Βλαστοκύτταρα του οδοντικού πολφού μονίμων δοντιών και οστική αναγέννηση

Αμαλία ΚΑΠΑΡΟΥ[1], Δήμος ΚΑΛΥΒΑΣ[2], Ευθυμία ΚΙΤΡΑΚΗ[3]

Από το Εργαστήριο Βασικών Ιατροβιολογικών Επιστημών, Τμήμα Οδοντιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών. (Διευθύντρια: Καθηγήτρια Ε. Κιτράκη)

Dental pulp stem cells and bone regeneration

Amalia KAPAROU, Dimos KALYVAS, Efthymia KITRAKI

Laboratory of Basic Biomedical Sciences, School of Dentistry, National and Kapodistrian University of Athens, Greece. (Head: Professor E. Kitraki)

Βιβλιογραφική Ανασκόπηση
Literature review

ΠΕΡΙΛΗΨΗ: Ο οδοντικός πολφός είναι ένας ιστός μεσεγχυματικής προέλευσης και εμπεριέχει βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από την κρανιακή μοίρα της νευρικής ακρολοφίας. Τα βλαστικά αυτά κύτταρα που καλούνται 'φωλεές', ανευρίσκονται σε ειδικές ανατομικές θέσεις του οδοντικού πολφού, με εντόπιση κυρίως στις περιαγγειακές περιοχές. Τα οδοντικά πολφικά βλαστικά κύτταρα (dental pulp stem cells, DPSCs) είναι κλωνογενή, ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα και δύνανται να διαφοροποιηθούν προς διάφορους κυτταρικούς τύπους. Η κύρια λειτουργία τους είναι η παραγωγή τεταρτοταγούς/επανορθωτικής οδοντίνης μετά από τραυματισμό της μύλης του δοντιού. Επιπλέον, τα DPSCs δύνανται να διαφοροποιηθούν *in vitro* σε κύτταρα που μοιάζουν με οστεοβλάστες και παράγουν εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και πρωτογενή οστίτη ιστό, ενώ παράγουν ώριμο επαρκώς αγγειούμενο οστό, όταν εμφυτεύονται *in vivo* σε ανοσοκατεσταλμένους επίμυες. Τα ευρήματα από την *in vivo* εφαρμογή των DPSCs σε πειραματικά μοντέλα οστικών ελλειμμάτων είναι σαφώς ενθαρρυντικά και τονίζουν την ανάγκη περαιτέρω μελέτης για την αξιολόγηση και ανάπτυξη πρωτοκόλλων θεραπευτικής εφαρμογής των κυττάρων αυτών στην προαγωγή της οστικής αναγέννησης.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: οδοντικός πολφός, βλαστικά κύτταρα, οστικό έλλειμμα, οστική αναγέννηση.

SUMMARY: Dental pulp, a soft tissue of mesenchymal origin, contains stem cells derived from cranial neural crest cells. Dental pulp stem cells (DPSCs) reside into special anatomic locations of dental pulp, the so called "niches". Stem cell niches are located predominately, but not exclusively, in the perivascular regions of the pulpal cavity. DPSCs exhibit clonogenic and high proliferative activity and are capable of differentiating into several cell types. The main function of these cells is the production of tertiary/reparative dentine following trauma or caries of dental crown. Previous studies have shown that DPSCs can differentiate into osteoblast-like cells that secrete abundant extracellular matrix and can build a woven bone *in vitro*. Moreover, DPSCs are capable of forming a complete and well-vascularised lamellar bone after grafting ectopically into immunocompromised rats. The *in vivo* transplantation of DPSCs into critical-sized bone defects in animal models has been shown to promote and/or accelerate bone regeneration. These results are clearly encouraging and stress the need of further research for the potential clinical use of DPSCs in bone tissue engineering.

KEY WORDS: dental pulp, stem cells, bone defect, bone regeneration.

[1]*Οδοντίατρος, Msc Βιολογία Στόματος, Μεταπτυχιακή φοιτήτρια Παθοβιολογίας Στόματος με κατεύθυνση Στοματική Χειρουργική, Οδοντιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ*
[2]*Αναπληρωτής Καθηγητής, Κλινική ΣΓΠΧ, Οδοντιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ*
[3]*Καθηγήτρια Βιολογίας, Οδοντιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ*

Παρελήφθη: 30/5/2014 - Έγινε δεκτή: 10/9/2014

Paper received: 30/5/2014 - Accepted: 10/9/2014

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα βλαστικά κύτταρα εξ' ορισμού έχουν την ικανότητα της αυτο-ανανέωσης και δύνανται να διαφοροποιηθούν προς πολλές διαφορετικές κυτταρικές κατευθύνσεις. Για το σκοπό αυτό, τα βλαστοκύτταρα υπόκεινται σε ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση που συνεπάγεται την παραγωγή ενός θυγατρικού κυττάρου, το οποίο παραμένει αδιαφοροποίητο (πολυδύναμο) και ενός θυγατρικού κυττάρου, που δύναται να διαφοροποιηθεί προς διαφορετικές κατευθύνσεις (Morrison και συν. 1997, Parker και συν. 2004). Με βάση το δυναμικό διαφοροποίησής τους, τα βλαστοκύτταρα ταξινομούνται σε ολοδύναμα, πολυδύναμα και μερικώς πολυδύναμα κύτταρα. Ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα είναι εκείνα που όταν εμφυτευθούν στη μήτρα ενός ζωντανού οργανισμού μπορούν να δημιουργήσουν έναν ολόκληρο οργανισμό. Ως ολοδύναμα θεωρούνται μόνο τα κύτταρα των πρώτων διαιρέσεων του ζυγώτη. Τα πολυδύναμα κύτταρα μπορούν να παράγουν οποιοδήποτε κύτταρο του οργανισμού, αλλά δεν μπορούν να δώσουν γένεση στους εξω-εμβρυικούς ιστούς, όπως είναι ο πλακούντας. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα (embryonic stem cells, ES cells) που λαμβάνονται από την έσω κυτταρική μάζα του πρώιμου εμβρύου, καθώς και τα σωματικά κύτταρα με επαγόμενη πολυδυναμία (induced pluripotent stem cells, iPS cells). Τα βλαστοκύτταρα των ενήλικων ιστών (adult stem cells, AS cells) από την άλλη, είναι μερικώς πολυδύναμα καθώς παρέχουν μικρότερο εύρος διαφοροποιημένων κυτταρικών φαινοτύπων (Leeb και συν. 2010).

Τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα διαθέτουν πολυδυναμία αλλά και υψηλό δυναμικό δημιουργίας τερατωμάτων. Οι κλινικές τους εφαρμογές όμως είναι σπάνιες και αμφιλεγόμενες επειδή η χρήση τους εγείρει νομικά και ηθικά ζητήματα. Τα iPS κύτταρα είναι ένας νέος τύπος επαγόμενων βλαστικών κυττάρων. Η μέθοδος της επαγωγής τους περιλαμβάνει τον επανα-προγραμματισμό σωματικών κυττάρων σε πολυδύναμα κύτταρα μέσω της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων Oct-4, Sox2, c-Myc και Klf4 (Takahashi και συν. 2006). Τα iPS κύτταρα παρουσιάζουν ομοιότητες με τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα τόσο στην μορφολογία και την ικανότητα πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης, όσο και στη γονιδιακή έκφραση (Amabile και Meissner, 2010). Η μεγάλη πρόοδος στην έρευνα για τα βλαστοκύτταρα από αναπρογραμματισμό των σωματικών κυττάρων, αναμένεται να οδηγήσει στο μέλλον και σε κλινικές τους εφαρμογές.

Τα βλαστοκύτταρα των ενηλίκων ιστών ανευρίσκονται στους περισσότερους διαφοροποιημένους ιστούς και όργανα του οργανισμού και έχουν συγκεντρώσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας λόγω της ικανότητας τους να παρέχουν διαφοροποιημένα κύτταρα, πέραν του ιστού προέλευσής τους, μετά από κατάλληλα ερεθίσματα *in vitro* (Leeb και συν. 2010). Οι αναγεννητικές ιδιότητες των ενήλικων βλαστοκυττάρων, όπως είναι και τα βλαστικά κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης

INTRODUCTION

Stem cells by definition have the ability to self-renew as well as to differentiate into various cell types. They have been shown to undergo asymmetric cell division resulting in one daughter cell that remains undifferentiated (pluripotent) and another daughter one which undergoes further divisions to give rise to differentiated cells (Morrison et al. 1997, Parker et al. 2004). According to their differentiation potential, stem cells can be classified as totipotent, pluripotent and multipotent. The first ones are those that can be implanted in the uterus of a living animal and generate a complete organism. Only the cells deriving from early zygote's divisions are considered totipotent. Pluripotent stem cells are those that can give rise to every cell of a developing organism except its extra-embryonic tissues, such as the placenta. Embryonic stem cells (ES cells) derived from the inner cell mass of an early embryo, as well as the induced pluripotent stem cells (iPS cells) are considered pluripotent. Finally, adult tissue stem cells (AS cells) owning a less extended differentiation potential are characterized as multipotent (Leeb et al. 2010).

