
СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ОТ АПИКАЛНА ПАПИЛА – МОРФОЛОГИЧНИ ОСОБЕНОСТИ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ

Кр. Христов¹, Н. Ишкитиев², М. Митева³, Н. Грънчарова⁴

¹ Доцент, катедра Детска дентална медицина, Факултет по дентална медицина, Медицински университет – София

² Главен асистент, катедра Медицинска химия и биохимия, Медицински факултет, Медицински университет – София

³ Асистент, катедра Медицинска химия и биохимия, Медицински факултет, Медицински университет – София

⁴ Професор, катедра Детска дентална медицина, Факултет по дентална медицина, Медицински университет – София

Резюме

Въведение: Стволовите клетки притежават свойството да се самообновяват и да се диференцират до различни клетъчни типове. Стволовите клетки от апикалната папила (СКАП) са нова популация от мезенхимни стволови клетки, изолирани от апикалната папила на зъби с незавършено кореново развитие. **Цел:** Изследване на морфологичните особености и характеристика на стволовите клетки от апикална папила. **Материали и методи:** СКАП се изолират от прясно екстрахирани зъбни зародиши на постоянни трети молари чрез метода на ензимно смилане. Техният растеж бе поддържан в клетъчна култура с добавена DMEM, която бе обогатена с 10% фетален телешки серум, 100 U/ml пеницилин и 100 µg/ml стрептомицин. За характеристика на клетките се изследва експресията на повърхностни клетъчни маркери STRO-1, CD24, CD31, CD13 и CD146 чрез имунофлуоресценция. **Резултати:** Първите единични клетки, адхезирали към дъното на пластмасовите петрита, се появяват след един до три дни от началото на експеримента. Те са малки клетки с вретеновидна и звездовидна форма. Първите колонии се оформят в рамките на шест до осем дни и са резултат от интензивното делене на адхезираните по дъното на културелния съд клетки. Получените имунофлуоресцентни изображения потвърждават наличието на стволови клетки в апикалната папила, поради експресията на клетъчните маркери, типични за недиференцирани клетки. **Заключение:** Апикалните папили на зъби с незавършено кореново развитие са източник на стволови клетки, които могат да бъдат използвани за целите на регенеративната ендодонтия.

Ключови думи: стволови клетки от апикална папила, имунофлуоресценция, регенеративна ендодонтия

STEM CELLS FROM APICAL PAPILLA – MORPHOLOGICAL FEATURES AND CHARACTERIZATION

K Hristov¹, N. Ishkitiev², M. Miteva³, N. Grancharova⁴

¹ Assoc. Professor, Department of Pediatric Dentistry, Faculty of Dental Medicine, Medical University of Sofia

² Chief Assistant Professor, Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Medical Faculty, Medical University of Sofia

³ Assistant Professor, Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Medical Faculty, Medical University of Sofia

⁴ Professor, Department of Pediatric Dentistry, Faculty of Dental Medicine, Medical University of Sofia

Abstract

Introduction: Stem cells have the property to self-renew and differentiate into different cell types. Stem cells from apical papilla (APSCs) are novel population of mesenchymal stem cells isolated from the apical papilla of immature permanent teeth.

Aim: To study the morphological features and characterization of SCAP.

Materials and methods: SCAP were isolated from freshly extracted tooth germs of permanent third molars by enzymatic digestion method. Their growth was maintained in cell culture with DMEM, supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. For cell characterization, the expression of cell surface markers STRO-1, CD24, CD31, CD13 and CD146 was assessed by immunofluorescence.

Results: The first single cells adhered to the bottom of the plastic petri dishes appeared after one to three days from the start of the experiment. They are small spindle- and star-shaped cells. The first colonies are formed within six to eight days and are the result of the intense division of the cells adhered to the bottom of the culture vessel. The immunofluorescence images confirmed the presence of stem cells in the apical papilla with expression of cell markers typical of undifferentiated cells.

Conclusion: The apical papillae of immature permanent teeth are a source of stem cells that can be used in regenerative endodontics.

