

ПОТЕНЦИЈАЛНИ КЛИНИЧКИ АПЛИКАЦИИ НА ДЕНТАЛНИ СТЕМ КЛЕТКИ

Велеска-Стевковска Д.¹, Пеева-Петреска М.¹, Апостолска С.²

СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ - Скопје, ¹Катедра за орална хирургија

²Катедра за болести на забите и ендодонтот

Комплексниите хумани ткива содржат стем клетки и/или прекурзор клетки кои се одговорни за ткивен развој и регенерација. Денталните ткива како на пример денталните фоликули, денталната папила, денталната пулпа и периодонталниот лигамент се идентификувани како лесно достапни извори на недиференцирани клетки. Денталните прекурзор клетки се атрактивни во смисла на нивна употреба во регенеративната стоматолозија, регенерација на денталната пулпа („biopulp“), гингива и периодонциум, регенерација на коскени дефекти или комплетна реконструкција на темпоромандибуларен зглоб. Стем клетките со потекло од денталната пулпа се користат и во регенеративната медицина во лекување на голем број на заболувања како дијабетот, заболувања на коскениот, рскавичниот, фиброзниот, мускулниот и масниот ткиво, невролошки заболувања и при трауми на рбетниот столб.

Клучни зборови: дентални матични клетки, дентални прекурзор клетки, мезенхимални клетки со коскено потекло, дентални ткива, регенеративна стоматологија, клеточно базирана терапија

Технологијата на презервација на стем клетки овозможува непроценливо вредните клетки да ги зачуваме за потребите на непредвидливата иднина (5). Банките на стем клетки со години ги чуваат стем клетките од папочната врвца. Откритието на стем

клетки во денталната пулпа на млечните заби и третите трајни молари, дава втора можност на семејствата кои ја пропуштиле можноста за зачувување на папочната врвца. Процесот на презервација е едноставен, наместо да се отфрли млечното забче или третиот молар, матичните стоматолози го испраќаат во специјални банки и лаборатории кои ја користат технологијата на екстракција и презервација на стем клетки. Во 2003 година Dr. Sangtao Chi од NIH (National Institute of Health) ги открива денталните стем клетки. Во 2007 година се изведуваат први анимални студии со дентални стем клетки за третман на коскени дефекти и коскена регенерација, додека во 2008 следуваат први анимални студии со дентални стем клетки за третман на заболувања на срце, нервно ткиво, мускулна дистрофија.

Мезенхимални стем клетки со потекло од коска

Коскената срж претставува ткивен комплекс составен од хематопоеични клетки и строма на коскена срж, две клеточни популации биолошки независни. Сепак во извесна мера постојат одредени кооперативни интеракции помеѓу овие две клеточни популации, хематопоеичните клетки влијаат на активноста на стромалните клетки, додека стромалните клетки претставуваат механичка поддршка при диференцирање на хемато-

поетичните клетки и експресираат клеточни фактори за сигнализација партиципирајќи во развојот на зрелите крвни клетки. Културите на стромални клетки кои потекнуваат од коскената срж се детерминираат како стромални клетки на коскена срж (BMSC-bone marrow stromal cells). Мезенхималните стем клетки претставуваат субкултура на BMSCs кои се карактеризираат со мултипотенцијалност, способност за себеобновување и секако способност за диференцијација во остеоцити, хондроцити, адипоцити и стромални клетки за одржување на хематопоезата.

Формирање на коска *in vivo*

Кооперативните интеракции клетка-клетка и клетка-матрикс во тек на коскениот развој се проучуваат на отворени трансплант системи (се карактеризираат со отсуство на бариера помеѓу донорот и клетките на домаќинот) каде BMSCs се поставуваат во дефинирани анатомски структури како на пример просторот под бубрежната капсула или субкутано на лабораториско животно. За да формираат коска на трансплантираните стем клетки потребна им е една организирана решетка („framework“) за која ќе се атхерираат и пролиферираат, во спротивно отсуствува појава на остеогенеза при трансплантација на стем клетки во вид на чиста клеточна маса без присуство на потпорна структура (24).



Слика 1. Отворени трансплант системи

Изолација и иденџификација на цементно-бласџ слични клетки

Постојат јасно прецизни разлики во организацијата на коската и цементот, но сепак сѐ уште не е јасно дефинирано дали се равиваат од различни клеточни типови или од ист тип на клетка со потенцијал за формирање на коска (bone-forming cell) која се наоѓа во различна околина. Културите на хумани клетки кои потекнуваат од денталниот цемент (human cementum-derived cells-HCDSs) или клетки кои потекнуваат од цементот се добиени од здрави заби со претретман со колагеназа. Овие клетки се способни за диференцијација и формирање на ткиво слично на цементот.