Embryonic stem cells are pluripotent, but at the same time they have a high neoplastic potential; therefore, their clinical use is rare and raises legal and ethical issues. iPS cells are a new, inducible type of stem cells. The method for iPS cell creation comprises the reprogramming of somatic cells into pluripotent through the induced expression of the transcription factors Oct-4, Sox2, c-Myc and Klf4 (Takahashi and Yamanaka, 2006). iPS cells show similar morphology, proliferation, differentiation capacity and gene expression with embryonic stem cells (Amabile and Meissner, 2009). The breakthrough progress achieved by reprogramming of somatic cells into stem cells is expected to be translated into clinical applications in the near future.

Adult stem cells reside in most differentiated tissues and organs of the organism. They have attracted the research interest due to their capacity to differentiate into several cell types upon *in vitro* stimulation (Leeb et al. 2010). Mesenchymal stem cells (MSCs) in particular are intensely studied as to their potential clinical applications (Huang et al. 2009); under specific culture conditions, they can differentiate into osteoblast-like cells and generate three-dimensional bone constructs when co-cultured with compatible scaffolds (Seong et al. 2010). The transplantation of MSCs-scaffold biocomplexes at bone defect sites has been shown to promote bone repair through new bone formation, by the transplanted MSCs (Schroeder and Mosheiff, 2011), or/and through the MSCs–induced stimulation of the recipient tissue's stem cells towards this direction (Schindeler et al. 2008).

Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMMSCs) are the ones eminently authorized and successfully used for restoration of bone defects (Seong et al. 2010), constituting the 'gold standard' for the characterization

(mesenchymal stem cells, MSCs), ενθαρρύνουν την έρευνα με στόχο τη θεραπευτική χρήση των κυττάρων αυτών στην κλινική πράξη (Huang και συν. 2009). Υπό ειδικές συνθήκες καλλιέργειας, τα MSCs δύνανται να διαφοροποιηθούν *in vitro* προς οστεοβλαστική κατεύθυνση, ενώ η συν-καλλιέργειά τους με κατάλληλα ικριώματα επιτρέπει τη δημιουργία τρισδιάστατων βιολογικών οστικών κατασκευών (Seong και συν. 2010). Η τοποθέτηση του βιοσυμπλέγματος MSCs-ικριώματος σε οστικές βλάβες στοχεύει στην οστική αποκατάσταση, είτε μέσω της δημιουργίας νέου οστού από τα οστεο-διαφοροποιημένα βλαστικά κύτταρα (Schroeder και Mosheiff, 2011), ή/και μέσω της διέγερσης των βλαστοκυττάρων του ιστού υποδοχής (Schindeler και συν. 2008).

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα του μυελού των οστών (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMMSCs) είναι τα κατεξοχήν εντεταλμένα για την οστική επιδιόρθωση και έχουν χρησιμοποιηθεί πειραματικά με επιτυχία για την αποκατάσταση οστικών βλαβών (Seong και συν. 2010). Λόγω του εκτενούς χαρακτηρισμού τους, αποτελούν τη σταθερά σύγκρισης για τους πληθυσμούς μεσεγχυματικών κυττάρων που ανακαλύπτονται σε άλλους ιστούς (Huang και συν. 2009). Τα πρώτα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα οδοντικής προέλευσης απομονώθηκαν από τον πολφό μονίμων τρίτων γομφίων και ονομάστηκαν οδοντικά πολφικά βλαστικά κύτταρα (dental pulp stem cells, DPSCs) (Gronthos και συν. 2000). Η κύρια λειτουργία των κυττάρων αυτών είναι η παραγωγή τεταρτοταγούς/επανορθωτικής οδοντίνης μετά από τραυματισμό της μύλης του δοντιού (About και συν. 2001, Batouli και συν. 2003). Εντούτοις, τα DPSCs δύνανται να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα που μοιάζουν με οστεοβλάστες (Laino και συν. 2005, 2006α) και παράγουν εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και πρωτογενή οστίτη ιστό in vitro (Laino και συν. 2006β). Επιπλέον, τα DPSCs δύνανται να παράγουν ώριμο επαρκώς αγγειούμενο οστό, όταν εμφυτεύονται *in vivo* σε ανοσοκατεσταλμένους επίμυες (D'Aquino και συν. 2007, Graziano και συν. 2008). Ο οδοντικός πολφός φαίνεται να αποτελεί μια εύκολα προσβάσιμη πηγή βλαστικών κυττάρων που δύνανται να διαφοροποιηθούν προς οστεοβλάστες και δυνάμει να χρησιμοποιηθούν θεραπευτικά για την προαγωγή της οστικής αναγέννησης.

Ο σκοπός της παρούσας ανασκόπησης είναι η συγκέντρωση των ευρημάτων της έρευνας για τα βλαστοκύτταρα του οδοντικού πολφού και η ανάδειξη πιθανών θεραπευτικών τους εφαρμογών στην αποκατάσταση των οστικών ελλειμμάτων.

ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΟΔΟΝΤΙΚΟΥ ΠΟΛΦΟΥ

Ο οδοντικός πολφός είναι ένας ιστός μεσεγχυματικής προέλευσης και εμπεριέχει βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από την κρανιακή μοίρα της νευρικής ακρολοφίας. Η νευρική ακρολοφία είναι ένας πληθυσμός εμβρυικών

of mesenchymal stem cell populations from other tissues (Huang et al. 2009). The first mesenchymal stem cells of dental origin were isolated from the dental pulp of permanent third molars and termed dental pulp stem cells (DPSCs) (Gronthos et al. 2000); their main function is the production of tertiary/reparative dentine following trauma or caries of dental crown (About et al. 2001, Batouli et al. 2003). Additionally, DPSCs can differentiate into osteoblast-like cells (Laino et al. 2005, 2006a) that secrete abundant extracellular matrix and can build a woven bone *in vitro* (Laino et al. 2006b). Moreover, DPSCs are capable of forming a complete and well-vascularised lamellar bone after grafting into immunocompromised rats (D'Aquino et al. 2007, Graziano et al. 2008). Dental pulp appears thus to be an easily accessible source of stem cells that can differentiate into osteoblasts and potentially be used therapeutically for promoting bone regeneration.

The aim of the present review is to summarize research findings on dental pulp stem cells focusing on their potential therapeutic applications in bone defects.

EMBRYOLOGICAL ORIGIN AND LOCATION OF DENTAL PULP STEM CELLS

Dental pulp is a soft tissue of mesenchymal origin that contains stem cells derived from cranial neural crest cells. Neural crest is an embryonic cell population localized in between the neural tube and the epidermis in the vertebrate embryo. Neural crest cells spread over the embryo and migrate to various tissues where they differentiate into several cell types (Achilleos and Trainor, 2012). The neural crest cells can be classified into four distinct populations: cranial, cardiac, vagal and trunk. Cranial neural crest cells play an important role for craniofacial development. Specifically, they generate most of the connective tissue of the head and contribute to the formation of the dental mesenchyme, dental papilla, odontoblasts, dentine matrix, pulp, cementum, periodontal ligaments, Meckel's chondrocytes, mandible and branchial arch nerve ganglia (Chai et al. 2000).

Dental pulp consists of loose connective tissue, fibroblasts, odontoblasts, collagen, extracellular glycosaminoglycans, nerves and blood vessels and is divided into four layers. The external layer separates the dental pulp form the dentine and contains odontoblasts and Hohl's preodontoblasts (Goldberg and Smith, 2004). The second layer, called 'cell free zone', is poor in cells and rich in collagen, whereas the third layer or 'cell rich zone' includes also the stem cells (Ibuki et al. 2002). The innermost layer or core of the pulp comprises the vascular plexus and nerves. Stem cells of the human dental pulp have been isolated from permanent teeth (Gronthos et al. 2000), as well as from exfoliated deciduous teeth (Miura et al. 2003).

