament stem cells: histological and immunohistochemical analysis using an ectopic transplantation model. J Periodont Res 2012; **47**: 514-524.

[46] Kinaia BM, Steiger J, Neely AL, Shah M, Bhola M. Treatment of class II molar furcation involvement: Meta-analyses of reentry results. J Periodontol 2011; **82**: 413-428.

[47] Kon E, Filardo G, Roffi A, Di Martino A, Hamdan M, De Psqual L, Merli ML, Marcacci M. Bone regeneration with mesenchymal stem cells. Clin Cases Miner Bone Metab 2012; **9**: 24-27.

[48] Kotsovilis S, Markou N, Pepelassi E, Nikolidakis D. The adjunctive use of platelet-rich plasma in the therapy of periodontal intraosseous defects: A systemativ review. J Periodontal Res 2010; **45**: 428-443.

[49] Li H, Yan F, Lei L, Li Y, Xiao Y. Application of autologous cryopreserved bone marrow mesenchymal stem cells for periodontal regeneration in dogs. Cells Tissues Organs 2009; **190**: 94-101.

[50] Li Z, Jiang CM, An S, Chen Q, Huang YF, Wang YT, Gou YC, Xiao L, Yu WJ, Wang J. Immunomodulatory properties of dental tissue-derived mesenchymal stem cells. Oral Dis. 2013 Feb 15. doi: 10.1111/odi. 12086. [Epub ahead of print].

[51] Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. Cell 2010; **140**: 845-858.

[52] 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 2013; **39**: 1174-1182.

[53] 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. Stem Cells 2013; **31**: 1371-1382.

[54] Liu Y, Zheng Y, Ding G, Fang D, Zhang C, Bartold PM, Grontho S, Shi S, Wang S. Periodontal ligament stem cells mediated treatment for periodontitis in miniature swine. Stem Cells 2008; **26**: 1065-1073.

[55] Lu H, Xie C, Zhao YM, Chen FM. Translational research and therapeutic applications of stem cell transplantation in periodontal regenerative medicine. Cell Transplant 2013; **22**: 205-229.

[56] Martens W, Bronckaers A, Politis C, Jacobs R, Lambrichts I. Dental stem cells and their promising role in neural regeneration: an update. Clin Oral Investig. 2013 Jul 12. doi:10.1007/s00784-013-1030-3. [Epub ahead of print].

[57] Martinez C, Rath S, Van Gulden S, Pelaez D, Alfonso A, Fernandez N, Kos L, Cheung H, Ramaswamy S. Periodontal ligament cells cultured under steady-flow environments demonstrate potential for use in heart valve tissue engineering. Tissue Eng Part A 2013; **19**: 458-466.

[58] Mooney DJ, Vandenburgh H. Cell delivery mechanisms for tissue repair. Cell Stem Cell 2008; **2**: 205-213.

[59] Moshaverinia A, Chen C, Akiyama K, Ansari S, Xu X, Chee WW, Schricker SR, Shi S. Alginate hydrogel as a promising scaffold for dental-derived stem cells: an in vitro study. J Mater Sci 2012; **23**: 3041-3051.

[60] Nakatsuka R, Nozaki T, Uemura Y, Matsuoka Y, Sasaki Y, Shinohara, Ohura K, Sonoda Y. 5-Aza-2'-deoxycytidine treatment induces skeletal myogenic differentiation of mouse dental pulp stem cells. Arch Oral Biol 2010; **55**: 350-357.

[61] Nam S, Won JE, Kim CH, Kim HW. Odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells stimulated by the calcium phosphate porous granules. J Tissue Eng 2011; **2011**: 812547.

[62] Padial-Molina W, Volk SL, Rodriguez JC, Marchesan JT, Galindo-Moreno P, Rios HF. Tumor necrosis factor-α and Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharides decrease periostin in human periodontal ligament fibroblasts. J Periodontol 2013; **84**: 694-703.

[63] Park CH, Rios HF, Jin Q, Sugai JV, Padial-Molina M, Taut AD, Flanagan CL, Hollister SJ, Giannobile WV. Tissue engineering bone-ligament complexes using fiber-guiding scaffolds. Biomaterials 2012; **33**: 137-145.

