

# Komórki macierzyste z miazgi zęba ludzkiego (DPSCs). Charakterystyka i możliwości zastosowania – przegląd piśmiennictwa

\*Alicja Mackiewicz<sup>1</sup>, Tomasz Lekszycki<sup>2</sup>, Dorota Olczak-Kowalczyk<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Stomatologii Dziecięcej, Instytut Stomatologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny  
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Dorota Olczak-Kowalczyk

<sup>2</sup>Zakład Konstrukcji Maszyn i Inżynierii Biomedycznej, Instytut Mechaniki i Poligrafii,  
Politechnika Warszawska  
Kierownik Zakładu: prof. nzw. dr hab. inż. Tomasz Lekszycki

## DENTAL PULP STEM CELLS (DPSCS). CHARACTERISTICS AND APPLICATION – A REVIEW

### Summary

The dental pulp stem cells (DPSCs) are the fraction of the mesenchymal stem cells and can be characterized by the properties of all stem cells, such as self-renewal, multipotential character and the presence of the STRO-1 receptor on their surface. DPSCs possess the ability to secrete the components of the extracellular matrix and the dentine building proteins. They are mainly isolated from young human teeth, such as the completely impacted third molars. The cells identification covers colony forming tests, phenotypic assays, behavioral aspects and specific surface markers testing. Isolated and tested cells may be kept in liquid nitrogen using the cryopreservation technique for up to 6 months. Different culture conditions provide multiple differentiation modes, which enables obtaining specific progenitor cells. DPSCs may be used in various medicine disciplines, as well as in dentistry. Nowadays, the DPSCs have become an attractive source for tissue engineering using different biological scaffolds. The scaffolds are three-dimensional structures providing an ideal framework and morphogenic molecules constituents for the cells. Their application covers the treatment of neurodegenerative diseases, ex. the Parkinson disease, the regenerative endodontics and the post-traumatic treatment of young permanent teeth in the revascularization method. They also provide a great source of cells used in regenerative tissue engineering. The banking of the cells is also available via cryopreservation. In dentistry, DPSCs decide for the pulps regenerative and defensive potential and are the future of the regenerative dentistry as well as an ideal scientific research material.

**Key words:** stem cells, tissue engineering and regenerative medicine, odontoblasts, dental pulp, DPSC

### WSTĘP

Miazga zęba ludzkiego jest zbudowana z substancji podstawowej oraz elementów komórkowych, do których należą m.in. odontoblasty, fibroblasty oraz komórki macierzyste tkanki zęba (ang. *dental stem cells* – DSCs), będące frakcją komórek macierzystych mezenchymy (ang. *mesenchymal stem cells* – MSCs). Wśród komórek DSCs wyróżniamy: komórki macierzyste z miazgi zęba ludzkiego (ang. *dental pulp stem cells* – DPSCs), komórki macierzyste z miazgi zęba mlecznego (ang. *stem cells from human exfoliated deciduous teeth* – SHEDs), komórki macierzyste więzadła ozębnowego (ang. *periodontal ligament stem cells* – PDLSCs), komórki macierzyste brodawki wierzchołkowej (ang. *stem cells from apical papilla* – SCAP) oraz komórki progenitorowe pęcherzyka zębowego (ang. *dental follicle progenitor cells* – DFPCs) (1-7). Komórki macierzyste są niezróżnicowanymi komórka-

mi embrionalnymi lub dojrzałymi komórkami postnatalnymi, które cechuje ciągły potencjał proliferacyjny. Są one samoodnawialne (ang. *self-renewal*) i posiadają zdolność tworzenia komórek progenitorowych (prekursorowych), czyli różnicowania się do każdej wyspecjalizowanej komórki (tzw. totipotencjalność) (1, 8). DPSCs są klasyfikowane jako wyspecjalizowane dojrzałe (postnatalne) komórki macierzyste (ang. *adult stem cells*), zróżnicowane na skutek działania czynników zewnętrznych, doprowadzających do przerwania procesu samoodnawiania się DSCs. DPSCs, w przeciwieństwie do MSCs, wykazują charakter multipotentny, co oznacza, że mogą się różnicować do przynajmniej trzech różnych linii komórkowych, takich jak odontoblasty, osteoblasty, komórki endotelium, nerwowe i tłuszczowe (2, 3, 9, 10). Pierwszymi komórkami macierzystymi wykorzystywanymi w medycynie były komórki macierzyste szpiku kostnego (ang. *bone marrow stem cells*