κυττάρων που εντοπίζεται μεταξύ του νευρικού σωλήνα και της επιδερμίδας στο έμβρυο των σπονδυλωτών. Τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας εξαπλώνονται κατά μήκος του εμβρύου και μεταναστεύουν σε διάφορους ιστούς όπου και διαφοροποιούνται σε μια μεγάλη ποικιλία κυτταρικών τύπων (Achilleos και Trainor, 2012). Η νευρική ακρολοφία διαιρείται σε τέσσερις μοίρες: την κρανιακή, την καρδιακή, την πνευμονογαστρική και την κεντρική. Η κρανιακή μοίρα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του κρανιοπροσωπικού συμπλέγματος. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα της μοίρας αυτής συμβάλλουν στο σχηματισμό του συνδετικού ιστού της κεφαλής, του οδοντικού μεσεγχύματος, της οδοντικής θηλής, των οδοντινοβλαστών, της θεμέλιας ουσίας της οδοντίνης, του πολφού, της οστεΐνης, των περιοδοντικών συνδέσμων, των χονδροκυττάρων του Meckel, της κάτω γνάθου και των νευρικών γαγγλίων του βραγχιακού τόξου (Chai και συν. 2000).

Ιστολογικά, ο οδοντικός πολφός αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό, ινοβλάστες, οδοντινοβλάστες, κολλαγόνο, εξωκυττάριες γλυκοζαμινογλυκάνες, νεύρα, αιμοφόρα αγγεία και διαιρείται σε τέσσερις στιβάδες. Η εξωτερική στιβάδα βρίσκεται σε επαφή με την οδοντίνη και αποτελείται από οδοντινοβλάστες, αλλά και προοδοντινοβλάστες της στιβάδας του Hohl (Goldberg και Smith, 2004). Η δεύτερη στιβάδα ή ακύτταρη ζώνη, είναι φτωχή σε κύτταρα και πλούσια σε κολλαγόνες ίνες, ενώ η τρίτη στιβάδα ή κυτταροβριθής ζώνη, εμπεριέχει βλαστικά κύτταρα (Ibuki και συν. 2002). Πράγματι, βλαστοκύτταρα έχουν απομονωθεί από τον οδοντικό πολφό μονίμων δοντιών (Gronthos και συν. 2000), αλλά και αποπιπτόντων νεογιλών δοντιών (Miura και συν. 2003). Το εσώτερο τμήμα ή πυρήνας του πολφού απαρτίζεται από τα αιμοφόρα αγγεία και το νευρικό πλέγμα.

Τα βλαστικά κύτταρα ανευρίσκονται σε ειδικές ανατομικές θέσεις του οδοντικού πολφού, που καλούνται «φωλεές». Το μικροπεριβάλλον της φωλεάς ρυθμίζει τη συμμετοχή των βλαστοκυττάρων στην επιδιόρθωση και αναγέννηση των ιστών. Ειδικά σήματα προερχόμενα από συγκεκριμένες περιοχές της φωλεάς επιτρέπουν τη διατήρηση της δεξαμενής των βλαστοκυττάρων και καθορίζουν τις αλλαγές στον αριθμό τους και την κυτταρική τους μοίρα (Watt και Hogan, 2000). Μια μεγάλη ποικιλία διαλυτών παραγόντων, όπως είναι οι αυξητικοί παράγοντες Wnt, Notch, Hedgehog και FGFs, ρυθμίζουν τη λειτουργία, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων εντός της φωλεάς (Mitsiadis και συν. 2007). Στον οδοντικό πολφό, οι βλαστοκυτταρικές φωλεές εντοπίζονται κυρίως, αλλά όχι αποκλειστικά, στις περιαγγειακές περιοχές (Tecles και συν. 2005, Løvschall και συν. 2005).

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΟΔΟΝΤΙΚΟΥ ΠΟΛΦΟΥ

Τα βλαστικά κύτταρα του οδοντικού πολφού μονίμων δοντιών (DPSCs) αποτελούν, όπως αναφέρθηκε, τα

Stem cells reside in the niches, specific anatomic locations of dental pulp. The microenviroment of the niche regulates how stem cell populations participate in tissue repair and regeneration; specific signals derived from precise areas of the niche guide stem cells to maintain their vitality or to change their number and fate (Watt and Hogan, 2000). A large variety of soluble signals, such as the growth factors Wnt, Notch, Hedgehog and FGFs, regulates stem cell function, proliferation and differentiation in the niche (Mitsiadis et al. 2007). Stem cell niches are predominately, but not exclusively, located in the perivascular areas of the dental pulp (Tecles et al. 2005; Løvschall et al. 2005).

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF DENTAL PULP STEM CELLS

Dental pulp stem cells (DPSCs) of permanent teeth are the first identified stem cells of dental origin. These cells, isolated from impacted third molars, exhibit clonogenic and high proliferative activity that is maintained even after several passages (Gronthos et al. 2000). Notably, the *in vitro* proliferation rate of DPSCs is significantly higher than that of BMMSCs, probably because third molars appear later in development compared to bone marrow. However, similarly to the BMMSCs, colonies with different growth rates have been identified within the same culture (Gronthos et al. 2002).

DPSCs are positive for the mesenchymal stem cell surface markers CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, Oct-4 and STRO-1, but show weak or no expression of CD14, CD24, CD34, CD45 and HLA-DR surface antigens (Lindroos et al. 2008; Huang et al. 2009). Since DPSCs comprise a heterogenous cell population, there is no specific marker for them and their identification is based on the simultaneous detection by flow cytometry of a handful of mesenchymal stem cell markers (Kawashima, 2012). Laino and coworkers isolated a subpopulation of DPSCs, the 'stromal bone producing dental pulp stem cells' (SBP-DPSCs) that strongly express the markers c-kit, CD34 and STRO-1 (Laino et al. 2005, 2006a, Papaccio et al. 2006). STRO-1 is believed to mark dental pulp cells that exhibit both odontogenic and multilineage differentiation potential (Yang et al. 2007a,b), whereas, c-kit and CD34 co-expression is indicative of cells with neural crest origin (Garcia-Pacheco et al. 2001, Laino et al. 2005, 2006a). The SBP-DPSCs subpopulation represents the 10% of dental pulp cells and can differentiate into smooth muscle cells, adipocytes, neurons and osteoblasts.

Upon cryopreservation the DPSCs retain their multipotency and their capacity to proliferate and produce mineralized matrix, in a manner similar to freshly harvested cells (Laino et al. 2005, 2006a, Papaccio et al. 2006). The potential cryopreservation of DPSCs for more than two

πρώτα βλαστοκύτταρα οδοντικής προέλευσης που ταυτοποιήθηκαν. Ο κυτταρικός πληθυσμός, που απομονώνεται από τον πολφικό ιστό εγκλείστων τρίτων γομφίων, χαρακτηρίζεται από ταχύτατο πολλαπλασιασμό και την ικανότητα σχηματισμού κλωνογενών αποικιών. Συγκεκριμένα, ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των DPSCs *in vitro* είναι σημαντικά υψηλότερος αυτού των αντίστοιχων κυττάρων του μυελού των οστών (BMMSCs), πιθανώς λόγω του πρωιμότερου σταδίου ανάπτυξης του τρίτου γομφίου σε σχέση με το μυελό των οστών ενηλίκων. Ο υψηλός αυτός ρυθμός πολλαπλασιασμού διατηρείται ακόμα και μετά από πολλές ανακαλλιέργειες (Gronthos και συν. 2000). Η διακύμανση ωστόσο της κυτταρικής πυκνότητας στις αποικίες των DPSCs υποδηλώνει ότι, όπως συμβαίνει και στα BMMSCs, κάθε κυτταρικός κλώνος ενδέχεται να παρουσιάζει διαφορετικό ρυθμό πολλαπλασιασμού (Gronthos και συν. 2002).