[64] Park JC, Kim JC, Kim YT, Choi SH, Cho KS, Im GI, Kim BS, Kim CS. Acquisition of human alveolar bone-derived stromal cells using minimally irrigated implant osteotomy: in vitro and in vivo evaluations. J Clin Periodontol 2012; **39**: 495-505.

[65] Park JC, Kim JM, Jung IH, Kim JC, Choi SH, Cho KS, Kim CS. Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations. J Clin Periodontol 2011; **38**: 721-731.

[66] Park JY, Jeon SH, Choung PH. Efficacy of periodontal stem cell transplantation in the treatment of advanced periodontitis. Cell Transplant 2011; **20**: 271-285.

[67] Parrish LC, Miyamoto T, Fong N, Mattson JS, Cerutis DR. Non-bioabsorbable vs. Bioabsorbable membrane: assessment of their clinical efficacy in guided tissue regeneration technique. A systemic review. J Oral Sci 2009; **51**: 383-400.

[68] Ponnaiayan D, Bhat KM, Bhat GS. Comparison of immuno-phenotypes of stem cells from human dental pulp and periodontal ligament. Int J Immunopathol Pharmacol 2012: **25**: 127-134.

[69] Qing W, Guang-Xing C, Lin G, Liu Y. The osteogenic study of tissue engineering bone with BMP2 and BMP7 gene-modified rat adipose-derived stem cell. J Biomed Biotechnol 2012; 2012:410879. doi: 10.1155/2012/410879. Epub 2012 Jun 12.

[70] Quintana L, zur Nieden NI, Semino CE. Morphogenetic and regulatory mechanisms during developmental chondrogenesis: new paradigms for cartilage tissue engineering. Tissue Eng Part B Rev 2009; **15**: 29-41.

[71] Rosa V, Della Bona A, Cavalcanti BN, Nör JE. Tissue engineering: from research to dental clinics. Dent Mater 2012; **28**: 341-348.

[72] Rumian Ł, Wojak I, Scharnweber D, Pamuła E. Resorbable scaffold modified with collagen type I or hydroxyapatite: in vitro studies on human mesenchymal stem cells. Acta Bioeng Biomech 2013; **15**: 61-67.

[73] Sargeant TD, Desai AP, Banerjee S, Agawu A, Topek JB. An in situ forming collagen-PEG hydrogel for tissue regeneration. Acta Biomater 2012; **8**: 124-132.

[74] Schenkein HA, Koertge TE, Brooks CN, Sabatini R, Purkall DE, Tew JG. Il-17 in sera from patients with aggresive periodontitis. J Dental Res 2010; **89**: 943-947.

[75] Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet 2004; **364**: 149-155.

[76] Silvério KG, Rodrigues TL, Coletta RD, Benevides L, Da Silva JS, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Mesenchymal stem cell properties of periodontal ligament cells from deciduous and permanent teeth. J Periodontol 2010; **81**: 1207-1215.

[77] Singhatanadgit W, Donos N, Olsen I. Isolation and characterization of stem cell clones from adult human ligament. Tissue Eng Part A 2009; **15**: 2625-2636.