Key words: stem cells from apical papilla, immunofluorescence, regenerative endodontics

Въведение

Регенеративната ендодонтия включва биологично базирани процедури, предназначени за физиологично заместване на увредени зъбни структури като дентина, корена и пулпо – дентиновия комплекс (1). В исторически план тези процедури са били наричани реваскуларизация, ревитализация или

регенеративна ендодонтия. Към настоящия момент всички те са обхванати в термина регенеративни ендодонтски процедури (РЕП). Този термин е по-обхванат и включва всички процедури, които имат за цел организирано възстановяване на зъбната пулпа, като в същото време не се изключват нововъзникващите терапевтични възможности в областта на регенеративната ендодонтия (2). Основна роля в създаването на нова пулпоподобна тъкан играят стволите клетки, главно тези от пулпата на постоянни зъби или от апикалната папила, тъй като са разположени в кореновия канал или на върха на корена (3, 4). Те споделят общ произход на развитието като производни на плурипотентните клетки на невралните гребени (4). Както стволите клетки от пулпата на постоянните зъби, така и тези от апикалната папила (СКАП), могат да се диференцират до одонтобластоподобни клетки с потенциала да мигрират, минерализират и образуват триизмерна дентиноподобна структура. СКАП обаче имат по-висок пролиферативен капацитет от стволите клетки на зъбната пулпа (5). Освен това дори и при клинично доказана некроза на пулпата с периапикална патология и фистула, част от СКАП може все още да са витални (6, 7). При добра дезинфекция на кореново-каналната система и подходяща стимулация на клетките от апикалната папила е възможно продължаване на кореновото развитие (6). Целта на настоящото изследване е да проучи морфологичните особености на стволите клетки от апикална папила и тяхната характеристика чрез оценка на експресията на специфични повърхностни маркери.

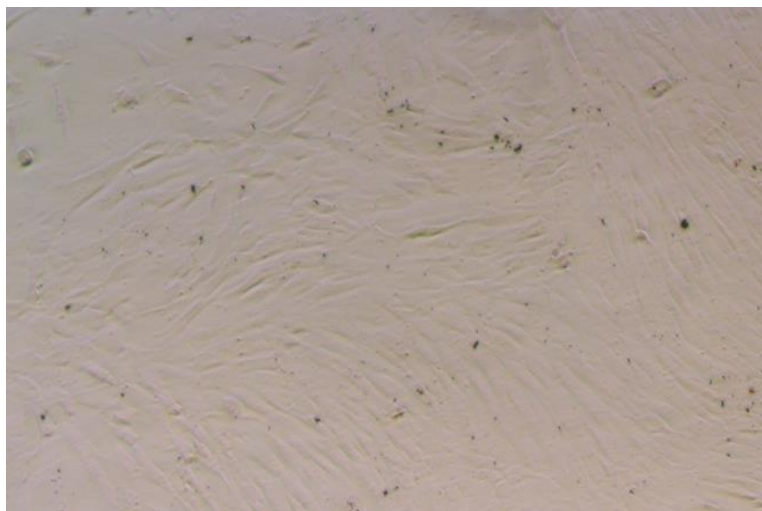
Материали и методи

Обект на настоящото изследване са СКАП, изолирани от прясно екстрахирани зъбни зародиши на постоянни трети молари. Техният растеж бе поддържан в клетъчна култура. Апикалните папили бяха отстранени внимателно от корена на зъба, след което бяха подложени на ензимно смилане в разтвор на колагеназа и диспаза за 1 час и температура 37 °С. Едноклетъчна суспензия бе получена чрез пропускане на клетките през стерилно сито с размер на порите 70 µm и засяването им в културелни съдове с добавена DMEM, която бе обогатена с 10% фетален телешки серум, 100 U/ml пеницилин и 100 µg/ml стрептомицин.

За провеждане на експеримента се използваха клетки между 3-ти и 5-ти пасаж. Извърши се характеризирание на клетъчните култури от СКАП за доказване на тяхната стволито-клетъчна природа чрез изследване на експресията на повърхностни клетъчни маркери STRO-1, CD24, CD31, CD13 и CD146. Клетките бяха измити с фосфатен буферен разтвор (PBS), след което бе извършено блокиране на неспецифичните места за свързване на антитела чрез инкубиране с 2% BSA-PBS, повторно измиване с PBS, инкубиране с първично антитяло STRO-1, CD24, CD31, CD13 и CD146, измиване с PBS и маркиране с вторично антитяло.