Τα DPSCs εκφράζουν τους επιφανειακούς δείκτες των βλαστοκυττάρων μεσεγχυματικής προέλευσης CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, Oct-4 και STRO-1, ενώ δεν εκφράζουν ή εκφράζουν ασθενώς τους δείκτες CD14, CD24, CD34, CD45 και HLA-DR (Lindroos και συν. 2008, Huang και συν. 2009). Δείκτης χαρακτηριστικός για τα DPSCs δεν υπάρχει, καθώς αποτελούν ένα μικτό ετερογενή κυτταρικό πληθυσμό και η ταυτοποίησή τους βασίζεται στον εντοπισμό ενός συνόλου δεικτών μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής (Kawashima, 2012). Οι Laino και συνεργάτες απομόνωσαν έναν επιλεγμένο υποπληθυσμό των DPSCs, τα SBP-DPSCs (stromal bone producing dental pulp stem cells) που εκφράζουν ισχυρά τους δείκτες c-kit, CD34 και STRO-1 (Laino και συν. 2005, 2006α, Papaccio και συν. 2006). Ο δείκτης STRO-1 διαχωρίζει τα κύτταρα του οδοντικού πολφού που, εκτός από οδοντινοβλάστες, δύνανται να διαφοροποιηθούν και προς άλλους κυτταρικούς τύπους (Yang και συν. 2007α, 2007β). Επιπλέον, η ταυτόχρονη έκφραση των δεικτών c-kit και CD34 είναι ενδεικτική των κυττάρων με προέλευση από την νευρική ακρολοφία (, Garcia-Pacheco και συν. 2001, Laino και συν. 2005, 2006α). Τα SBP-DPSCs αντιπροσωπεύουν το 10% του συνολικού αριθμού των κυττάρων του οδοντικού πολφού και είναι ικανά να διαφοροποιηθούν προς λεία μυϊκά κύτταρα, λιποκύτταρα, νευρώνες και οστεοβλάστες.

Μετά από κρυοσυντήρηση, τα DPSCs ανακτούν την πολυδυναμία τους και το δυναμικό πολλαπλασιασμού και παραγωγής ενασβεστιωμένων εναποθέσεων, σε βαθμό ανάλογο με τα φρέσκα κύτταρα (Laino και συν. 2005, 2006α, Papaccio και συν. 2006). Η δυνατότητα ψύξης και επαναχρησιμοποίησης των DPSCs μετά από μακρό χρονικό διάστημα, μεγαλύτερο των δύο ετών, επιτρέπει τη δημιουργία μιας τράπεζας οδοντικών βλαστοκυττάρων για μελλοντικές χρήσεις (Papaccio και συν. 2006, Tirino και συν. 2012). Επιπρόσθετα, τα DPSCs, ανάλογα με τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα άλλων ιστών εμφανίζουν ανοσορρυθμιστικές / ανοσοκατασταλτικές ιδιοτήτες (Pierdomenico και συν. 2005, Tirino και συν. 2012).

years and their subsequent recovery allows for the establishment of a stem-cell bank for future applications (Papaccio et al. 2006, Tirino et al. 2012). Additionally, DPSCs, similarly to mesenchymal stem cells from other sources, exhibit immunomodulatory / immunosuppressive properties (Pierdomenico et al. 2005, Tirino et al. 2012).

ROLE OF DENTAL PULP STEM CELLS IN DENTIN REGENERATION

The main role of differentiating DPSCs in culture is the formation of mineralized tissues (Shi and Gronthos, 2003; Luisi et al. 2007; Wei et al. 2007), similar to dentin (Kitagawa et al. 2007). This observation is consistent with the physiological role of these cells, which is the production of tertiary dentin after crown injury (Abou et al. 2001, Batouli et al. 2003). Within healthy teeth, DPSCs maintain a quiescent state in the stem cell niches. In case of dental caries or trauma, the activated, by the secretion of growth factors, DPSCs proliferate rapidly and differentiate into odontoblasts that produce tertiary dentin (Sloan and Waddington, 2009). During odontogenesis, DPSCs are additionally involved in the development of several hard tissues, other than dentin, including cementum and alveolar bone (Bosshardt, 2005). A role in root absorption of deciduous teeth has also been hypothesized for DPSCs (Yildirim et al. 2008).

Although they share a similar immunophenotype *in vitro*, DPSCs produce more densely calcified nodules, compared to BMMSCs. After being loaded on HA/TCP scaffolds and subcutaneously transplanted in animals, DPSCs underwent odontoblastic differentiation and produced dentine and pulp-like structures. In contrast, BMMSCs were differentiated into osteoblasts and produced lamellar bone surrounded by fibrous vascular tissue and lipocytes (Gronthos et al. 2000). The odontoblastic potential of DPSCs is enhanced when these cells are placed onto dentin surfaces in vivo (Batouli et al. 2003) or exposed to appropriate agents (Tonomura et al. 2007). The ectopic *in vivo* transplantation of DPSCs into an emptied human root canal space (5-6mm deep with only one opening end) resulted in the *de novo* synthesis of vascularized pulp/dentin-like tissues. Interestingly, the produced layer of dentin-like tissue along the existing dentinal walls of the root canal was continuous and of uniform thickness. However, this newly formed tissue differed in morphology from natural dentin resembling tertiary dentin (Huang et al. 2010). Additionally, DPSCs can produce pulp-like tissue with well-developed nervous and vascular plexus after their *in vivo* placement in the root canal of pulpotomized teeth (Nakashima et al. 2009). The presented in vivo experimental findings suggest that DPSCs may potentially contribute to the whole tooth regeneration (Duailibi et al. 2008).

Notably, under appropriate stimulation *in vitro* DPSCs

ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΟΔΟΝΤΙΚΟΥ ΠΟΛΦΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΤΗΣ ΟΔΟΝΤΙΝΗΣ

Η κύρια λειτουργία των διαφοροποιούμενων DPSCs σε καλλιέργεια φαίνεται να είναι η παραγωγή ενασβεστιωμένων ιστών (Shi και Gronthos, 2003, Luisi και συν. 2007, Wei και συν. 2007), όμοιων με οδοντίνη (Kitagawa και συν. 2007). Η παρατήρηση αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με το φυσιολογικό ρόλο των κυττάρων αυτών, που είναι η παραγωγή τεταρτοταγούς οδοντίνης μετά από τραυματισμό της μύλης του δοντιού (About και συν. 2001, Batouli και συν. 2003). Σε ένα υγιές δόντι, τα DPSCs παραμένουν ανενεργά εντός των βλαστοκυτταρικών «φωλεών». Σε περίπτωση τερηδονικής προσβολής ή τραύματος, τα DPSCs ενεργοποιούνται από την έκκριση αυξητικών παραγόντων, πολλαπλασιάζονται ταχύτατα και διαφοροποιούνται σε οδοντινοβλάστες που παράγουν τεταρτοταγή οδοντίνη (Sloan και Waddington, 2009). Κατά τη οδοντογένεση, τα DPSCs συμμετέχουν στην ανάπτυξη της οδοντίνης και άλλων σκληρών ιστών, όπως της οστεΐνης και του φατνιακού οστού (Bosshardt, 2005). Τα κύτταρα αυτά φαίνεται επίσης ότι συμμετέχουν στη ρύθμιση της απορρόφησης των ριζών των νεογιλών δοντιών (Yildirim και συν. 2008).

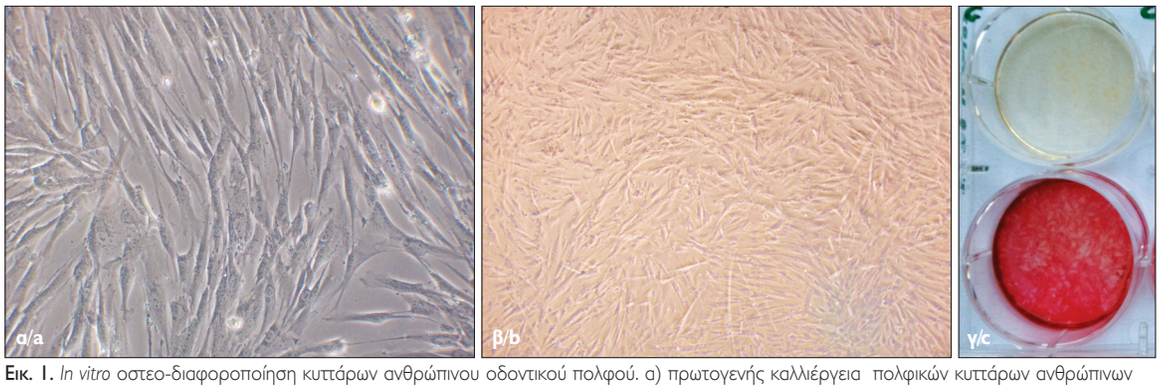
Αν και χαρακτηρίζονται από παρόμοιο ανοσοφαινότυπο *in vitro*, τα DPSCs παράγουν πυκνότερες εναποθέσεις ασβεστίου σε σύγκριση με τα BMMSCs. Η υποδόρια εμφύτευση των DPSCs με ικρίωμα HA/TCP σε πειραματόζωα προαγάγει την οδοντοβλαστική διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών και οδηγεί στο σχηματισμό δομών όμοιων με οδοντίνη και πολφό. Σε αντίθεση, τα BMMSCs διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες και σχηματίζουν δοκιδώδες οστό που περιβάλλεται από ινώδη αγγειακό ιστό και λιποκύτταρα (Gronthos και συν. 2000). Η οδοντοβλαστική διαφοροποίηση των DPSCs ενισχύεται μετά από την τοποθέτηση τους *in vivo* σε επιφάνεια οδοντίνης (Batouli και συν. 2003) ή την έκθεση τους σε κατάλληλους παράγοντες (Tonomura και συν. 2007). Η έκτοπη *in vivo* εμφύτευση των DPSCs εντός κενού ριζικού σωλήνα μήκους 5-6mm με ένα μόνο ανοιχτό άκρο συνεπάγεται την *de novo* σύνθεση αγγειούμενων ιστών που μοιάζουν με οδοντίνη και πολφό. Το παραγόμενο στρώμα της οδοντίνης είναι συνεχές κατά μήκος των οδοντινικών τοιχωμάτων του ριζικού σωλήνα, αν και διαφέρει μορφολογικά από τη φυσιολογική οδοντίνη (μοιάζει περισσότερο με τεταρτοταγή οδοντίνη) (Huang και συν. 2010). Τα DPSCs παράγουν *in vivo* πολφικό ιστό με αναπτυγμένο νευρικό και αγγειακό πλέγμα μετά την τοποθέτησή τους στον πολφικό θάλαμο πολφοτομημένων δοντιών (Nakashima και συν. 2009). Τα *in vivo* πειραματικά δεδομένα που αναφέρθηκαν δείχνουν ότι η αναγέννηση ολόκληρου δοντιού είναι δυνητικά εφικτή (Duailibi και συν. 2008) και στην κατεύθυνση αυτή μπορούν να συμβάλλουν και τα DPSCs.