– BMSCs). Ich pozyskiwanie było obciążające i niebezpieczne dla pacjenta. Próby wyizolowania i oznaczenia DPSCs zostały podjęte w końcu XX wieku, głównie z uwagi na ich znane zdolności proliferacyjne i regeneracyjne oraz potencjalną możliwość zastąpienia nimi BMSCs (3).

Dojrzałe odontoblasty, będące komórkami odpowiedzialnymi za sekrecję substancji budujących macierz zewnątrzkomórkową zębiny (ang. *extracellular matrix* – ECM) i jej dalszą mineralizację, w odpowiedzi na czynniki drażniące miazgę wydzielają szereg substancji obronnych (cytokiny, interleukiny, chemokiny), które mają za zadanie eliminację zagrożenia (1-3, 5, 11-15). W chwili opanowania ostrego stanu zapalnego następuje proces naprawczy tkanek twardych zęba (1). Udowodniono stymulujący wpływ interleukiny 1 (IL-1), transformujących czynników wzrostu  $\beta_1$  i  $\beta_2$  (TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$ ) oraz materiałów odontotropowych, takich jak np. wodorotlenek wapnia, na wydzielanie kolagenu zębiny przez komórki miazgi (11, 12, 16-19). Nowo powstała tkanka twarda odseparowuje miazgę zęba od strefy degradacji tkanki. Grubość warstwy zębiny oddzielającej dno ubytku próchnicowego od miazgi zęba jest ważnym czynnikiem warunkującym przeżycie odontoblastów. W przypadku działania silnego bodźca komórki leżące w bezpośredniej strefie jego oddziaływania obumierają. Ich funkcję sekrecyjną przejmują komórki miazgi właściwej, w tym DSCs, a nowo powstała tkanka nazywana jest zębiną reparacyjną (7, 17, 20).

DPSCs posiadają wszystkie cechy komórek macierzystych, o czym świadczy obecność na ich powierzchni receptora STRO-1 – specyficznego epitopu komórek mezenchymalnych (3, 4, 10, 21). Ponadto, na ich powierzchni wykazano obecność receptorów charakterystycznych dla śródbłonka (CD106, CD146, cząsteczka adhezji komórkowej naczyń 1 [VCAM-1]), tkanek okołonaczyniowych (CD146, 3G5, ACTA2), kości, zębiny i cementu (białko morfogenetyczne kości [ang. *bone morphogenetic protein* – BMP], fosfataza zasadowa [ang. *alkaline phosphatase* – ALP], osteonektyna [ang. *osteonectin* – OSN], osteopontyna [ang. *osteopontin* – OSP], kostna sialoproteina [ang. *bone sialoprotein* – BSP]) oraz fibroblastów (kolagen typu I, III oraz czynnik wzrostu fibroblastów 2 [FGF-2]) (1, 21, 22).

DPSCs charakteryzują się wysokim potencjałem proliferacyjnym, wzrostowym i zdolnością wydzielania mediatorów wzrostu komórkowego, takich jak kinazy-6 zależnej od cyklin (ang. *cyclin-dependent kinase-6* – CDK-6) oraz insulinopodobnego czynnika wzrostu (ang. *insulin-like growth factor* – IGF) (3). DPSCs posiadają również na swojej powierzchni receptory odpowiadające za rozpoznawanie bakterii, tj. TLR-2, TLR-4 (ang. *toll-like receptors* – TLR) oraz wydzielają naczyniowy endotelialny czynnik wzrostu (ang. *endothelial growth factor* – EGF) w odpowiedzi na lipopolisacharyd (23). Różnicowanie DPSCs w dojrzałe odontoblasty następuje na skutek stymulacji przez bodźce zewnętrzne i białka sygnałowe (głównie czynniki wzrostu takie jak TGF-1, TGF-3, BMP-2, IFG-1) wydzielane