Резултати и обсъждане

На фигура 1 са представени изолирани и култивирани клетки от апикална папила.



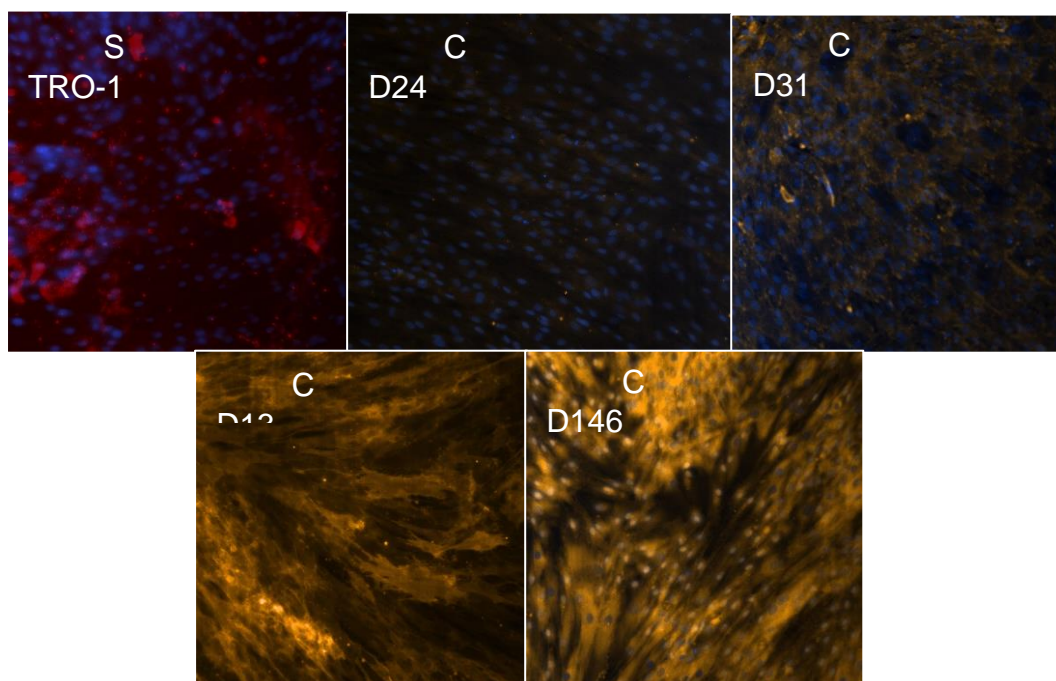
Фигура 1. Изолирани и култивирани клетки от апикална папила.

Първите единични клетки, адхезирали към дъното на пластмасовите петрита, се появяват след един до три дни от началото на експеримента. Те са малки клетки с вретеновидна и звездовидна форма. Такава морфологична характеристика, каквато наблюдавахме и при нашето изследване, е описана от Sonoуа и кол, които първи изолират МСК от апикалната папила на зъби с НКР (8). Клетките растат концентрично, поддържайки хармония в деленето и движението си, докато се приближават една към друга. Изолирането на СКАП от апикалната папила, подобно на дисоциацията и култивирането на всеки друг тип стволони клетки, имитира процеса на клетъчно активиране. В нашето изследване доказахме, че СКАП могат да бъдат относително лесно култивирани в обикновена, обогатена със серум среда. Те са способни да осигурят достатъчно клетки, които да имат потенциал за клинично приложение. Това може да се дължи на ембрионалния стадий от развитие, в който се намира апикалната зъбна пулпа. Когато СКАП са култивирани, настъпват промени в генната и протеинова експресия, показващи повишаване или обогатяване на тяхната стволонклетъчна молекулна идентичност и недиференцирано състояние (9). Съществуват изследвания, които доказват, че различните методи за изолиране и култивиране дават началото на различни клетъчни популации (10).