Адулџни хумани стџем клетки од денџална пулпа

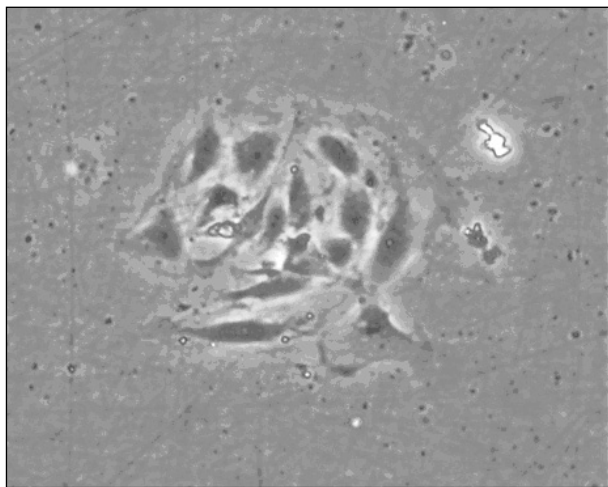
Друг тип на минерализирано ткиво кое има сличности со коскениот ткиво е дентиот. Дентиот поседува лимитирани репаративни способности. DPSCs (dental pulp stem cells) или стем клетки од денталната пулпа се добиваат со ензимска деградација на адултна хумана дентална пулпа. DPSCs и BMSCs имаат слични генетски експресији за околу 4000 гени. **Генерално DPSCs се диференцираат во одонтобласти, остеобласти, хондроцити, фибробласти, адипоцити, миоцити, меланоцити и неурони.**

Методџ на екстџрација и кулџтивација на стџем клетки

Стем клетките се добиваат од млечните заби (присуство на витална пулпа и физиолошка ресорпција на коренот не поголема од две-третини), третите молари (возрасна граница околу 28 години), екстрахирани заби од ортодонтски причини, мезиоденси, траума или пародонтопатија. Според голем број на анализирани студии многу е тешко да се изолираат DPSCs од заби кои биле сепарирани со дијамантски борер или со инструменти за сепарација поради тоа што постои голем ризик од термичко или механичко оштетување на пулпата како и голе-

ма веројатност за нејзина контаминација. Во најголем број на случаи интактниот заб-примерок треба да се транспортира на безбеден начин во лабораторија во специјални раствори за транспорт (Hank's balanced salted solutions HBSS). Следува екстрахирање на пулпата во стерилни услови. Денталната пулпа ензимски се третира со колагеназа 70 мин. Со помош на центрифугирање се добиваат две фракции на клетки и тоа клетки од субодонтобластниот компартмент и клетки од периваскуларниот компартмент на пулпата.

Култивирање - Суспензиите на стем клетки (DPSCs) се култивираат во специјален медиум за хумани мезенхимални прогенитор клетки (3-5 дена). Лабораториските садови во кои се наоѓа примарната култура содржи т.н Cell+ површина. Потоа се третира со трипсин - EDTA и се поделува во лабораториски садови со стандардни површини (24).



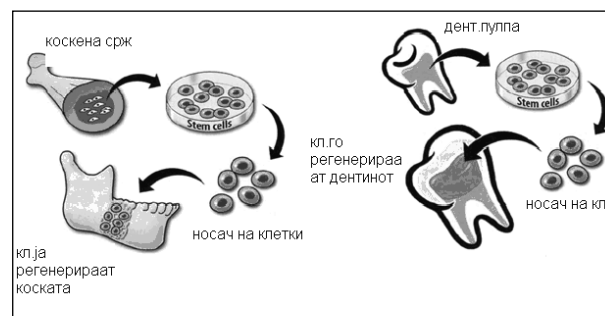
Слика 2. Фазно контрастна микроскопија. Мала колонија на дентални стем клетки 24 часа по инокулација. Големината на клетките изнесува од 12-18 μ m

При опсервирање на колониите авторите Gronthos S., Muira M., (11,16) утврдиле морфолошки разлики помеѓу двата типа на DPSCs од двата различни компартменти. DPSCs од периваскуларниот компартмент (внатрешната страна на денталната пулпа) биле поиздожени со долг процесус во компарација со DPSCs од субодонтобластниот компартмент (надворешниот дел на дентал-

ната пулпа) кои поседуваат позаоблена форма. Цитогенетските испитувања на DPSCs покажувале нормален кариотип без разлика во компартментите. Постојат два извора од кои се развиваат елементите на денталната пулпа (дентален мезенхим од неурална креста и васкуларен мезенхим) и се претпоставува дека постојат две линии на DPSCs во денталната пулпа. Делбеното време на пулпните стем клетки е следното: 12-50 часа за првите четириесет делби во клеточната популација, по постигнување на 50 популациски делби се зголемува делбеното време на 60-90 часа (11, 16). Денталната пулпа претставува алтернативен и лесно достапен извор за добивање на ткивно-специфични стем клетки кои се хистокомпатибилни со ткивата на пациентот од кој се изолирани (3,9,10).