przez dojrzałe odontoblasty oraz nabłonek wewnętrzny narządu szkliwotwórczego. Udowodniono również, że w warunkach fizjologicznych oraz w obecności białek macierzy zębiny i pozostałych czynników wzrostu może dojść do rozpoczęcia procesu różnicowania DPSCs w odontoblasty, nawet w przypadku braku wewnętrznego nabłonka narządu szkliwotwórczego lub błony podstawnej (24-26). Na proces migracji DPSCs z ich niszy bytowania wpływają białka sygnałowe z rodziny receptorów efedrynowych dla kinazy tyrozynowej subklasy B – EphB/efedryna-B (1, 27).

Morfologią DPSCs przypominają fibroblasty. Cechują się wydłużonym ciałem komórkowym z centralnie ułożonym jądrem komórkowym, dobrze wykształconym szorstkim retikulum endoplazmatycznym (ang. *rough endoplasmic reticulum* – RER), aparatem Golgiego oraz licznymi pęcherzykami sekrecyjnymi (3). Młode odontoblasty, niewykazujące funkcji sekrecyjnej, są małymi, owalnymi komórkami z wysoko ułożonym jądrem komórkowym, słabo wykształconym aparatem Golgiego i szczątkowym szorstkim retikulum endoplazmatycznym. W procesie dojrzewania następuje zmiana budowy komórki – jej ciało ulega wydłużeniu, jądro komórkowe z aparatem Golgiego zlokalizowanym nieopodal układa się centralnie, a także pojawiają się pęcherzyki sekrecyjne rozsiane w całej cytoplazmie (3). Dochodzi do wykształcenia połączeń pomiędzy komórkami, czyli utworzenia syncytium. Wyrostek cytoplazmatyczny, zbudowany z włókien aktynowych i nestynowych, posiada część główną oraz odchodzące od niej w różnych odległościach liczne odgałęzienia, dzięki którym są możliwe: sekrecja składników macierzy zewnątrzkomórkowej, sygnalizacja międzykomórkowa oraz sygnalizacja pomiędzy komórką a ECM. Obecność nestyny w odontoblastie świadczy o jego przynależności do komórek wywodzących się ze zwoju nerwowego (9). Dojrzałe odontoblasty wydzielają składniki budujące ECM, takie jak kolagen typu I, III (90% ECM), proteoglikany oraz substancje niekolagenowe (10% ECM), do których należą dwa główne białka budujące zębinę: sialoproteina zębinowa (ang. *dentin sialoprotein* – DSP) i fosfoproteina zębinowa (ang. *dentin phosphoprotein* – DPP). Oba są kodowane przez pojedynczy gen sialofosfoproteiny zębinowej (ang. *dentinsialophosphoprotein gene* – DSPP) (9). Wykazano, że ekspresja DSPP i dalsza produkcja DSP oraz DPP następują bezpośrednio po utworzeniu się kolagenowej matrycy zębiny i są one ściśle związane z procesem zębinogenezy (9). Ponadto, dojrzałe odontoblasty wydzielają wiele innych białek niekolagenowych ECM, m.in. fosfoproteinę macierzy zębiny 1 (ang. *dentin matrix protein-1* – DMP-1), fibronektynę, OSP, OSN, BSP i inne (3, 7, 28, 29).