[78] 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.
[79] Sun HH, Qu TJ, Zhang XH, Yu Q, Chen FM. Designing biomaterials for in situ periodontal tissue regeneration. Biotechnol Prog 2012; **28**: 3-20.
[80] Sun L, Akiyama K, Zhang H, Yamaza T, Hou Y, Zhao S, Xu T, Le A, Shi S. Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans. Stem Cells 2009; **27**: 1421-1432.
[81] Sununliganon L, Singhatanadgit W. Highly osteogenic PDL stem cell clones specifically express elevated levels of ICAM1, ITGB1 and TERT. Cytotechnology 2012; **64**: 53-63.
[82] 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.
[83] 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.
[84] Tang QO, Shakib K, Heliotis M, Tsiridis E, Mantalaris A, Ripamonti U. Tsiridis E. TGF-beta3: a potential biological therapy for enhancing chondrogenesis. Expert Opin Biol Ther 2009; **9**: 689-701.
[85] Tarle SA, Shi S, Kaigler D. Development of a serum-free system to expand dental-derived stem cells: PDLSCs and SHEDs. J Cell Physiol 2011; **226**: 66-73.
[86] Tomar GB, Srivastava RK, Gupta N, Barhanpurkar AP, Pote ST, Jhaveri HM, Mishra GC, Wani MR. 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.
[87] Tsumanuma Y, Iwata T, Washio K, Yoshida T, Yamada A, Takagi R, Ohno T, Lin K, Yamato M, Ishikawa I, Okano T, Izumi Y. Comparison of different tissue-derived stem cell sheets for periodontal regeneration in a canine 1-wall defect model. Biomaterials 2011; **32**: 5819-5825.
[88] Tu YK, Woolston A, Faggion CM Jr. Do bone grafts or barrier membranes provide additional treatment effects for infrabony lesions treated with enamel matrix derivatives? A network meta-analysis of randomized-controlled trials. J Clin Periodontol 2010; **37**: 59-79.
[89] Vaquette C, Fan W, Xiao Y, Hamlet S, Hutmacher DW, Ivanovski S. A biphasic scaffold design combined with cell sheet technology for simultaneous regeneration of alveolar bone/periodontal ligament complex. Biomaterials 2012; **33**: 5560-5573.
[90] Wada N, Menicanin D, Shi S, Bartold PM, Gronthos S. Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. J Cell Physiol 2009; **219**: 667-676.
[91] Wang L, Shen H, Zheng W, Tang L, Yang Z, Gao Y, Yang Q, Wang C, Duan Y, Jin Y. Characterization of stem cells from alveolar periodontal ligament. Tissue Eng Part A 2011; **17**: 1015-1126.
[92] Wang J, Wang X, Sun Z, Wang X, Yang H, Shi S, Wang S. Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation in vitro. Clin Oral Investig 2013; **14**: 433-440.
[93] Xu J, Wang W, Kapila Y, Lotz J, Kapila S. Multiple differentiation capacity of STRO-1+/CD146+ PDL mesenchymal progenitor cells. Stem Cells Dev 2009; **18**: 487-496.
[94] Yamada S, Tomoeda M, Ozawa Y, Yoneda S, Terashima Y, Ikezawa K Ikegawa S, Saito M, Toyosawa S, Murakami S. PLAP-1/asporin, a novel negative regulator of periodontal ligament mineralization. J Biol Chem 2007; **282**: 23070-23080.
[95] 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.
[96] Yoshida T, Washio K, Iwata T, Okano T, Ishikawa I. Current status and future development of stem cell transplantation therapy for periodontal tissue regeneration. Int J Dent 2012; **2012**: 397024.

[97] Zhang J, An Y, Gao L-N, Zhang Y-J, Jin Y, Chen F-M. The effect of aging on the pluripotential capacity and regenerative potetntial of human periodontal ligament stem cells. Biomaterials 2012; **33**: 6974-6986.
[98] Zheng ZH, Li XY, Ding J, Jia JF, Zhu P. Allogenic mesenchymal stem cell and mesenchymal stem cell-differentiated chondrocyte suppress the responses of type II collagen-reactive T cells in rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford) 2008; **47**: 22-30.
[99] Zheng W, Wang S, Ma D, Tng L, Duan Y, Jin Y. Los sof proliferation and differentiation capacity of aged human periodontal ligament stem cells and rejuvenation by exposure to the young extrinsic environment. Tissue Eng Part A 2009; **15**: 2363-2371.
[100] Zhou Y, Li Y, Mao L, Peng H. Periodontal healing by periodontal ligament cell sheets in a teeth replantation model. Arch Oral Biol 2012; **57**: 169-176.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 02.09.2013
Przyjęto:29.10.2013
Bartłomiej Górski
Zakład Chorób Błony Śluzowej i Przyzębia
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Miodowa 18, 00-246 Warszawa
tel./fax: (22) 831 21 36
e-mail: bartek_g3@tlen.pl