Σημειώνεται ότι τα DPSCs, εκτός από οδοντινοβλάστες, δύνανται να διαφοροποιηθούν προς οστεοβλάστες, λιπαρά κύτταρα, νευρικά κύτταρα και μυϊκά κύτταρα (Gronthos et al. 2000, 2002, Kadar et al. 2009, Huang et al. 2010, Rizk and Rabie, 2013).

OSTEOBLASTIC DIFFERENTIATION OF DENTAL PULP STEM CELLS

The differentiation of DPSCs towards the osteoblastic lineage can be induced *in vitro* by adding dexamethazone, β-glycerophosphate and ascorbic acid in the culture medium (Kadar et al. 2009, Seong et al. 2010, Yu et al. 2010). Alternatively, the osteoblastic differentiation of DPSCs can be stimulated by increasing the content of fetal bovine serum (FBS) in the culture medium to 20% (Laino et al. 2005, D'Aquino et al. 2007). Under the trigger of the osteoinductive factors, the spindle-shaped and fibroblast-like DPSCs gradually change morphology towards cuboidal, osteoblast-like cells. At the same time, positive Alizarin staining reveals the production of sporadic calcified nodules throughout the adherent layer of DPSCs (Kadar et al. 2009) (Fig. 1). Although DPSCs share a similar immunophenotype with BMMSCs, they produce *in vitro* more densely calcified nodules. In the first place, DPSCs aggregate and form sparsely scattered hemispheric ossification centers that later on grow up to build rounded 3D calcified structures (Laino et al. 2005, 2006a). The strong expression of CD44, osteocalcin and Runx-2 (Laino et al. 2006a) as well as the activation of alkaline phosphatase (D'Aquino et al. 2007) confirm the differentiation of DPSCs towards the osteoblastic lineage and the onset of ossification.

Unlike DPSCs that produce only sporadic calcified nodules (Gronthos et al. 2000), the subpopulation of SBP-DPSCs seems to exert a stronger osteo-differentiation potential, as these cells promote *in vitro* the production of bone but not dentin (Laino et al. 2005). Moreover, during their differentiation process, SBP-DPSCs diverge into two subtypes expressing different surface antigens: the approximately 70% of them becomes Flk-1$^+$/STRO-1$^+$/CD44$^+$/RUNX-2$^+$ osteogenic progenitors, whereas the remaining 30% becomes Flk-1$^+$/STRO-1$^+$/CD44$^+$/CD54$^+$ endothelial cells. Additionally, these cells do not express dentin sialophosphoprotein (DSPP), a marker of odontoblastic differentiation, denoting that the hard tissue they produce is bone and not dentin (D'Aquino et al. 2007). The woven bone tissue generated *in vitro* by SBP-DPSCs is called living autologous bone (LAB) (Laino et al. 2005). When LAB is transplanted subcutaneously in experimental animals, it is remodeled into lamellar bone with embedded osteocytes (Laino et al. 2005, 2006a, D'Aquino et al. 2007). This *in vivo* remodeling of woven bone into mature bone is achieved through the parallel differentiation of SBP-DPSCs into osteoblasts and endotheliocytes. The newly formed bone contains blood vessels, implying complete integration with the host tissues. In particular, complete Haver's channels, containing blood



Εικ. 1. *In vitro* οστεο-διαφοροποίηση κυττάρων ανθρώπινου οδοντικού πολφού. α) πρωτογενής καλλιέργεια πολφικών κυττάρων ανθρώπινων εγκλείστων τρίτων γομφίων 3 εβδομάδες μετά από τη λήψη του ιστού, μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων ×400, β) καλλιέργεια 2 εβδομάδες μετά την οστεο-επαγωγή των κυττάρων, μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων ×50, γ) ανίχνευση εναποθέσεων ασβεστίου σε τρυβλίο καλλιέργειας 3 εβδομάδες μετά από την οστεο-επαγωγή (κάτω), κόκκινο χρώμα/ χρώση αλιζαρίνης, (πάνω: ομάδα ελέγχου, χωρίς οστεο-επαγωγή).

Προέλευση εικόνας από τα αποτελέσματα της διπλωματικής εργασίας της Α. Καπαρού, Αθήνα, 2012.

Fig. 1. *In vitro* osteo-differentiation of dental pulp cells a) human dental pulp cells obtained from impacted third molars, after three weeks in culture, phase contrast microscope ×400, b) primary culture 2 weeks after the osteo-induction, phase contrast microscope ×50, c) detection of calcium deposits in the culture wells 3 weeks after the osteo-induction (bottom panel), red colour denotes alizarin staining, (top panel: control group: cells without induction).

Figure is drawn from the MSc Dissertation of A. Kaparou, Athens, 2012.

ποκύτταρα, χονδροκύτταρα, νευρικά και μυϊκά κύτταρα με την εφαρμογή κατάλληλων ερεθισμάτων *in vitro* (Gronthos και συν. 2000, 2002, Kadar και συν. 2009, Huang και συν. 2010, Rizk και Rabie 2013).

ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΟΔΟΝΤΙΚΟΥ ΠΟΛΦΟΥ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ

Η επαγωγή της διαφοροποίησης των DPSCs προς οστεοβλαστική κατεύθυνση επιτυγχάνεται *in vitro* με την προσθήκη καλλιέργειας δεξαμεθαζόνης, β-φωσφορικής γλυκερόλης και ασκορβικού οξέος στο θρεπτικό μέσο (Kadar και συν. 2009, Seong και συν. 2010, Yu και συν. 2010). Εναλλακτικά, η οστεοβλαστική διαφοροποίηση των DPSCs διεγείρεται με αύξηση της περιεκτικότητας του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας σε βόειο εμβρυικό ορό (fetal bovine serum, FBS) στο 20% (Laino και συν. 2005, D'Aquino και συν. 2007). Υπό την επίδραση των οστεο-επαγωγικών παραγόντων, τα DPSCs μετατρέπονται σταδιακά από ινοβλαστικής φύσεως κύτταρα ατρακτοειδούς σχήματος, σε κυβοειδή κύτταρα, ομοιάζοντα με οστεοβλάστες, ενώ κατά το ίδιο διάστημα η θετική χρώση με αλιζαρίνη αποκαλύπτει την παραγωγή σποραδικών ενασβεστιωμένων εναποθέσεων (Kadar και συν. 2009) (Εικ. 1). Αν και χαρακτηρίζονται από παρόμοιο ανοσοφαινότυπο, τα DPSCs παράγουν πυκνότερες εναποθέσεις ασβεστίου in vitro σε σύγκριση με τα BMMSCs. Τα DPSCs συναθροίζονται και σχηματίζουν αρχικά διάσπαρτα ημισφαιρικά κέντρα ενασβεστίωσης, που εξελίσσονται σε σφαιρικές τρισδιάστατες ενασβεστιωμένες κατασκευές (Laino και συν. 2005, 2006α). Η ισχυρή έκφρα-

vessels and surrounded by lamellar bone are observed (D'Aquino et al. 2007).