Izolacja komórek macierzystych łączy się z koniecznością enzymatycznej degradacji tkanki, identyfikacji uzyskanych komórek pod względem zgodności oraz wykonania szeregu testów potwierdzających ich pochodzenie, morfologię i charakter. Do identyfikacji służą testy:

- zdolności tworzenia kolonii (ang. *colony forming assay* – CFA) (potwierdzające klonogenność pozyskanych komórek, tj. zdolność do tworzenia zespołu identycznych morfologicznie i czynnościowo komórek budujących daną tkankę lub wyspecjalizowanych w spełnianiu określonej funkcji),
- fenotypowe (oceniające morfologię i zachowanie pozyskanych komórek),
- czynnościowe (określające zdolność zaimplantowanych komórek do integracji z pozostałymi komórkami i funkcjonowania jak komórki zróżnicowane),
- oceniające obecność specyficznych markerów na powierzchni komórki (w teście cytometrii przepływowej) (1, 4, 8).

DPSCs zostały po raz pierwszy wyizolowane w roku 2000 (21) z tkanki okołonaczyniowej, która stanowi ich niszę bytowania (2, 3, 22). Fenotypowo są one podobne do wywodzących się z grzebienia nerwowego pericytów wyścielających zewnętrzną powierzchnię ściany małych naczyń krwionośnych (27). Silne właściwości adherentne umożliwiają ich namnażanie na różnych podłożach (3, 21). Źródło tkanki dawcy komórek ma ogromne znaczenie, ponieważ im młodsza i mniej zróżnicowana tkanka, tym lepsze są warunki dla pozyskania DPSCs. Najkorzystniejsze wydaje się wykorzystanie w tym celu całkowicie zatrzymanych trzecich zębów trzonowych (3, 9). Różnicowanie komórek macierzystych jest zależne od zewnętrznych czynników środowiskowych, stąd wniosek, iż odmienne warunki hodowli pozwolą na zróżnicowanie DPSCs w różne linie komórkowe (3, 9, 30).

Równoległe z izolacją DPSCs przeprowadzane jest testowanie z użyciem przeciwciał, takich jak np. STRO-1 (3, 9), w czasie maksymalnie 120 godzin od ekstrakcji zęba (2). Komórki można przechowywać przez okres do 6 miesięcy, stosując krioprezervację w ciekłym azocie w temperaturze  $-196^{\circ}\text{C}$ , bez wpływu na ich morfologię i funkcjonowanie (1, 2, 30). Przechowywanie nietkniętych zębów ludzkich po ekstrakcji metodą krioprezervacji okazuje się mniej skuteczne niż samych wyizolowanych komórek (DPSCs są odzyskiwane tylko z ok. 20% tych zębów) (31). W określaniu fenotypu odontoblastów niezmiernie przydatne okazują się badania dotyczące sekwencjonowania cDNA metodą PCR, pozwalające na stworzenie biblioteki genów charakterystycznych dla tych komórek. Badania wskazują na nadmierną ekspresję genów kodujących białka DSPP, ameloblastynę, PHEX (gen regulujący fosfatazę dla endopeptydaz na chromosomie X) oraz enamelinę, której ekspresja pojawia się już we wczesnej fazie różnicowania z DPSCs (29).

W chwili obecnej nie istnieją takie warunki hodowli, które umożliwiłyby jedynie zwiększenie liczby komórek DPSCs bez ich różnicowania (21). DPSCs zazwyczaj przechodzą asymetryczne podziały, w których powstaje niezmienniona komórka córka (ang. *daughter stem cell*), posiadająca wszystkie cechy komórek macierzystych, oraz komórka progenitorowa. Badania naukowe

wykazały także, że komórki DPSCs pochodzące z dziewiątego pasażu hodowane w standardowym medium spontanicznie ulegają asymetrycznemu podziałowi i różnicowaniu w dojrzałe odontoblasty, osteoblasty i chondrocyty, o czym świadczy również podwyższony poziom ekspresji genów białek DSPP, ALP, OPN, BSP i kolagenu typu II (32). W obrębie dojrzałej miazgi, DPSCs występują w formie utajonej i uaktywniają się w momencie jej uszkodzenia. Liczba DPSCs w dojrzałej miazdze jest stała, dzięki czemu zachowana jest homeostaza miazgi zęba (10).