Потенцијални клинички апликации во орофацијалниот систем

Во иднина стем клетките комплетно ќе ги реставрираат тврдите и меките ткива во усната празнина на пациентите при што ќе се изврши едно by-pass-ирање на проблемите со хистокомпатибилноста. Краниофацијалните скелетни дефекти најчесто се резултат на оперативни зафати кај неоплазми, инфекции, траума, конгенитални малформации и прогресивни заболувања кои доведуваат до деформација на краниофацијалниот систем. Трансплантација на клеточни BMSCs популации, кои содржат мезенхимални стем клетки, можат во иднина да обезбедат алтерна-



Слика 3. Потенцијални клинички апликации

тивни приоди во реконструкција на краниофацијални дефекти заобиколувајќи го недостатоците на авто и алотрансплантатите.

Постои можност стем клетките да се постават („засеат“) во биокомпатибилни калапи во форма на анатомските структури кои треба да се репарираат. До сега изведени се ткивни инжињерства („tissue engineering“) на анимални модели со цел да се репарираат орални, дентални и краниофацијални структури (графтови на меки ткива, забни ткива, ТМЗ, фацијални коски). Мандибуларниот кондил поседува две обвивки и тоа коскената и рскавичната. Авторите Alhadlaq и Мао (1) мезенхималните стем клетки прво ги диференцирале во хондрогенетски и остеогенетски клетки и потоа ги инкапсулирале во биокомпатибилен хидрогел со две стратификациони нивоа, кој имал димензии и облик на адултен хуман мандибуларен кондил. Потоа е направена *in vivo* имплантација во имунокомпромитирано лабораториско животно. По 12 недели се создале мандибуларни кондили кои ја задржале формата и димензиите на природните кондили (1,14,16).

Биопулпата (Biopulp) претставува револуционерен новитет во ендодонтскиот третман. Патентирана е од страна на Мао Jeremy на Универзитетот Колумбија, NY, USA. Биолошки базираната ендодонтска терапија во кратки црти подразбира имплантирање на стем клетки во претходно ендодонтски третман канален систем на пулпата (18).

Одредени успеси во билошките третмани во ендодонцијата е постигнат и од страна на Fu Susan. Со користење на технологијата на биоинжењеринг во експериментална студија, пулпата на цицачи успешно е ревакуларизирана и повторно населена со клетки *in vivo* (cytokine induced cell-homing) (7).

Авторите Byoung-Mao Seo, Miura Masako (4) изолирале стем клетки директно од периодонталниот лигамент кои имаат извонреден потенцијал за регенерација.

Исто така и авторите Lin N-H, Menicahin D, сметаат дека стем клетките од периодонталниот лигамент се одговорни за периодонталната регенерација (15).

Пародонталните стем клетки се диференцираат успешно во фибробласти кои продуцираат колагени влакна, понатаму во цементобласти и цемтоцити. Авторите Shi Sangtao, Seo Byoung Moo реферираат за одредени успешни имплантации на периодонтални стем клетки во тек на пародонтолошкиот третман (22).

Според Hirouki Kawaguchi, трансплантацијата на BMSC (bone marrow-derived mesenchymal stem cells) од илијачна коска во пародонтални дефекти е корисна опција за периодонтална ткивна регенерација (12).

Авторите Wurtz Tilmann, Gault Philippe од Универзитетот во Париз, реферираат за клинички имплантации на метални цилиндри (**Ligaplant**) покриени со минерален филм и истовремено автографтирање на стем клетки со потекло од дентална пулпа. Рентгенолошките анализи по 24 недели укажуваат на присуство на алвеоларна коскена формација околу имплантот и атачирање на имплантот до примарното место на инсерција (28).

Стем клеточно медираната радикуларна регенерација дава можности за комплетно регенерирање на т.н. дентален био-корен и асоцирано периодонтално ткиво. Авторите Watary Sonoyama и Yi Liu успешно реконструирале функционален заб кај анимални модели („minipigs“) со помош на стем клетки (SCAP-stem cells from root apical papilla, PDLSC – periodontal ligament stem cells). По 3 месеци од имплантацијата на специјален хидроксилапатитен имплант (HA/SCAP) препокриен со стем клеточна обвивка од PDLSC, авторите забележале формирање на цврста радикуларна структура ограничена со јасен периодонтален простор кој ја одделувал од околното коскено ткиво. Техниката на изведување на целокупната студија била од хибриден карактер (27).