A major limitation for *in vitro* bone formation is the inability of stem cells to form a complete tissue rather than a monolayer of cells surrounded by a mineralized matrix. Some studies suggest that DPSCs are better candidates for bone tissue engineering with respect to BMMSCs, due to their higher proliferation rate and efficiency in producing bone chips (D'Aquino et al. 2008, 2009). The co-culture of stem cells with suitable scaffolds enhances the production of 3D calcified nodules (Zhang et al. 2006, Graziano et al. 2008, Seong et al. 2010). The thickness of the newly formed bone tissue depends on the shape and texture of the used biomaterial. A coarse and concave scaffold surface can favor the growth of a thicker bone, compared to a smooth and convex surface (Graziano et al. 2008). These observations highlight the importance of appropriate scaffolds for DPSCs in both experimental and clinical bone engineering studies (Fig. 2).

APPLICATIONS OF DENTAL PULP STEM CELLS IN BONE REGENERATION

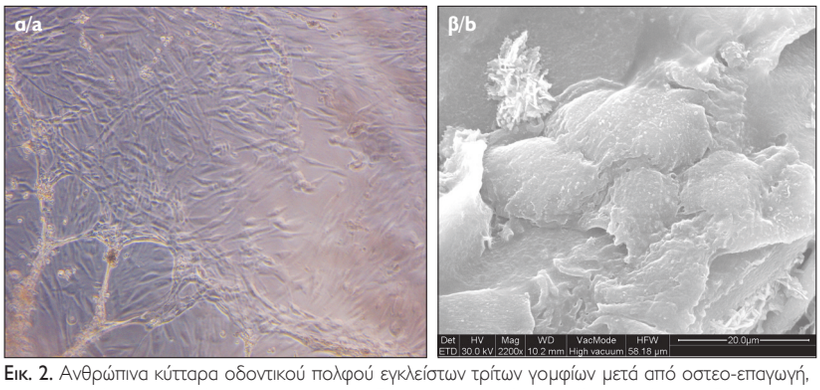
Data obtained from *in vitro* studies confirmed the osteogenic potential of DPSCs and encouraged further research on their application to enhance / accelerate the healing process of critical size bone defects in animal models. Yamada et al (2011) used DPSCs, exfoliated deciduous teeth (SHEDs) or BMMSCs in combination with platelet rich plasma (PRP) as an autologous scaffold to regenerate bone in mandibular bone defects of dogs. Notably, the *in vivo* osteogenic potential of DPSCs was not found to be significantly higher against SHEDs or

ση του CD44, της οστεοκαλσίνης, του Runx-2 (Laino και συν. 2006α) και η ενεργοποίηση της αλκαλικής φωσφατάσης (D'Aquino και συν. 2007) επιβεβαιώνουν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση των DPSCs και την έναρξη της ενασβεστίωσης.

Σε αντίθεση με τα DPSCs που παράγουν σποραδικές μόνον ενασβεστιωμένες εναποθέσεις (Gronthos και συν. 2000), ο υποπληθυσμός των SBP-DPSCs φαίνεται να διαθέτει ισχυρότερο δυναμικό οστεο-διαφοροποίησης, καθώς διεγείρει *in vitro* το σχηματισμό πρωτογενούς οστίτη ιστού αλλά όχι οδοντίνης (Laino και συν. 2005). Κατά τη διαδικασία της διαφοροποίησης ειδικότερα, τα SBP-DPSCs τροποποιούν την έκφραση των επιφανειακών τους αντιγόνων και έτσι διαχωρίζονται σε δύο κυτταρικούς υποπληθυσμούς. Ο πρώτος αποτελείται από Flk-1$^+$/STRO-1$^+$/CD44$^+$/RUNX-2$^+$ οστεογενετικά προγονικά κύτταρα και αντιπροσωπεύει το 70% του συνόλου, ενώ ο δεύτερος απαρτίζεται από Flk-1$^+$/ STRO-1$^+$/CD44$^+$/CD54$^+$ ενδοθηλιακά κύτταρα και κατέχει το υπόλοιπο 30% του συνόλου. Ταυτόχρονα, το γεγονός ότι τα κύτταρα αυτά δεν εκφράζουν την σιαλοφωσφοπρωτεΐνη της οδοντίνης (dentin sialophosphoprotein, D-SPP), ένα σημαντικό δείκτη οδοντοβλαστικής διαφοροποίησης, ενισχύει την πεποίθηση ότι τα κύτταρα αυτά παράγουν οστό και όχι οδοντίνη (D'Aquino και συν. 2007). Το οστό που παράγεται in vitro από την διαφοροποίηση των SBP-DPSCs καλείται «ζωντανό» αυτόλογο οστό (living autologous bone, LAB) (Laino και συν. 2005).

Συνακόλουθη υποδόρια εμφύτευση του «ζωντανού» αυτού οστού (LAB) σε πειραματόζωα έχει ως αποτέλεσμα την αναδιαμόρφωσή του και την οργάνωσή του σε ώριμο πεταλιώδες οστό με ενσωματωμένα οστεοκύτταρα (Laino και συν. 2005, 2006α, D'Aquino και συν. 2007). Η αναδιαμόρφωση του πρωτογενούς οστίτη ιστού σε ώριμο ενήλικο οστό μετά την *in vivo* εμφύτευσή του επιτυγχάνεται μέσω της σύγχρονης διαφοροποίησης των SBP-DPSCs σε οστεοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα. Το νεοσχηματισθέν οστό περιέχει αιμοφόρα αγγεία, γεγονός που υποδηλώνει την πλήρη ενσωμάτωσή του με τους ιστούς του ξενιστή. Συγκεκριμένα, παρατηρούνται κανάλια του Haver που περιέχουν αιμοφόρα αγγεία και περιβάλλονται από οστό με τυπική δοκιδώδη μορφολογία (D'Aquino και συν. 2007).

Η δημιουργία οστού από *in vitro* διαφοροποίηση πολυδύναμων κυττάρων περιορίζεται από την αδυναμία των βλαστοκυττάρων να παράγουν έναν ολοκληρωμένο ιστό αντί απλώς ένα στρώμα κυττάρων σε μια ενασβεστιωμένη μήτρα. Κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι τα DPSCs πλεονεκτούν σε αυτό, συγκριτικά με τα BMMSCs, χάρη στον υψηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού τους και την παραγωγή οστικών ρινισμάτων (bone chips) (D'Aquino και συν. 2008, 2009). Η συνκαλλιέργεια των βλαστικών κυττάρων με ικριώματα μπορεί να συμβάλλει στην παραγωγή τρισδιάστατων οστικών εναποθέσεων (Zhang και συν. 2006, Graziano και συν. 2008, Seong και συν. 2010). Η ποσότητα του παραγόμενου οστού ωστόσο, εξαρτάται από την υφή και



Εικ. 2. Ανθρώπινα κύτταρα οδοντικού πολφού εγκλείστων τρίτων γομφίων μετά από οστεο-επαγωγή, σε συνκαλλιέργεια με ικρίωμα υαλουρονικού οξέος α) μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων ×50, β) προσκόλληση των πολφικών κυττάρων στο ικρίωμα υαλουρονικού, ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, κλίμακα 20 μm.

Προέλευση εικόνων από τα αποτελέσματα της διπλωματικής εργασίας της Α. Καπαρού, Αθήνα, 2012.

Fig. 2. Human dental pulp cells of impacted third molars after osteo-induction, co-cultured with a hyalouronic acid scaffold a) phase contrast microscope ×50, b) cell attachment to the scaffold, scanning electron microscope (eSEM), scale bar 20 μm.

Figure is drawn from the MSc Dissertation of A. Kaparou, Athens, 2012.

BMMSCs, and all these three groups of stem cells led to well-formed mature vascularized bone formation compared with the control (defect only) and PRP groups. In another study, a biocomplex of recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2), DPSCs and a hydroxyapatite/collagen/polylactide (HAC/PLA) scaffold was used to reconstruct critical size alveolar defects in rabbits (Liu et al. 2011). The results showed that the HAC/PLA+DPSCs+rhBMP-2 complex enhanced mineralization and bone formation compared to the control groups. Interestingly, the treatment with above DPSCs biocomplex was clearly superior even against the use of autologous bone. Finally, a recent study showed that a subpopulation of human DPSCs (CD34- and flk- positive), seeded on fibroin scaffolds, enhance bone formation and lead to complete repair of critical size cranial defects in rats. The newly-formed bone was vascularized with typical lamellar configuration (Riccio et al. 2012).