Końcowa faza różnicowania odontoblasta jest kontrolowana przez nabłonek wewnętrzny narządu szkliwotwórczego w mechanizmie interakcji z czynnikami wzrostowymi, których rezerwuar stanowi błona podstawna (10, 29). Wśród nich wymienia się wchodzące w skład rodziny czynników wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor*) TGF- $\beta$ , IGF1. W warunkach *in vitro* końcowa faza różnicowania odontoblastów może być indukowana poprzez hodowlę na podłożu wzbogaconym o aktywne frakcje białkowe TGF- $\beta$ 1, BMP-2 w kombinacji z heparyną lub IGF1, jak również  $\alpha$ FGF w kombinacji z IGF1 (29).

Charakterystyczne właściwości komórek DPSCs pozwalają na ich szerokie zastosowanie zarówno w stomatologii, jak i medycynie w zakresie badań naukowych oraz sterowanej regeneracji tkankowej.

Inżynieria tkankowa oraz medycyna regeneracyjna (ang. *tissue engineering and regenerative medicine* – TERM) polega na stworzeniu materiału o działaniu biologicznym, który zawierałby wszystkie niezbędne składniki dla prawidłowego namnażania się komórek na jego powierzchni, mógłby być łatwo aplikowany do tkanki podlegającej regeneracji, cechował się biokompatybilnością oraz biodegradowalnością bez pozostawienia toksycznych produktów ubocznych (3, 33). TERM opiera się na trzech podstawowych elementach: wykorzystaniu komórek macierzystych w obecności odpowiednich czynników wzrostu oraz rusztowania (bazy) (1, 33). Współczesne koncepcje zakładają namnożenie komórek macierzystych na materiałach biodegradowalnych, takich jak np. kolagen. W pionierskich badaniach komórki DPSCs namnażano na podłożu z hydroksyapatytu/fosforanu trójwapniowego (HA/TCP) oraz kwasie polimlekowym (PLA), które wykazywały biokompatybilność w stosunku do DPSCs i umożliwiały wytworzenie dobrze unaczynionej miazgi oraz jednorodnej warstwy zębiny (21). Próby z wykorzystaniem materiałów na bazie kolagenu nie spełniły pokładanych w nich oczekiwań i nie uzyskano wystarczająco dobrej podstawy do namnażania DPSCs, chociaż uzyskane wyniki były zadowalające (34). Po zastosowaniu samych DPSCs w połączeniu z bazą kolagenową widoczne są oznaki organizacji komórek, chociaż nowo powstała tkanka nie wykazuje cech pożądaných do regeneracji miazgi zęba. Natomiast w przypadku obecności wszystkich trzech komponentów (DPSCs, baza kolagenowa oraz DMP-1) nowo powstała tkanka charakteryzuje dobra

organizacja i zdolność do formowania nowej matrycy kolagenowej oraz angiogenezy (34).

Pozostałe możliwości zastosowania DPSCs obejmują wypełnianie ubytków kostnych w ortopedii (33), regenerację tkanek w nowo powstającej dziedzinie stomatologii, jaką jest endodoncja regeneracyjna (ang. *regenerative endodontics*) (34), oraz leczenie chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona (35).

Ubytki kostne powstają jako wynik chorób nowotworowych, wrodzonych deformacji, urazów, osteoporozy, działań jatrogennych (zabiegi chirurgiczne) oraz chorób przyzębia i mogą być z powodzeniem leczone z zastosowaniem TERM wykorzystującym DPSCs a nie, jak do tej pory sądzono, jedynie MSCs wywodzące się ze szpiku kostnego (33).