Преку користење на ткивното инженерство успешно е создаден анимален дентален орган во лабораториски услови. Се верува дека во следните 5-10 години би биле созрени условите за лабораториски развој на хумани заби кои во иднина би се користеле

како биолошки супститути кои би ги имале сите карактеристики на природните заби на пациентите (25).

Потенцијални клинички апликации во други органи и ткива

Трансформирањето на денталните стем клетки во кардиомиоцити креира одредени перспективи во современиот третман на одредени кардиоваскуларни заболувања на пример санација на оштетувањата на миокардот стекнати при состојба на акутен инфаркт на миокардот. Понатаму утврдена е и трансформација на стем клетките со потекло од пулпата во остеоцити (6) (феноменот може да се искористи при регенеративна терапија на заболувања на коскеното ткиво), хондроцити (терапија на заболувања на 'рскавичното ткиво), неурони (терапија на мултиплекс склероза, Алцхајмер и Паркинсонова болест) и трансформација во адипоцити (третман на заболувања на масното ткиво). Постојат одредени перспективи за третман на дијабетот и заболувањата на црниот дроб со помош на денталните стем клетки (19).

Авторите Gandia C, Armiñan A(8) утврдиле одредени подобрувања во функцијата на миокардот на анимални модели по апликација на стем клетки со потекло од денталната пулпа, и тоа редукција на зоната на инфракција, задебелување на предниот ѕид на миокардот, зголемување на ејекционата фракција и зголемување на степенот на ангиогенеза.

Nosrat IV, Widenfalk J, реферираат за успешно санирање на мотонеуроните по апликацијата на дентални стем клетки кај анимални модели со спинални повреди (21).

Неуродегенеративните болести како Паркинсон во иднина ќе бидат третирани со помош на клеточно базираната терапија по пат на инјектирање на стем клетки од ден-

тална пулпа директно во ЦНС (базални ганглии) (20). За таа цел направени се голем број на истражувања кои потврдуваат создавање на неуротрофични фактори (glial cell line-derived neurothrophic factor (GDNF)mRNA, nerve growth factor (NGF), brain-derived neurothrophic fator (BDNF)) in vitro од страна на стем клетките кои ги поддржуваат оштетените неурони и доведуваат до замена на авиталните клетки со нови, витални клетки. Во поконкретна смисла, го промовираат опстанокот на допаминергичните (DA) неурони и ги заштитуваат DA неуроните од штетното дејство на неуротоксинот 6-hydroxy-dopamine (6-DHDA) in vitro.

И во студијата на Apel C, Forlenza O.V (2) се потврдува експресијата на неуротрофични фактори од страна на DPSC кои ги штитат примарните мотонеурони кај in vitro модели на Alzheimer заболувањето.

Експерименталните студии со DPSC како и со стем клетки од други извори, според авторите Yalvac Mehmet, Rizvanov Albert (26) укажуваат на одреден степен на успешност во атенуирањето на исхемичните оштетувања на мозокот и допринесуваат за брз, функционален „recovery“.

Мао Jeremy (8) ги потенцира во своите студии предностите за користење на биолошки компатибилни мекоткивни импланти и импланти од масно ткиво кои стопроцентно ја задоволуваат оригиналната димензија и форма по in vivo имплантација. Авторот ги опишува методите на de novo и in vivo синтеза на импланти од масно ткиво со потекло од дентални стем клетки.

Во 2008 година започнуваат првите студии за терапија на мускулна дистрофија со дентални стем клетки кај анимални модели (13).

На сајтот на Американската научна асоцијација за истражување на стем клетките: www.stemcellsresearch.org секојдневно се аплицираат најновите експериментални и клинички искуства со денталните стем клетки и со стем клетките од други извори (23).

POTENTIAL CLINICAL APPLICATION IN DENTAL STEM CELLS

Veleska-Stevkovska D., Peeva-Petreska M., Apostolska S.

Summary

Complex human tissues harbor stem cells and/or precursor cells, which are responsible for tissue development or regeneration. Recently, dental tissues such as periodontal ligament (PDL), dental papilla or dental follicle have been identified as easily accessible sources of undifferentiated cells. Dental precursor cells are attractive for usage in regenerative dentistry, like for example regeneration of the dental pulp (biopulp), gingiva and periodontium, regeneration of osseous defects and complete reconstruction of the temporomandibular joint. Dental stem cells are widely used in the regenerative medicine, also. Diabetes, diseases of the bone, cartilage, fibrous tissue, muscular and adipose tissue, the neurological diseases and the spinal cord injuries are all included in the future cell-based therapies with dental stem cells.