In the only study so far performed in humans, autologous DPSCs were used to repair an alveolar bone defect produced secondary to unerupted, or partially erupted, third molar extraction. In some patients, destruction of the tooth socket during extraction of these teeth produces a two- or three- wall pocket and leads to vertical bone loss of at least 7mm that does not heal spontaneously. Treatment of this defect with DPSCs seeded on collagen scaffold resulted, three months post operatively, in a significant increase of the cortical level and clinical attachment, whereas one year later the alveolar bone ridge was fully restored (D'Aquino et al. 2009).

CONCLUSIONS

1. Dental pulp is a remarkable source of stem cells derived from cranial neural crest cells.

το σχήμα της επιφάνειας πάνω στην οποία αναπτύσσονται τα κύτταρα. Η αδρή και κοίλη επιφάνεια του ικριώματος φαίνεται πως ευνοεί την παραγωγή οστού, ενώ η λεία και κυρτή επιφάνεια δυσχεραίνει ή και αναστέλλει την οστική εναπόθεση (Graziano και συν. 2008). Τα ευρήματα αυτά τονίζουν την κρισιμότητα της ορθής επιλογής του ικριώματος πάνω στο οποίο θα καλλιεργηθούν τα DPSCs για την επιτυχή αποκατάσταση οστικών ελλειμμάτων τόσο σε πειραματικό όσο και σε κλινικό επίπεδο (Εικ. 2).

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΟΔΟΝΤΙΚΟΥ ΠΟΛΦΟΥ ΜΟΝΙΜΩΝ ΔΟΝΤΙΩΝ ΣΤΗΝ ΟΣΤΙΚΗ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ

Τα δεδομένα για το *in vitro* οστεογενετικό δυναμικό των DPSCs ενθάρρυναν την περαιτέρω έρευνα για την εφαρμογή τους στην ενίσχυση/επιτάχυνση της επούλωσης οστικών ελλειμμάτων κρίσιμου μεγέθους σε πειραματικά ζωικά μοντέλα. Στη μελέτη των Yamada και συν. τα DPSCs χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (platelet rich plasma, PRP) για την προαγωγή της οστικής επούλωσης σε οστικό έλλειμμα της κάτω γνάθου σκύλων, ενώ η δράση τους συγκρίθηκε με αυτή των βλαστοκυττάρων από τα αποπίπτοντα νεογιλά δόντια (SHEDs) και των BMMSCs. Στη εν λόγω μελέτη, η οστεογενετική δράση των DPSCs in vivo δεν ήταν υψηλότερη έναντι των SHEDs και BMMSCs και οι τρεις κατηγορίες κυττάρων σε συνδυασμό με το PRP οδήγησαν στην παραγωγή ώριμου αγγειούμενου οστίτη ιστού, συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου (Yamada και συν. 2011). Σε άλλο πειραματικό μοντέλο φατνιακών ελλειμμάτων κρίσιμου μεγέθους σε κουνέλια, τα DPSCs σε συνδυασμό με την ανασυνδυασμένη ανθρώπινη μορφογενετική πρωτεΐνη του οστού-2 (rhBMP-2) και ικρίωμα υδροξυαπατίτη/ κολλαγόνου/ πολυγαλακτικού οξέος επιτάχυναν την ενασβεστίωση και αύξησαν την οστική παραγωγή (Liu και συν. 2011). Μάλιστα, η θεραπεία με DPSCs υπερείχε σαφώς ακόμα και έναντι της χρήσης οστικού αυτομοσχεύματος. Επιπλέον, σε πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι επιλεγμένα ανθρώπινα DPSCs, ώστε να εκφράζουν τους επιφανειακούς δείκτες CD34 και flk, σε συνδυασμό με ικρίωμα φιβροϊνης ενισχύουν την οστική εναπόθεση και επιδιορθώνουν πλήρως κρανιακά οστικά ελλείμματα κρίσιμου μεγέθους σε επίμυες. Το παραγόμενο οστό ήταν αγγειούμενο και εμφάνιζε σποραδικά τυπική πεταλιώδη δομή (Riccio και συν. 2012).

Στη μοναδική μέχρι σήμερα εφαρμογή σε ανθρώπους, αυτόλογα DPSCs χρησιμοποιήθηκαν για την αποκατάσταση του οστικού ελλείμματος που δημιουργείται δευτερογενώς στο φατνιακό οστό από την εξαγωγή των εγκλείστων ή ημιεγκλείστων τρίτων γομφίων. Σε μερικούς ασθενείς, η καταστροφή του φατνίου κατά την εξαγωγή των δοντιών αυτών δημιουργεί θύλακο δύο ή τριών τοιχωμάτων και συνεπάγεται κάθετη απώλεια οστού τουλά-

2. Dental pulp stem cells (DPSCs) from permanent teeth are capable of differentiating into several cell types.
3. In the pulp, DPSCs maintain a quiescent state in the stem cell niches, located in the perivascular region of the pulpal cavity, and are activated in case of dental caries or trauma to produce tertiary dentin.
4. DPSCs can differentiate *in vitro* into osteoblast-like cells that secrete abundant extracellular matrix and can build woven bone. Moreover, DPSCs are capable of forming a complete and well-vascularised lamellar bone *in vivo* after ectopic grafting into immunocompromised rats.
5. Data obtained from in vivo transplantation of DPSCs into critical-sized bone defects in animal models are clearly encouraging and stress the need of further research for the potential clinical use of DPSCs in bone tissue engineering.

χιστον 7mm, που δεν αποκαθίσταται αυτόματα. Η θεραπεία με DPSCs σε ικρίωμα κολλαγόνου οδήγησε σε αύξηση του επιπέδου φατνιακής ακρολοφίας και σημαντική ανάκτηση κλινικής πρόσφυσης 3 μήνες μετά την επέμβαση, ενώ ένα χρόνο αργότερα παρατηρήθηκε πλήρης αποκατάσταση του ύψους της φατνιακής ακρολοφίας (D'Aquino και συν. 2009).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Ο οδοντικός πολφός είναι μια αξιοσημείωτη πηγή βλαστοκυττάρων προερχομένων από την κρανιακή μοίρα της νευρικής ακρολοφίας.
2. Τα βλαστοκύτταρα του πολφού των μονίμων δοντιών, DPSCs, μπορούν να διαφοροποιηθούν προς διάφορες κυτταρικές κατευθύνσεις.
3. Τα DPSCs παραμένουν ανενεργά εντός των φωλεών στις περιαγγειακές περιοχές του πολφού και ενεργοποιούνται σε περίπτωση τερηδονικής προσβολής ή τραύματος και παράγουν τεταρτοταγή οδοντίνη.
4. Τα DPSCs δύνανται να διαφοροποιηθούν *in vitro* σε κύτταρα που μοιάζουν με οστεοβλάστες και παράγουν εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και πρωτογενή οστίτη ιστό, ενώ παράγουν ώριμο αγγειούμενο οστό, όταν εμφυτεύονται έκτοπα *in vivo* σε πειραματόζωα.
5. Τα δεδομένα από την εφαρμογή των DPSCs σε πειραματικά μοντέλα οστικών ελλειμμάτων *in vivo* είναι σαφώς ενθαρρυντικά και τονίζουν την ανάγκη περαιτέρω μελέτης για την αξιολόγηση και ανάπτυξη πρωτοκόλλων θεραπευτικής εφαρμογής των κυττάρων αυτών στην προαγωγή της οστικής αναγέννησης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ/REFERENCES

About I, Murray PE, Franquin JC, Remusat M, Smith AJ: The effect of cavity restoration variables on odontoblast cell numbers and dental repair. J Dent 29(2): 109-117, 2001

Achilleos A, Trainor PA: Neural crest stem cells: discovery, properties and potential for therapy. Cell Res 22(2): 288-304, 2012

Amabile G, Meissner A: Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. Trends Mol Med 15(2): 59-68, 2009

Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, Robey PG, Shi S: Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. J Dent Res 82(12): 976-981, 2003

Bosshardt DD: Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? J Dent Res 84(5): 390-406, 2005

Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P Jr, Han J, Rowitch DH, Soriano P et al: Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. Development 127(8): 1671-1679, 2000

D'Aquino R, De Rosa A, Laino G, Caruso F, Guida L, Rullo R, Checchi V et al: Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. J Exp Zool B Mol Dev Evol 312B(5): 408-415, 2009