Резултатите от проведените от нас експерименти показват, че СКАП притежават една от основните характеристики на мезенхимни стволони клетки – формиране на колонии при *in vitro* клетъчно култивиране. Първите колонии се оформят в рамките на шест до осем дни и са резултат от интензивното делене на адхезираните по дъното на културелния съд клетки, което съвпада с резултатите от специализираната литература (8, 11). След десетия ден започва образуването на плътен конфлуентен слой поради силно изразения

пролиферативен капацитет на клетките (фигура 1). С увеличаване на конфлуентността се променя тяхната морфология. Промяната във формата не е свързана с инициране на процеси на клетъчна диференциация. В първите дни след изолирането им те имат звездовидна форма поради по-големите разстояния между тях. С увеличаване на плътността на монослоя и намаляване на разстоянията между клетките те придобиват вретеновидна форма. При достигане на 80% конфлуентност, клетките се пасажират и се засяват в нови културелни съдове. Така приложеният протокол позволява многократно увеличение на броя на клетките за сравнително кратък период.

Чрез имунофлуоресцентно изследване се направи качествена оценка на способността на клетки, изолирани от апикална папила, да експресират повърхностни маркери. Получените изображения са представени на фигура 2. Получените в този експеримент изображения потвърждават наличието на стволови клетки в апикалната папила, поради експресирането на клетъчните маркери, типични за недиференцирани клетки. При анализ на изображенията от имунофлуоресценцията става ясно, че клетките не експресират хомогенно отделните маркери – част от тях се оцветяват по-интензивно от други клетки от същия препарат. Това потвърждава хетерогенния характер на изследваната клетъчна култура от апикална папила.



Фигура 2. Имунофлуоресцентно изследване на експресията на повърхностни клетъчни маркери STRO-1, CD24, CD31, CD13 и CD146 при стволови клетки от апикална папила.

Установено е, че от различните повърхностни клетъчни маркери, CD24 - маркер за плурипотентност, е пряко свързан със СКАП и се експресира предимно в тях (12). Въпреки че експресията му е в ниски количества, вариращи от 3,2 до 15%, той се счита за специфичен за СКАП, тъй не може да бъде установен в други мезенхимни стволови клетки, включително от пулпата на постоянни зъби (13, 14). CD24 се използва като индикатор за недиференцираност и следователно неговото присъствие показва стволочклетъчната природа на клетките. С увеличаване на нивото на алкалната фосфатаза, нивото на експресия на CD24 намалява, което означава, че клетките са започнали да напускат състоянието на недиференцираност и да навлизат в това на остеобластната линия (14). От друга страна, независимо от диференциацията, след като клетките достигнат 10-ия пасаж, експресията на CD24 изчезва. Като се има предвид, че CD24 се счита за идентифициращ маркер на СКАП, това откритие предполага, че с пасажирването отслабват стволочклетъчните качества на СКАП (15).

Важността на експресията на CD146 се дължи на факта, че е най-използваният маркер за характеризирание на периваскуларните мултипотентни стволови клетки в съединителната тъкан (16). Както при всички маркери, експресията на CD146 не е хомогенна и следователно изисква фино сортиране на клетките, за да се получи чиста популация (17). Освен това, поради наличие на вариации в експресията им, нито CD146, нито STRO-1 могат да бъдат използвани самостоятелно като специфични маркери на денталните стволови клетки (18). В една изолирана популация от СКАП преобладават CD146 – положителните пред STRO-1-положителните клетки (11, 18). Доказано е, че последните притежават невrogenни характеристики, като се оцветяват положително за бета-3-тубулин, нестин и неврон-специфична енолаза, които са невронални стволови маркери (7). Това потвърждава твърдението, че в зависимост от процента на експресия на определени фактори, клетките се ориентират към специфични клетъчни линии.

СКАП притежават потенциал за мултилинеарна диференциация и реализиране на процеси на синтез на извънклетъчен матрикс и минерализация. Клетките могат да се диференцират до одонтобласти/остеобласти, адипоцити, хондроцити и невроцити *ин витро*, при наличие в средата на установени, специфични за клетъчната линия активни вещества – растежни фактори, цитокини и други (8, 11, 19). Това свойство може да се дължи на присъствието в хетерогенната клетъчна култура на 1) мултипотентни стволови клетки, 2) прекурсорни клетки като преодонтобласти/преостеобласти/преадипоцити, прехондробласти или прекурсорни на невралните клетки, или 3) комбинация от изброените (20).