Key words: dental stem cells, dental precursor cells, bone-marrow-derived mesenchymal stem cells, dental tissues, regenerative dentistry, cell-based therapy

Литература

- Alhadlaq Adel, Mao Jeremy, „Tissue-engineered osteochondral constructs in the sape of an articular condyle“, *The Journal of bone and joint surgery*, 2005, 87:936-944.
- Apel C, Forlenza O.V et all „The neuroprotective effect of DSC in models of Alzheimer and Parkinson disease“, *Journal of neural transmission*, 2009, 116(1):71-78.
- Avery JK „Oral development and histology“. 2nd Edition. New York: Theme medical publishers. Inc, 1994;71-79.
- Byoung-Mao Seo, Miura Masako, Granthos Stan et al., „Multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament“ *The Lancet*, 2004, 364(9429):149-155.
- Crio-save, www.Crio-save.com.
- D'Aquino R., Graziano A et al. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation, Cell sdeath and differentiation, 2007, 14:1162-1171.
- Fu Susan, Biopulp: Bioengineering approaches for dental pulp regeneration, 2009, National Institute for Dental and Craniofacial Research, <http://www.researchgrantdatabase.com/>.
- Gandia C, Armiñan A, et al . . „Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction.“ *Stem Cells*. 2008 Mar;26(3):638-45.
- Gronthos S., Cherman N., Robery P, Shi S., Human dental pulp stem cells. *Adult stem cells*. Totowa, New Jersey: Humana press, 2004;37-51,101-149.
- Gronthos S., Brahim J., Li W. „Stem cell properties of human dental pulp stem cells“, *J Dent Res*. 2002,81(8):531-535.
- Gronthos S., Mankom M., Brahim J et al. Postnatal human dental pulp stem cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci Usa*, 2000;97:13625-13630.
- Hirouki Kawaguchi, Hidemi Kurinara, Clinical trial of periodontal tissue regeneration, 2008, *Nippon Rinsho*, 66(5):948-54.
- Kerkis I, Ambrosio CE, et al. „Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic?“ *J Transl Med*. 2008 Jul 3;6:35.
- Krebsbach Paul H, Robery Gehron Pamela „Dental and skeletal stem cells: Potential cellular therapeutics for craniofacial regenerations“, *Journal of dental education*, 2002, 66(6):776-773.
- Lin N-H, Menicahin D, „Putative stem cell in regenerating human periodontium“, *J Periodont Res* 2008, 43:514-523.
- Muir M., Gronthos S., Zhao M., Lu B., Fisher LW. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003,100:5807-5812.
- Mao Jeremy, Pharmalicensing.com.
- Mao Jeremy, Moidi Eduard K, Kim Jim, 2008, World intellectual property organization, www.wipo.int/.
- National Dental Pulp Laboratory, www.ndpl.net.
- Nosrat Christopher A., Nosrat Irina V., Smith Christofer A., „Dental pulp stem cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons in vitro; Implications for tissue engineering and repair in the nervous system“

- European Journal of Neuroscience, 2004, 19(9)2388-2398.
21. Nosrat IV, Widenfalk J, et al. „Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury.“ *Dev Biol.* 2001 Oct 1;238(1):120-32.
 22. Shi Sangtao, Seo Byoung Moo, Miura Masako, „Multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament“ *Lancet*, 2004, vol. 364, N^o9429, pp. 149-155.
 23. Stemcellresearch, www.stemcellsresearch.org
 24. Suchanek Jakub, Soukup Tpmas et al. Human dental pulp stem cells-isolation and long term cultivation. *Acta medica*, 2007;50(3);195-201.
 25. Yelick Pamela, Vacanti Joseph BBC News 2002, www.news.bbc.co.uk.
 26. Yalvac Mehment, Rizvanov Albert et al, Potential role of DPSC in the cellular therapy of cerebral ischemia“ *Current Pharmaceutical design*, 2009, 15(33):3908-3916.
 27. Watary Sonoyama, Yi Liu et al, „Mesenhimial stem cell- mediated functional tooth regeneration in swine“ *Plos one*, 2006, 1(1):79.
 28. Wurtz Tilmann, Gault Philippe, Stem cells in dental pulp, www.genopole.org/media/pdf/fr/recherche/stemcells/071118-wurtz.pdf.