D'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L, Graziano A, Desiderio V et al: Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. Eur Cell Mater 18: 75-83, 2009

D'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, Papaccio G: Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. Cell Death Differ 14: 1162-1171, 2007

D'Aquino R, Laino G, Papaccio G, Graziano A: Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. Stem Cell Rev 4(1): 21-26, 2008

Duailibi SE, Duailibi MT, Zhang W, Asrican R, Vacanti JP, Yelick PC: Bioengineered dental tissues grown in the rat jaw. J Dent Res 87(8): 745-750, 2008

García-Pacheco JM, Oliver C, Kimatrai M, Blanco FJ, Olivares EG: Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related to bone marrow stromal precursors. Mol Hum Reprod 7(12): 1151-1157, 2001

Graziano A, d'Aquino R, Cusella-De Angelis MG, De Francesco F, Giordano A et al: Scaffold's surface geometry significantly affects human stem cell bone tissue engineering. J Cell Physiol 214(1): 166-172, 2008

Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A et al: Stem cell properties of human dental pulp stem cells. J Dent Res 81(8): 531-535, 2002

Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey G, Shi S: Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. PNAS 97(25): 13625-13630, 2000

Goldberg M, Smith AJ: Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. Crit Rev Oral Biol Med 15: 13–27, 2004

Huang GT, 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 88(9): 792-806, 2009

Huang GTJ, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, Shi S: Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. Tissue Engineering: Part A 16(2): 605-615, 2010

Ibuki N, Yamaoka Y, Sawa Y, Kawasaki T, Yoshida S: Different expressions of connexin 43 and 32 in the fibroblasts of human dental pulp. Tissue Cell 34(3): 170-176, 2002

Kadar K, Kiraly M, Porcsalmy B, Molnar B, Racz GZ, Blazsek J, Kallo K et al: Differentiation potential of stem cells from human dental origin- promise for tissue engineering. J Physiol Pharmacol 60(Suppl 7): 167-175, 2009

Kawashima N. Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? Arch Oral Biol 57(11): 1439-1458, 2012

Kitagawa M, Ueda H, Iizuka S, Sakamoto K, Oka H, Kudo Y, Ogawa I et al: Immortalization and characterization of human dental pulp cells with odontoblastic differentiation. Arch Oral Biol 52(8): 727-731, 2007

Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, Pirozzi G, Papaccio G: A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). J Bone Miner Res 20(8): 1394-1402, 2005

Laino G, Graziano A, d'Aquino R, Pirozzi G, Lanza V, Valiante S, De Rosa A et al: An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. J Cell Physiol 206(3): 693-701, 2006α

Laino G, Carinci F, Graziano A, d'Aquino R, Lanza V, De Rosa A, Gombos F et al: In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. J Craniofac Surg 17(3): 511-515, 2006β

Leeb C, Jurga M, McGuckin C, Moriggl R, Kenner L: Promising new sources for pluripotent stem cells. Stem Cell Rev 6(1): 15-26, 2010

Lindroos B, Mäenpää K, Ylikomi T, Oja H, Suuronen R, Miettinen S: Characterization of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun 368(2): 329-335, 2008

Liu HC, E LL, Wang DS, Su F, Wu X, Shi ZP, Lv Y, Wang JZ: Reconstruction of alveolar bone defects using bone morphogenetic protein 2 mediated rabbit dental pulp stem cells seeded on nano-hydroxyapatite/collagen/poly(L-lactide). Tissue Eng 17(19-20): 2417-2433, Part A, 2011

Løvschall H, Tummers M, Thesleff I, Füchtbauer EM, Poulsen K: Activation of the Notch signaling pathway in response to pulp capping of rat molars. Eur J Oral Sci 113(4): 312-317, 2005

Luisi SB, Barbachan JJ, Chies JA, Filho MS: Behavior of human dental pulp cells exposed to transforming growth factor-beta1 and acidic fibroblast growth factor in culture. J Endod 33(7): 833-835, 2007

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S: SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci U S A 100(10): 5807-5812, 2003

Mitsiadis TA, Barrandon O, Rochat A, Barrandon Y, De Bari C: Stem cell niches in mammals. Exp Cell Res 313(16): 3377-3385, 2007

Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ: Regulatory mechanisms in stem cell biology. Cell 88(3): 287-298, 1997

Nakashima M, Iohara K, Sugiyama M: Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration. Cytokine Growth Factor Rev 20(5-6): 435-440, 2009

Papaccio G, Graziano A, d'Aquino R, Graziano MF, Pirozzi G, Menditti D, De Rosa A, Carinci F, Laino G: Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. J Cell Physiol 208(2): 319-325, 2006

Parker GC, Anastassova-Kristeva M, Broxmeyer HE, Dodge WH, Eisenberg LM, Gehling UM: Stem cells: shibboleths of development. Stem Cells Dev 13(6): 579-584, 2004

Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, Becchetti E et al: Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. Transplantation 80(6): 836-842, 2005

Riccio M, Maraldi T, Pisciotta A, La Sala GB, Ferrari A, Bruzzesi G, Motta A et al: Fibroin scaffold repairs critical-size bone defects in vivo supported by human amniotic fluid and dental pulp stem cells. Tissue Eng 18(9-10): 1006-1013, Part A, 2012

Rizk A, Rabie AB: Human dental pulp stem cells expressing transforming growth factor β3 transgene for cartilage-like tissue engineering. Cytotherapy. 2013 Mar 6. (Epub ahead of print).

Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG: Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. Semin Cell Dev Biol 19(5): 459-466, 2008 Schroeder JE, Mosheiff R: Tissue engineering approaches for bone repair: Concepts and evidence. Injury 2011; in press.

Seong JM, Kim BC, Park JH, Kwon IK, Mantalaris A, Hwang YS. Stem cells in bone tissue engineering. Biomed Mater 5(6): 1-15, 2010

Shi S, Gronthos S: Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. J Bone Miner Res 18(4): 696-704, 2003

Sloan AJ, Waddington RJ: Dental pulp stem cells: what, where, how? Int J Paediatr Dent 19(1): 61-70, 2009

Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126(4): 663-676. 2006

Téclès O, Laurent P, Zygouritsas S, Burger AS, Camps J, Dejou J, About I: Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. Arch Oral Biol 50(2): 103-108, 2005

Tirino V, Paino F, De Rosa A, Papaccio G: Identification, isolation, characterization, and banking of human dental pulp stem cells. Methods Mol Biol 879: 443-463, 2012

Tonomura A, Sumita Y, Ando Y, Iejima D, Kagami H, Honda MJ, Ueda M: Differential inducibility of human and porcine dental pulp-derived cells into odontoblasts. Connect Tissue Res 48(5): 229-238, 2007

Watt FM, Hogan BL: Out of Eden: stem cells and their niches. Science 287(5457): 1427-1430, 2000

Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y: Expression of mineralization markers in dental pulp cells. J Endod 33(6): 703-708, 2007

Yamada Y, Ito K, Nakamura S, Ueda M, Nagasaka T: Promising cell-based therapy for bone regeneration using stem cells from deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow. Cell Transplant 20(7): 1003-1013, 2011

Yang X, van den Dolder J, Walboomers XF, Zhang W, Bian Z, Fan M, Jansen JA: The odontogenic potential of STRO-1 sorted rat dental pulp stem cells in vitro. J Tissue Eng Regen Med 1(1): 66-73, 2007a

Yang X, Zhang W, van den Dolder J, Walboomers XF, Bian Z, Fan M, Jansen JA: Multilineage potential of STRO-1+ rat dental pulp cells in vitro. J Tissue Eng Regen Med 1(2): 128-135, 2007b

Yildirim S, Yapar M, Sermet U, Sener K, Kubar A: The role of dental pulp cells in resorption of deciduous teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 105(1): 113-120, 2008

Yu J, He H, Tang C, Zhang G, Li Y, Wang R, Shi J, Jin Y: Differentiation potential of STRO-1+ dental pulp stem cells changes during cell passaging. BMC Cell Biol 11: 32, 2010

Zhang W, Walboomers XF, van Kuppevelt TH, Daamen WF, Bian Z, Jansen JA: The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. Biomaterials 27(33): 5658-5668, 2006

Διεύθυνση επικοινωνίας:
Αμαλία Καπαρού
Δαναΐδων 22,
15232, Χαλάνδρι, Ελλάδα
Τηλ.: 210 6823097
e-mail: a_kaparou@yahoo.com

Address:
Amalia Kaparou
22 Danaidon Str.,
15232 Halandri, Athens, Greece
Tel.: 0030 210 6823097
e-mail: a_kaparou@yahoo.com