Заклучение

Апикалните папили на постоянни зъби с незавършено кореново развитие са източник на стволови клетки с овална или звездовидна форма и експресиращи

клетъчни маркери, типични за недиференцирани клетки. Те могат да бъдат използвани за целите на регенеративната ендодонтия.

Финансиране

Изследването е финансирано от Медицински университет-София, СМН, ДОГОВОР № Д-90/04.06.2021.

1. Elnawam H, Abdelmougod M, Mobarak A, Hussein M, Aboualmakarem H, Girgis M, et al. Regenerative Endodontics and Minimally Invasive Dentistry: Intertwining Paths Crossing Over Into Clinical Translation. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:837639.
2. Diogenes A, Henry M, Hargreaves K. An update on clinical regenerative endodontics. *Endodontic Topics.* 2013;28:2-23.
3. Galler KM, Widbiller M. Perspectives for Cell-homing Approaches to Engineer Dental Pulp. *J Endod.* 2017;43(9S):S40-S5.
4. Janebodin K, Horst OV, Ieronimakis N, Balasundaram G, Reesukumal K, Pratumvinit B, et al. Isolation and characterization of neural crest-derived stem cells from dental pulp of neonatal mice. *PLoS One.* 2011;6(11):e27526.
5. Goodis Hea. Regenerative Endodontics and Tissue Engineering: What the future holds? *Dent Clin N Am.* 2012;56:677–89.
6. Huang G. A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: Conservation of stem cells for regeneration. *journal of dentistry.* 2008;36:379–86.
7. Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The Hidden Treasure in Apical Papilla: The Potential Role in Pulp/ Dentin Regeneration and BioRoot Engineering. *J Endod.* 2008;34:645–51.
8. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan R, Wang S, Shi S, et al. Characterization of Apical Papilla and its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth –A Pilot Study. *J Endod.* 2008;34(2):166–71.
9. Ruparel NB, de Almeida JF, Henry MA, Diogenes A. Characterization of a stem cell of apical papilla cell line: effect of passage on cellular phenotype. *J Endod.* 2013;39(3):357-63.
10. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs. Those from Other Sources. *J Dent Res.* 2009;88(9):792-806.
11. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One.* 2006;20(1):e79.

12. Liu C, Xiong H, Chen K, Huang Y, Huang Y, Yin X. Long-term exposure to pro-inflammatory cytokines inhibits the osteogenic/dentinogenic differentiation of stem cells from the apical papilla. *Int Endod J*. 2016;49(10):950-9.
13. Chen YJ, Chung MC, Jane Yao CC, Huang CH, Chang HH, Jeng JH, et al. The effects of acellular amniotic membrane matrix on osteogenic differentiation and ERK1/2 signaling in human dental apical papilla cells. *Biomaterials*. 2012;33(2):455-63.
14. Dong R, Yao R, Du J, Wang S, Fan Z. Depletion of histone demethylase KDM2A enhanced the adipogenic and chondrogenic differentiation potentials of stem cells from apical papilla. *Exp Cell Res*. 2013;319(18):2874-82.
15. Zhang W, Zhang X, Ling J, Liu W, Zhang X, Ma J, et al. Proliferation and odontogenic differentiation of BMP2 gene-transfected stem cells from human tooth apical papilla: an in vitro study. *Int J Mol Med*. 2014;34(4):1004-12.
16. Matsui M, Kobayashi T, Tsutsu T. CD146 positive human dental pulp stem cells promote regeneration of dentin/pulp-like structures. *Hum Cell*. 2018;31(2):127-38.
17. Lv F-J, Tuan RS, Cheung KMC, Leung VYL. Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. 2014;32(6):1408-19.
18. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Koidis P, Geurtsen W. Comparative characterization of STRO-1(neg)/CD146(pos) and STRO-1(pos)/CD146(pos) apical papilla stem cells enriched with flow cytometry. *Arch Oral Biol* 2013 Oct;58(10):1556-68. 2013;58(10):1556-68.
19. Abe S, Yamaguchi S, Amagasa T. Multilineage cells from apical pulp of human tooth with immature apex. *Oral Sci Int*. 2007;4:45-58.
20. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7:211-28.