Endodoncja regeneracyjna zajmuje się wykorzystaniem komórek macierzystych w leczeniu obrażeń miazgi zębowej, perforacji dna komory i ścian kanałów korzeniowych (34), a także martwicy miazgi zębów stałych z nieukończonym rozwojem korzenia metodą rewaskularyzacji/regeneracji (36). Zróżnicowane DPSCs (*adult DPSCs*) stanowią doskonały materiał dla zastosowań endodoncji regeneracyjnej, przy założeniu, że zostaną one wyhodowane na takim podłożu, które zapewni porowatość umożliwiającą łatwość migracji i organizacji komórek, biokompatybilność dla pozostałej części miazgi, biodegradowalność w czasie oraz komfort pracy dla lekarza (34).

#### PODSUMOWANIE

W stomatologii DPSCs decydują o możliwościach obronnych miazgi oraz stanowią przyszłość endodoncji regeneracyjnej. Komórki macierzyste miazgi zębowej są doskonałym źródłem sterowanej regeneracji tkankowej. Ich zdolność różnicowania się do odontoblastów umożliwia prowadzenie badań naukowych, które pozwolą na dokładniejsze poznanie funkcjonowania odontoblastów i ich odpowiedzi na różnorodne czynniki szkodliwe. Pozyskanie komórek jak najmniej zróżnicowanych jest jednak trudne, mimo możliwości ich przechowywania poprzez krioprezervację. □

#### Piśmiennictwo

1. Sedgley CM, Botero TM: Dental stem cells and their sources. *Dent Clin N Am* 2012; 56: 549-561. 2. Olender E, Kamiński A, Uhrynowska-Tyszkiewicz I, Wanyura H: Komórki macierzyste tkanek zęba i możliwości odtwarzania struktur zęba – przegląd piśmiennictwa. *Czas Stomatol* 2010; 63(11): 682-692. 3. Kacprzyńska E, Maciejewska I: Komórki macierzyste pochodzenia zębowego. Możliwości zastosowania we współczesnej stomatologii i potencjalne kierunki rozwoju – przegląd piśmiennictwa. *Post Biol Komórki* 2011; 38(3): 467-473. 4. Huang GT-J, Gronthos S, Shi S: Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* 2009; 88(9): 792-806. 5. Huang GT-J, Sonoyama W, Liu Y et al.: The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod* 2008; 34(6): 645-651. 6. Suchánek J, Soukup T, Ivančáková R et al.: Human dental stem cells – isolation and long term cultivation. *ACTA MEDICA (Hradec Králové)* 2007; 50(3): 195-201. 7. Goldberg M, Smith AJ: Cells and extra-

cellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15(1): 13-27. 8. Fuchs E, Segre JA: Stem cells: a new lease on life. *Cell* 2000; 100: 143-155. 9. Feng JQ, Luan X, Wallace J et al.: Genomic organization, chromosomal mapping, and promoter analysis of the mouse dentin sialophosphoprotein (Dspp) gene, which codes for both dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein. *J Biol Chem* 1998; 273: 9457-9464. 10. Yu J, He H, Tang Ch et al.: Differentiation potential of STRO-1 + dental pulp stem cells changes during cell passaging. *BMC Cell Biol* 2010; 11: 32. 11. Chan CP, Lan WH, Chang MC et al.: Effects of TGF- $\beta$ s on the growth, collagen synthesis and collagen lattice contraction of human dental pulp fibroblasts in vitro. *Arch Oral Biol* 2005; 50: 469-479. 12. Durand SH, Flacher V, Roméas A et al.: Lipoteichoic acid increases TLR and functional chemokine expression while reducing dentin formation in in vitro differentiated human odontoblasts. *J Immunol* 2006; 176(5): 2880-2887. 13. Pääkkönen V, Vuoristo J, Salo T, Tjäderhane L: Effects of TGF- $\beta$ 1 on interleukin profile of human dental pulp and odontoblasts. *Cytokine* 2007; 40(1): 44-51. 14. Veerayutthwilai O, Byers MR, Pham T-TT et al.: Differential regulation of immune responses by odontoblasts. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22(1): 5-13. 15. Eni Juliana A, Hisham S, Rohaya MAW, Nik Marzuki S: Molecular existence of mature odontoblast and osteoblast cells in adult human pulp tissues. *Asian J Biochem* 2009; 4(2): 36-44. 16. Yang LC, Huang FM, Lin CS et al.: Induction of interleukin-8 gene expression by black-pigmented *Bacteroides* in human pulp fibroblasts and osteoblasts. *Int Endod J* 2003; 36(11): 774-779. 17. Smith AJ, Cassidy N, Perry H et al.: Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol* 1995; 39: 273-280. 18. Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM: Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. *Int Endod J* 2005; 38: 505-509. 19. Demarco FF, Tarquinio SBC, Jaeger MMM et al.: Pulp response and cytotoxicity evaluation of 2 dentin bonding agents. *Quintess Int* 2001; 32(3): 211-220. 20. Mitsiadis TA, Fried K, Goridis C: Reactivation of delta-notch signaling after injury: complementary expression patterns of ligand and receptor in dental pulp. *Exp Cell Res* 1999; 246: 312-318. 21. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J et al.: Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(25): 13625-13630. 22. Shi S, Bartold PM, Miura M et al.: The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res* 2005; 8: 191-199. 23. Yamagishi VT-K, Torneck CD, Friedman S et al.: Blockade of TLR2 inhibits *Porphyromonas gingivalis* suppression of mineralized matrix formation by human dental pulp stem cells. *J Endod* 2011; 37(6): 812-818. 24. Ruch JV, Lesot H, Bègue-Kirn C: Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 1995; 39: 51-68. 25. Bègue-Kirn C, Smith AJ, Ruch JV et al.: Effects of dentin proteins, transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast *in vitro*. *Int J Dev Biol* 1992; 36: 491-503. 26. LePrince JG, Zetlin BD, Tolar M, Peters OA: Interactions between immune system and mesenchymal stem cells in dental pulp and periapical tissues. *Int Endod J* 2012; 45: 689-701. 27. Stokowski A, Shi S, Sun T et al.: EphB/Ephrin-B interaction mediates adult stem cell attachment, spreading, and migration: implications for dental tissue repair. *Stem Cells* 2007; 25: 156-164. 28. Goldberg M, Six N, Chaussain C et al.: Dentin extracellular matrix molecules implanted into exposed pulps generate reparative dentin: a novel strategy in regenerative dentistry. *J Dent Res* 2009; 88(5): 396-399. 29. Buchaille R, Couble ML, Magloire H, Bleicher F: A subtractive PCR-based cDNA library from human odontoblast cells: identification of novel genes expressed in tooth forming cells. *Matrix Biol* 2000; 19: 421-430. 30. Arthur A, Rychkov G, Shi S et al.: Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells* 2008; 26: 1787-1795. 31. Chen Y-K, Huang AH-C, Chan AW-S et al.: Human dental pulp stem cells derived from different cryopreservation methods of human dental pulp tissues

of diseased teeth. *J Oral Pathol Med* 2011; 40: 793-800. **32.** Stevens A, Zuliani T, Olejnik C et al.: 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. **33.** Yamada Y, Ito K, Nakamura S et al.: Promising cell-based therapy for bone regeneration using stem cells from deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow. *Cell Transplant* 2011; 20: 1003-1013. **34.** Prescott RS, Alsanea R,

Fayad MI et al.: In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod* 2008; 34(4): 421-426. **35.** Nesti C, Pardini C, Barachini S et al.: Human dental pulp stem cells protect mouse dopaminergic neurons against MPP<sup>+</sup> or rotenone. *Brain Res* 2011; 1367: 94-102. **36.** Huang GT-J: Apexification: the beginning of its end. *Int Endod J* 2009; 42: 855-866.

*nadesłano: 22.11.2014*

*zaakceptowano do druku: 12.12.2014*

*Adres do korespondencji:*

*\*Alicja Mackiewicz  
Zakład Stomatologii Dziecięcej IS WUM  
ul. Miodowa 18, 00-246 Warszawa  
tel.: +48 (22) 502-20-31  
e-mail: alicja.mackiewicz@wum.edu.pl*